

Tesis Doctoral

Estudio bioquímico de las isoformas de las subunidades R y C de la proteína quinasa A de *Mucor circinelloides* y sus efectos en el desarrollo y la diferenciación

Ocampo, Josefina

2010

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:

Ocampo, Josefina. (2010). Estudio bioquímico de las isoformas de las subunidades R y C de la proteína quinasa A de *Mucor circinelloides* y sus efectos en el desarrollo y la diferenciación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ocampo, Josefina. "Estudio bioquímico de las isoformas de las subunidades R y C de la proteína quinasa A de *Mucor circinelloides* y sus efectos en el desarrollo y la diferenciación". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Estudio bioquímico de las isoformas de las subunidades R y C
de la Proteína Quinasa A de *Mucor circinelloides* y sus efectos
en el desarrollo y la diferenciación**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Química Biológica

Josefina Ocampo

Directora: Silvia Graciela Rossi

Consejera de estudios: Silvia Margarita Moreno de Colonna

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Molecular y Transducción de Señales,
Departamento de Química Biológica, Facultad Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2010.

Estudio bioquímico de las isoformas de las subunidades R y C de la proteína quinasa A de *Mucor circinelloides* y sus efectos en el desarrollo y la diferenciación

RESUMEN

La vía de señalización por cAMP-proteína quinasa A (PKA) juega un rol importante en la regulación del desarrollo, crecimiento y virulencia en un variado número de hongos. La PKA está compuesta por un dímero de subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C). La subunidad R posee una estructura modular con un dominio de dimerización y anclaje (D/D) en el extremo N-terminal y dos dominios de unión de cAMP en el extremo C-terminal, entre ambos se encuentra una zona bisagra que incluye el sitio inhibitorio (IS). A ambos lados del IS se definen el *linker* I y *linker* II. Nuestro modelo de estudio es el hongo *Mucor circinelloides* cuya holoenzima PKA se diferencia de las de otras especies por su mayor fuerza de interacción R-C.

En esta tesis demostramos la participación del *linker* I en la interacción R-C y la importancia de su naturaleza química, dada por la presencia de un grupo residuos ácidos, para establecer la alta fuerza de interacción entre las subunidades. Definimos por primera vez en hongos la existencia de cuatro isoformas de subunidad R, PKAR1, PKAR2, PKAR3 Y PKAR4, las cuales se expresan en forma diferencial a lo largo del desarrollo de *M. circinelloides*. Mediante la construcción de dos cepas que poseen anulados los genes de *pkaR1* y *pkaR2* demostramos que cada una de las isoformas posee roles diferentes en la diferenciación y morfología del hongo. *M. circinelloides* también presenta múltiples isoformas de subunidad C, de las cuales hemos ahondado en el estudio de una en particular denominada PKAC. Caracterizamos la isoforma como una posible pseudoquinasa por las características de su secuencia aminoácidica y por la falta de actividad catalítica. Finalmente demostramos la existencia de variantes de R modificadas post-traduccionalmente por ubiquitinación, en particular se definieron isoformas multiubiquitinadas de alto PM y la monoubiquitinación de PKAR2.

Palabras clave: PKA, cAMP, *linker* I, *Mucor circinelloides*, isoformas de R, diferenciación.

Biochemical study of the R and C isoforms of Protein Kinase A in *Mucor circinelloides* and their effects on development and differentiation

ABSTRACT

The PKA signal transduction pathway plays an important role in growth, development, morphology and virulence of many fungi. PKA is composed of a dimer of regulatory subunits (R) and two catalytic subunits (C). The R subunits has a modular structure: a dimerization docking domain (D/D) at the N-terminus; two tandem cAMP binding domains at the C-terminal region (CNB) and a hinge variable region that includes an inhibitory sequence (IS). At both sides of the IS the regions linker I and linker II are defined. Our experimental model is the fungus *Mucor circinelloides* with a PKA holoenzyme that differs from other species for its high affinity interaction between R and C subunits.

In this work we show the importance of linker I region in the R-C interaction and also the importance of its chemical nature in determining the high affinity interaction between its subunits. The existence of four R subunits isoforms, PKAR1, PKAR2, PKAR3 and PKAR4 is reported. These isoforms show a differential expression through *M. circinelloides* development. The construction of two strains with deletions in *pkaR1* and *pkaR2* genes, allowed to demonstrate the role of PKA in the regulation of morphological and cellular development in *M. circinelloides*. This fungus also has multiple genes coding for C subunits; we have particularly studied the characteristics and the role of PKAC. This isoform has been characterized as a putative pseudokinase since it is catalytically inactive and has unusual aminoacidic sequence. Finally, we show that some R isoforms are modified post-translationally by ubiquitination, particularly the multiubiquitinated high molecular weight isoforms and the monoubiquitinated PKAR2.

Key words: PKA, cAMP, linker I, *Mucor circinelloides*, R subunits isoforms, differentiation.

Agradecimientos:

Han pasado casi 6 años desde que comencé mi doctorado y en este momento en que tengo que volcar sobre un papel todo lo hecho en este tiempo, vienen a mi cabeza un montón de recuerdos. Cada día y cada experimento no sólo tiene el valor del resultado, sino de las anécdotas, las situaciones buenas o malas que los acompañaron, y lo más importante: las **personas** que siempre estuvieron presentes y a las que tengo mucho que agradecer...

A **mi Directora Silvia Rossi**, por haberme acompañado todos estos años y haber estado siempre en el día a día discutiendo resultados y solucionando todos los problemas. Por haberme tenido tanta paciencia al principio cuando no sabía hacer casi nada y haber dedicado tanto tiempo a enseñarme. Por ser tan expeditiva en todo: para planificar, para evitar los contratiempos, por darte cuenta siempre en que me equivoqué y ahorrarme tiempo para los futuros experimentos, por hacer que el laboratorio en general funcione mejor y que los problemas de mañana estén resueltos desde ayer. Siempre voy a sentir una gratitud infinita por lo que significó para mí esta etapa y por lo mucho que tuviste que ver con mi aprendizaje. Creo que en estos años no solo me formé, sino que también me Rossisé. Gracias porque más que mi directora para mí sos mi maestra. Porque si bien, la palabra directora encierra respeto, la palabra maestra además, incluye un gran cariño.

A **Silvia Moreno**, por haber confiado en mí sin conocerme y haberme dado la posibilidad de integrar tu grupo de trabajo. Porque siempre sos un motivo de orgullo para todo el laboratorio por ser un ejemplo de excelencia científica y docente, de esfuerzo, de dedicación y sobre todo por tu calidad humana. Gracias por haberme tratado de igual a igual desde el primer día, por estar siempre al tanto de todos los resultados y aportar siempre ideas nuevas y un gracias más grande, por preocuparte también por nosotros cuando tenemos algún problema.

A **mis compañeros**, este grupo de personas que ocuparon un lugar muy importante en esta etapa de mi vida, ya que con ustedes compartí la mayor parte de mi tiempo, los fracasos, los logros y las charlas de los almuerzos...

A **Paula**, por estar siempre interesada en mis resultados y aportar ideas, por hacerte siempre un rato del tiempo que nunca te sobra para discutir algún experimento o sacar me alguna duda, y por haberme ayudado con la docencia.

A **Fiore**, por las tantas charlas de autoayuda cuando los experimentos no dan y por compartir también los buenos momentos; pero por sobre todo por

haber sabido levantar mi ánimo en los malos momentos y por haberme ayudado hasta en cosas domésticas.

A **Rich**, por saber siempre de todos los temas y aportarnos un poco de cultura y hasta en algunos casos soluciones inesperadas, pero por sobre todas las cosas por hacerme matar de risa y hacer de laboratorio un lugar divertido.

A **Vane**, por estar siempre bien dispuesta, por tener la mejor onda para todo, por animarme cuando las cosas no salen, por repetirme con paciencia los protocolos de MALDI todas las veces que te los pregunto, pero sobre todo porque se que siempre estás disponible para charlar de la vida o de Lost!

A **Cons**, por haber desarrollado la capacidad de trabajar en 10 cm de mesada con tal de no molestarnos, por ayudarme tantas veces cuando sentía que el tiempo no me alcanzaba, por ayudarme con la docencia y por estar siempre de buen humor.

A **Lucas**, por ser tan buen compañero, por estar siempre atento a ayudar, a solucionar las cosas, por estar siempre tranquilo cuando estamos todos nerviosos y por las laaaaaaaaaaaaaargas charlas compartidas.

A **Leti**, por ser tan divina, por tu buena onda para trabajar, para ayudar, por transmitir siempre una energía muy positiva y por los budines!!!

A **Nico**, un gracias enorme por haberme ayudado tanto cuando trabajamos juntos, por haberte esmerado en que todo saliera bien, por la onda que le pusiste, por bancarte las kinasas y muchas veces también mi mal humor.

A tres compañeras con quienes compartí gran parte de este tiempo:

A **Jime**, por haberme ayudado a comprender el mundo de la PKA cuando me costaba entender mis propios experimentos y por haberme acompañado en tantas cosas fuera del trabajo, como hacerme probar por primera vez una hamburguesa de McDonald's. A **Pía** por haber logrado con tu calidez que me sienta cómoda en el labo desde el primer día, y a **Elba** por ayudarme siempre con tus conocimientos químicos y por haberme ensañado tantas cosas de *Mucor*.

A otros compañeros que pasaron durante estos años, que su recuerdo siempre me trae una sonrisa y la imagen de muchas situaciones divertidas: **Vicky**, **Iri y Marce**, también gracias a **Patri y Paula G.** con quienes compartí menos tiempo en distintos momentos pero que estarán siempre en mis recuerdos de esta etapa.

A **Victor** de la Universidad de Murcia, por haberme recibido con tanta hospitalidad, por haberme enseñado tantas cosas y haber hecho todo lo posible y lo imposible para que mi estadía allá diera sus frutos y que me sintiera a gusto. También gracias a los chicos de tu labo, especialmente a **Fátima** que me acompañó en todo el proceso. Gracias a **Silvia**, a **Juan P** y a **Sebi** por contestar todos mis mails hasta el día de hoy evacuando mis dudas y hasta discutiendo resultados. Gracias a María, a Laura a Santiago y a Rosa. Gracias a todos ustedes por haber logrado que a pesar de lo mucho que extrañé en ese tiempo, me haya traído el mejor de los recuerdos de ustedes.

Al **personal no docentes: Gladis, Juan, Miriam, Martín y Ayelen**, por la contribución de cada uno desde su función durante estos años.

A **Dante de bajas temperaturas** del pabellón I, por la innumerable cantidad de veces que salvó mis experimentos cuando me quedaba sin N₂ líquido.

A **toda la gente del Depto. de Qca Biológica y de la facultad** que de alguna u otra manera me ayudó cuando necesité algo. Sería imposible mencionar a todos, pero quiero agradecer especialmente a aquellos con quienes más cosas compartí o que me ayudaron en reiteradas oportunidades: A Susi, a Mariana, a Sabri y a Charli; a Ceci y sus becarias; a los Cánepas; a los Pecci-Kordon; a Omar Cosso; a Mario y Luciana, a Sandra Ruzal y especialmente a sus becarios Mariano, Mercedes y Mariana que me ayudaron un montón de veces; y a Mariela Scassa por su buena onda y por las veces que me dio una mano.

A **mis docentes de la Universidad Nacional de Rosario**, que supieron transmitirme su pasión por la ciencia haciendo que inicie este camino.

A **Pablo Y Tamara**, por haber sido quienes me convencieron de empezar un doctorado y por haber sido mis garantes casi sin conocerme cuando no podía alquilar de otra manera.

A **mis amigos de Paiva y Rosario: Analía, Daniel, Lau, Maria, Md y Mile** a quienes pude ver tan pocas veces en estos años, gracias porque a pesar de eso siguen siendo mis amigos.

A **mis amigas Mariana, Mara, Pato, Laura y Vero**, por haber estado siempre, por animarme en los peores momentos, por haber logrado que extrañe menos Rosario y que me sienta más acompañada en esta ciudad monstruosa, también por compartir las alegrías y simplemente por ser mis amigas.

A **Vale**, mi amiga del doctorado por haber sido una excelente compañera de seminarios, por compartir los nervios de los concursos y principalmente por haberte convertido en una gran amiga. Por tu buena predisposición para todo y por alentarme tantas veces.

A **mi tío Tito**, por ser el mejor tío que se puede tener. Por haberme ayudado tanto cuando más lo necesité, cuando no conocía a nadie en Buenos Aires y cuando no me alcanzaba la plata para llegar a fin de mes, pero sobre todo gracias por ser tan noble y tan generoso.

A **Elsa y Hugo**, mis falsos papis, por ser tan buenos y generosos. Por estar siempre atentos no sólo a mis necesidades sino también a darme los gustos. Pero principalmente gracias por alegrarse con mis logros, por preocuparse por mis problemas y por hacer siempre todo lo posible para solucionarlos a penas se enteran.

A **Vicky, mi hermanita del alma**, por haber compartido mis sueños siempre. Gracias por haberme acompañado especialmente en estos años, cuando estaba entusiasmada o cuando estaba cansada y por haber soportado tantas veces mi mal humor cuando algo no salía bien. Gracias sobre todo por ser tan leal.

A **mis queridos papis, Betty y Mario, GRACIAS!!!** Sería imposible enumerar todo lo que tengo para agradecerles, pero voy a intentar mencionar algunas cosas. Gracias por haber incentivado desde que era muy chica mi curiosidad por conocer y saber; por haberme dado la libertad de elegir una carrera y haber hecho todo para que cumpla mis objetivos sin que tenga que preocuparme de otras cosas. Gracias por haber apoyado mis decisiones aún cuando no estuvieran de acuerdo. Gracias porque siempre me enorgullecen, por sus valores humanos y especialmente por el amor incondicional que me tienen.

A **Diego, mi amor, mi GRAN AMOR**. No podría expresar con palabras todo lo que tengo para agradecerte, sólo voy a darte las gracias por algunas de esas tantas cosas. Gracias por tu enorme paciencia, sobre todo en este último tiempo en que compartimos la escritura de las tesis, por haberte hecho cargo de un montón de cosas para que yo no pierda tiempo y por haberme animado tanto. Gracias por tu generosidad infinita, por anteponer siempre mis necesidades a las tuyas. Pero sobre todas las cosas, gracias por compartir la vida conmigo y por hacerme tan feliz.

A Diego...

A mis papis y a Vicky.

PUBLICACIONES

Esta tesis dio origen a las siguientes publicaciones:

- A Subunit of Proteine Kinase A regulates Growth and Differentiation in the Fungus *Mucor circinelloides*.
Ocampo J, Fernandez Nuñez L, Silva F, Pereyra E, Moreno S, Garre V, Rossi S.
Eukaryotic cell 2009 Jul; 8(7):933-44.

- A novel activating effect of the regulatory subunit of protein kinase A on catalytic subunit activity.
Jimena Rinaldi, Josefina Ocampo, Silvia Rossi y Silvia Moreno. Arch Biochem Biophys. 2008 Dec 15; 480(2):95-103
(Experimentos de este trabajo están compartidos con la tesis de Jimena Rinaldi)

- PKA from *Mucor circinelloides*: Model to study the role of linker I in the interaction between R and C subunits.
Ocampo Josefina, Moreno Silvia, Rossi Silvia
Biochem. Biophys .Res. Commun. 2007 Oct 26; 362(3):721-6

Este trabajo fue financiado por:

- Agencia de Promoción Científica y Tecnológica
- Conicet
- UBA

INDICE

ABREVIATURAS	14
INTRODUCCION	16
I. Transducción de señales por cAMP	17
II. Proteínas quinasas	18
III. PKA en mamíferos	22
III.1. Subunidad C	22
III.1.a. Unión del ATP y de los iones Mg ²⁺	22
III.1.b. Reconocimiento del sustrato	23
III.2. Subunidad R	24
III.2.a. CNBs	25
III.2.b. Dimerización y anclaje	26
III.2.c. Zona bisagra	26
III.3. Holoenzima PKA	27
IV. Mecanismo de activación de PKA	29
V. Localización subcelular de PKA	31
VI. PKA en hongos	32
VI.1. PKA de <i>S. cerevisiae</i>	33
VI.2. PKA de <i>Mucor sp.</i>	34
VII. Morfología y desarrollo de <i>M. circinelloides</i>	36
VII.1. Ciclo de vida del hongo	36
VII.2. Esporas asexuales	37
VII.3. Crecimiento filamentoso	37
VII.4. Crecimiento levaduriforme y gemación	38
VII.5. Transición anaerobiosis aerobiosis	39
VII.6. Distribución de núcleos en micelio y levaduras	39
VII.7. Formación de artrosporas	40
VII.8. PKA y la morfología fúngica	40
VIII. Duplicación génica	42
IX. Ubiquitinación	46
X. Pseudoquinasas	49
OBJETIVOS GENERALES	53
MATERIALES Y MÉTODOS	56
I. Cepas utilizadas	57
I.1. Cepas de <i>M. circinelloides</i>	57
I.2. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	58
II. Preparación de esporas	58
III. Construcción de proteínas mutantes R1 y R2	58
IV. Expresión y purificación de proteínas en levaduras	60
IV.1. Expresión y purificación de las subunidades Rw, R1, R2 y BCY1	60

IV.2. Expresión y purificación de la subunidad C de <i>M. circinelloides</i> en levadura	60
V. Purificación de la subunidad C de <i>M. circinelloides</i>	61
VI. Preparación de la subunidad C de <i>S. cerevisiae</i> (TPK1)	61
VII. Purificación de subunidades R de <i>M. circinelloides</i>	62
VIII. Preparación de holoenzima de PKA de <i>M. circinelloides</i>	62
IX. Ensayo de unión a cAMP	62
X. Ensayo de actividad quinasa	63
XI. Ensayo de inhibición de actividad quinasa	64
XII. Ensayo de disociación de holoenzima reconstituída	64
XIII. Transformación de <i>M. circinelloides</i>	65
XIII.1. Producción de protoplastos	65
XIII.2. Mezcla de transformación	65
XIII.3. Selección de transformantes	66
XIV. Construcción de vectores <i>knockout</i>	67
XV. Purificación de ácidos nucleicos	68
XV.1. Preparación de DNA plasmídico	68
XV.2. Preparación de DNA cromosómico	69
XV.3. Preparación de RNA para <i>Northern blot</i>	69
XV.4. Preparación de RNA para RT-PCR	69
XVI. <i>Southern blot</i> y <i>Northern blot</i>	70
XVII. PCR y RT-PCR semicuantitativa	70
XVII.1. PCR.	70
XVII.2. RT-PCR semicuantitativa	70
XVIII. Crecimiento radial y esporulación	71
XIX. Análisis microscópico	71
XX. Predicción de secuencias de R, análisis por espectrometría de masas y análisis filogenético	72
XX.1. Predicción de secuencias de R y análisis por espectrometría de masas	72
XX.2. Análisis filogenético	72
XXI. Otros métodos utilizados	73
XXI.1. <i>Western blot</i>	73
XXI.2. Tinción con <i>Coomasie Blue</i> coloidal	74
XXI.3. Acumulación de glucógeno en levaduras	74
XXI.4. Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa	74
XXI.4.a Ensayo de peroxidasa	75
XXI.5. Inmunoprecipitación	75
XXI.6. Determinación de concentración de proteínas	75
XXII. Medios de cultivos	75
XXIII. Soluciones	77
XXIV. Primers utilizados	79

CAPITULO I:**Interacción entre las subunidades R y C de la PKA de *Mucor circinelloides***

I.1. Introducción y objetivos específicos	81
I.2. Resultados	83
I.2.1. La holoenzima PKA de <i>M. circinelloides</i> presenta alta afinidad de interacción R-C	83
I.2.2. Extremo amino-terminal de la subunidad R	85
I.2.3. Expresión y propiedades de las subunidades Rwt R1 y R2 <i>M. circinelloides</i> en levadura	86
I.2.4. Ensayos de estabilidad de C	87
I.2.5. Inhibición de la actividad quinasa de la subunidad C por las subunidades R	88
I.2.6. Disociación de holoenzima reconstituida por cAMP	89
I.2.7. Importancia de la naturaleza química del <i>linker</i> I	92
I.2.8. Influencia de la subunidad C en la fuerza de interacción con R	93
I.3. Discusión	94

CAPITULO II:**Isoformas de subunidad R**

II.1. Introducción y objetivos específicos	97
II.2. Resultados	99
II.2.1. Construcción de la cepa <i>knockout</i> para el gen <i>pkaR1</i>	99
II.2.2. Caracterización bioquímica de la cepa $\Delta R1$	101
II.2.2.a. Ensayo de unión a cAMP	101
II.2.2.b. Medición de actividad quinasa de $\Delta R1$	103
II.2.2.c. Análisis por <i>Western blot</i>	104
II.2.3. Crecimiento y esporulación de la mutante nula de <i>pkaR</i>	104
II.2.4. Morfología y germinación de la mutante nula de <i>pkaR1</i>	106
II.2.5. Identificación de otros genes <i>pkaR</i> en <i>M. circinelloides</i>	107
II.2.6. Expresión de los genes <i>pkaR</i>	111
II.2.6.a. Análisis de los niveles de mRNA de los genes <i>pkaR</i> en distintas condiciones de crecimiento	111
II.2.6.b. Análisis de la expresión de las proteínas PKAR en distintas condiciones de crecimiento	114
II.2.7. Análisis de expresión de los genes <i>pkaC</i>	115
II.2.8. Construcción de la cepa <i>knockout</i> para el gen <i>pkaR2</i>	116
II.2.9. Caracterización Bioquímica de $\Delta R2$	118
II.2.9.a. Ensayo de unión a cAMP	118
II.2.9.b. Determinación de actividad quinasa de $\Delta R2$	119
II.2.10. Crecimiento y esporulación de la mutante nula de <i>pkaR2</i>	120
II.2.11. Morfología y germinación de la mutante nula de <i>pkaR2</i>	121
II.2.12. Expresión de los genes <i>pkaR</i> en la mutante $\Delta R2$	124

II.2.12.a. Análisis de los niveles de mRNA de los genes <i>pkaR</i> en $\Delta R2$	124
II.2.12.b. Análisis de la expresión de las proteínas PKAR	125
II.2.13. Análisis filogenético de los genes <i>pkaR</i>	125
II.2.14. Ubiquitinación de las isoformas PKAR	127
II.2.15. Ubiquitinación a lo largo de la diferenciación en <i>M. circinelloides</i>	135
II.3. Discusión	137
CAPITULO III:	
PKAC, una isoforma con característica de pseudoquinasa?	144
III.1. Introducción y objetivos específicos	145
III.2. Resultados	147
III.2.1. Análisis de la secuencia de PKAC	147
III.2.2. Medición de actividad quinasa	150
III.2.2.a. Expresión de PKAC en levaduras	151
III.2.2.b. Medición de actividad quinasa de PKAC	152
III.2.2.c. Requerimiento de magnesio	153
III.2.3. Acumulación de glucógeno en levaduras	154
III.2.4. Interrupción del gen <i>pkaC</i>	156
III.2.5. Análisis de la posible letalidad del gen <i>pkaC</i>	159
III.3. Discusión	161
CONCLUSIONES GENERALES	164
PERSPECTIVAS	168
BIBLIOGRAFIA	170

ABREVIATURAS

PKA	Proteína quinasa dependiente de cAMP
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
R	Subunidad Regulatoria de PKA
C	Subunidad Catalítica de PKA
AKAPs	Proteínas de anclaje de PKA
PKI	Péptido Inhibidor de PKA
PBC	Casete de unión a fosfato
Epac	Factor activador de guanina activado por cAMP
D/D	Dominio de dimerización y anclaje
CNB	Dominio de unión a cAMP
IS	Secuencia inhibitoria
R _S	Subunidad Regulatoria de <i>Saccharomyces</i>
C _S	Subunidad Catalítica de <i>Saccharomyces</i>
wt	<i>Wilde type</i>
PKAMc	PKA de <i>M. circinelloides</i>
PKACb	PKA de corazón bovino
C _M	Subunidad Catalítica de PKA de <i>M. circinelloides</i>
C _B	Subunidad Catalítica de PKA de corazón bovino
R1	Proteína mutante de PKAR1 carente del N-terminal
R2	Proteína mutante de PKAR1 carente de AA ácidos
Rwt	Proteína PKAR1 <i>wilde type</i>
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	ÁcidoTetra Acético diamina etileno
EGTA	ÁcidoTetra Acético etilenglicol bis
min	Minutos
ml	Mililitro
μl	Microlitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero

μm	Micrómetro
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fenil-Metil-Sulfonil fluoridro
SDS	Dodecil sulfato de sodio
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight.</i>
Ub	Ubiquitina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
RT	<i>Reverse transcription</i>
U	Unidades enzimáticas
<i>gpd1</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
<i>tef-1</i>	Factor de elongación <i>tef</i>
kb	Kilo base
WGB	<i>Whole genome duplication</i>
d.p.m.	Desintegraciones por minuto
SAXS	<i>Small-Angle X-ray scattering</i>
AC	Adenilato ciclasa
PDE	Fosfodiesterasa
n.d.	No determinado
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis-Menten
<i>V_{max}</i>	Velocidad máxima
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
A _{0.5}	50% de activación
<i>K_e</i>	Constante de especificidad
<i>K_{cat}</i>	Constante catalítica
r.p.m.	Revoluciones por minuto

INTRODUCCIÓN

I. Transducción de señales por cAMP

Las vías de transducción de señales permiten a las células reconocer el ambiente que las rodea, adaptarse y comunicarse con otras células. Dichas rutas, muy conservadas evolutivamente, regulan procesos muy importantes que se desencadenan en respuesta a diversos estímulos. Esta respuesta, involucra la participación de segundos mensajeros y se produce mediante la regulación de la expresión génica y la modificación post-traducciona de proteínas efectoras. Entre las modificaciones post-traduccionales posibles la fosforilación es un mecanismo predominante.

El concepto de segundo mensajero nace con el descubrimiento del nucleótido cíclico 3'-5'-adenosina monofosfato (cAMP) y sus efectos a través de la fosforilación reversible de proteínas (2). La fosforilación de proteínas en eucariotas es un evento que involucra la transferencia del fosfato γ del ATP (o GTP) a residuos serina, treonina o tirosina de las proteínas blanco. La proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) es el miembro mejor caracterizado de la familia de quinasas que fosforilan en residuos treonina y serina, y la primer molécula conocida con capacidad de unir cAMP (3). Posteriormente fueron descritas otras proteínas con capacidad de unir cAMP como la proteína activadora de genes por catabolito bacteriana (4), el receptor de cAMP de *Dictyostelium discoideum* (5), los canales iónicos gatillados por cAMP (6) y los factores intercambiadores de guanina activados por cAMP (Epac) (7, 8), no obstante, los principales efectos del cAMP son mediados por la PKA a través de la unión del nucleótido cíclico a su subunidad regulatoria (9).

La holoenzima PKA es un tetrámero formado por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C). La subunidad C es responsable de catalizar la reacción de transferencia del fosfato, mientras que la subunidad R confiere dependencia de cAMP y media la localización subcelular de la holoenzima vía la interacción con proteínas de anclaje de PKA, AKAPs (*A Kinase a Anchoring Proteins*).

El cAMP es sintetizado por la adenilato ciclasa (AC) en respuesta a distintos estímulos extracelulares. El modelo clásico de activación de la holoenzima plantea que cuando los niveles de cAMP aumentan, se unen dos moléculas del nucleótido cíclico a cada molécula de subunidad R en forma cooperativa (10). Esta unión

promueve un cambio conformacional que conduce a la disociación de la holoenzima, liberando dos moléculas de subunidad C activas y un dímero de subunidades R con cuatro moléculas de cAMP unidas (Figura 1) (11, 12).

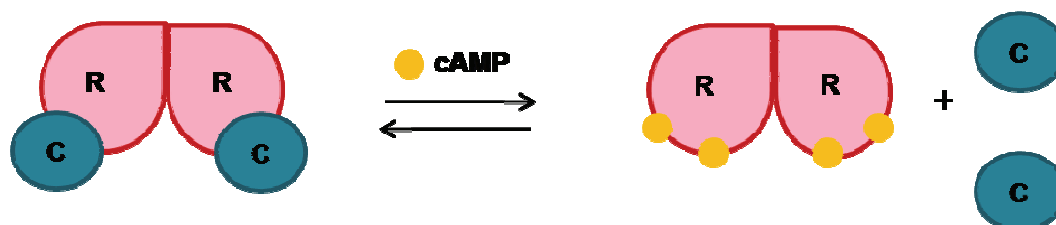


Figura 1- Modelo clásico de activación de PKA por cAMP

II. Proteínas quinasas

Las proteínas que pertenecen a la gran familia de las proteínas quinasas (PKs) se relacionan en virtud de poseer un dominio quinasa homólogo, también conocido como dominio catalítico, compuesto por 250-300 residuos de aminoácidos. Se subdividen principalmente en dos grupos, las serina / treonina quinasas y las tirosina quinasas; estos dos grupos a su vez se clasifican filogenéticamente en base al dominio catalítico y de este análisis surgen familias de proteínas relacionadas por la especificidad de sustrato o por el modo de regulación. Los miembros de los distintos grupos o familias comparten también propiedades estructurales y funcionales básicas. La PKA se clasifica dentro de la familia de las AGC quinasas, que es un grupo de serina / treonina proteínas quinasas. En esta familia se incluye a las proteínas cuyo dominio catalítico es semejante a proteína quinasa A, proteína quinasa G o proteína quinasa C (13).

Tres roles se pueden describir del dominio catalítico:

- 1) Unión del ATP (o GTP) en complejo con cationes divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) y orientación del fosfato transferible.
- 2) Unión y orientación de la proteína o péptido sustrato.
- 3) Transferencia del fosfato γ al oxhidrilo aceptor.

Este dominio catalítico se subdivide en 12 subdominios (I-XII) de estructura primaria conservada que se definen como: *“Regiones nunca interrumpidas por grandes inserciones de aminoácidos y contienen un patrón característico de*

residuos conservados".

En la figura 2 se muestran esquematizados los subdominios sobre la estructura primaria de la subunidad C α de PKA (PKA-C α) (14). Los residuos de aminoácidos de estos dominios son altamente conservados en toda la familia de proteínas quinasas y juegan un rol esencial en la función enzimática. El patrón de los residuos de aminoácidos de los subdominios VIB, VIII y IX son particularmente muy conservados (13).

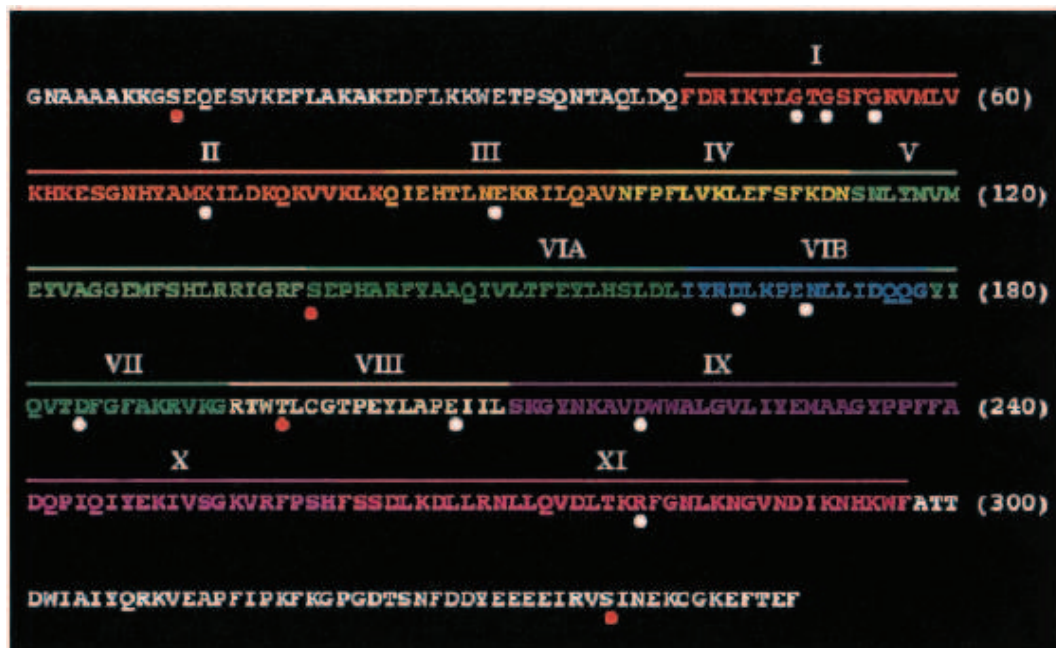


Figura 2- Secuencia de la subunidad C α . Los subdominios indicados en colores son los pertenecientes al core catalítico conservado en todas las quinasas (14).

La subunidad catalítica presenta una estructura bilobular muy conservada en todo el grupo de las quinasas (15). En ese plegamiento bilobular se distingue un lóbulo más pequeño en el extremo N-terminal y un lóbulo C-terminal mayor (Figura 3).

El lóbulo pequeño está compuesto de cinco hojas β -antiparalelas y una α -hélice, e incluye a los subdominios I-IV que se encuentran implicados principalmente en anclar y orientar al nucleótido. El lóbulo mayor en cambio, está formado por cinco α -hélices, incluye a los dominios VIa a XI y es mayormente el responsable de la unión del sustrato y la fosfotransferencia. En la hendidura entre estos dos lóbulos se forma el sitio activo.

La subunidad C es capaz de adoptar diferentes conformaciones a lo largo de la catálisis yendo desde un estado abierto a uno cerrado. La conformación más abierta es la que presenta la apoenzima y la más cerrada la que adquiere al unirse al sustrato (16). En la figura 3 se observa la estructura de la apoenzima.

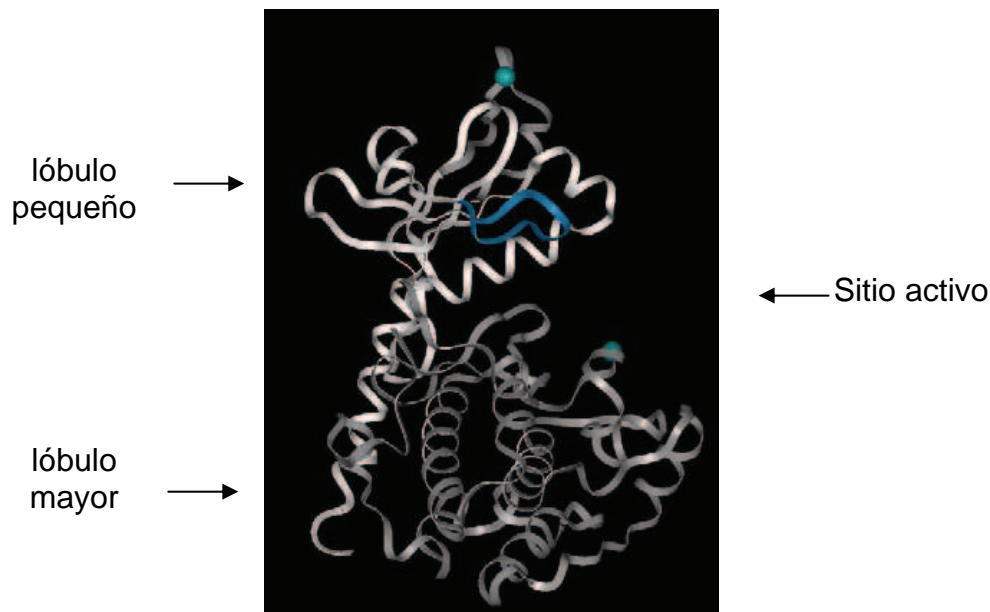


Figura 3- Estructura cristalográfica de la subunidad C α bovina (16).

Como consecuencia de la resolución de la estructura cristalográfica del complejo binario PKAC α -PKI (péptido inhibidor), por primera vez se pudo conocer la topología general de la estructura del *core* catalítico de una proteína quinasa (17). Con la posterior resolución de los complejos ternarios PKAC α -PKI con MgATP o MnAMP-PNP (18, 19) se logró asignar un rol preciso a cada uno de los residuos conservados y se vio que dentro de cada uno de estos subdominios hay residuos que tienen una fuerte implicancia en el rol catalítico (13):

Subdominio I: contiene el motivo consenso GxGxxGxV, denominado *loop G* empezando en G50 en PKAC α . Forma una estructura flexible que une los fosfatos no transferibles del ATP. El resto de los residuos del subdominio forman puentes de hidrógeno con el ATP y contribuyen a la formación de un bolsillo hidrofóbico que encierra al anillo de adenina.

Subdominio II: contiene el residuo invariante K72, que ayuda a anclar y a orientar al ATP.

Subdominio III: contiene el E91 que ayuda a estabilizar la interacción entre la K72 y el ATP.

Subdominio IV: no parece estar involucrado directamente en la catálisis o en el reconocimiento del sustrato ya que no contiene residuos invariantes.

Subdominio V: conecta los lóbulos grande y pequeño de la subunidad C (Figura 3). Contiene además al E127 que participa en la interacción con la primer arginina de la secuencia consenso RRXS del sustrato (ver sección III.1.b)

Subdominio VIA: esta parte de la molécula parece actuar solamente como un soporte estructural.

Subdominio VIB: aquí están incluidos dos residuos invariantes, el D166 y la N171. Esta región se denomina *loop* catalítico porque el D166 actuaría como base aceptora del protón del grupo hidroxilo del sustrato durante el mecanismo de fosfotransferencia. La N171 ayuda a estabilizar el *loop* catalítico y quela el ión Mg^{2+} secundario que genera un puente entre los fosfatos α y γ del ATP. En este subdominio también se encuentra el E170 que forma un puente de hidrógeno con el ATP y participa en la unión del sustrato.

Subdominio VII: Contiene el triplete altamente conservado DFG, que corresponde a D184-F185-G186. El Asp184 quela al ión Mg^{2+} primario activador que forma un puente entre los fosfatos β y γ del ATP orientando la fosfotransferencia.

Subdominio VIII: contiene al residuo casi invariante E208 que junto a la R280 del subdominio XI estabilizan al lóbulo mayor (Figura 3). Este dominio parece jugar el mayor rol en el reconocimiento del péptido sustrato ya que varios residuos de este subdominio participan en la unión. Se sabe que muchas proteínas quinasas se activan por la fosforilación de residuos presentes en el subdominio VIII. En el caso de PKA-C α la máxima actividad requiere de la fosforilación de la T197 (20).

Subdominio IX: contiene al D220 que estabiliza al *loop* catalítico, la G225 altamente conservada y el E230 que participa en el reconocimiento del sustrato. Los residuos 235-239 están involucrados en interacciones hidrofóbicas.

Subdominio X: es el más pobremente conservado y no está muy clara su función.

Subdominio XI: contiene a la R280 que participa en la estabilización del lóbulo mayor.

III. PKA en mamíferos

III.1. Subunidad C

Existen tres genes que codifican para la subunidad catalítica: α , β y γ . Las secuencias de aminoácidos de $C\alpha$ y $C\beta$ presentan aproximadamente un 93% de identidad. La isoforma $C\alpha$ se expresa constitutivamente en todos los tejidos, mientras que $C\beta$ es tejido específica y la presencia de $C\gamma$ sólo se ha demostrado en testículos. Esta isoforma presenta una identidad del 79% y 83% con $C\beta$ y $C\alpha$ respectivamente (21).

La isoforma $C\alpha$ fue la primer quinasa purificada (3) y cristalizada. Se cristalizó unida a un péptido de 20 residuos de aminoácidos derivado de un inhibidor natural de la proteína quinasa A, PKI (17). Este péptido contiene la secuencia consenso común a todos los péptidos sustratos de PKA (RRXS/T), con una alanina en lugar de serina o treonina.

III.1.a. Unión del ATP y de los iones Mg^{2+}

El ATP y el Mg^{2+} se unen al sitio activo, hendidura formada entre ambos lóbulos. El ATP interacciona con un segmento conservado que conecta las hojas β_1 y β_2 . Este *loop* contiene un segmento rico en glicinas, GxGxxG. Los residuos glicina permiten anclar a los fosfatos no transferibles del ATP (13) y coordinarlo para la interacción con las cadenas laterales de otros residuos. Esta interacción ayuda a ordenar a la enzima en una conformación cerrada y a posicionar el nucleótido para la catálisis (22). La triada K72-E91-D184 presente en el sitio activo, también participa del anclaje del ATP y en la interacción con el Mg^{2+} (19).

El sitio activo puede unir dos iones Mg^{2+} (19, 23) de cuya coordinación depende la unión del ATP. Uno de los iones Mg^{2+} , denominado activador o primario, coordina los fosfatos β y γ del ATP con el D184 del sitio activo; el otro ión Mg^{2+} , denominado secundario o inhibitorio, coordina los fosfatos α y γ del ATP e interactúa con D184 y N171 e el *loop* catalítico (19) (Figura 4).

Al ión Mg^{2+} primario se lo denomina de esta manera porque su sitio de unión presenta mayor afinidad por el ión que el sitio que une el Mg^{2+} secundario (19, 24). Al Mg^{2+} secundario también se lo denomina inhibitorio, porque se vio que modula la velocidad de la catálisis inhibiendo la liberación del ADP (25, 26). Aparentemente

después de que se transfiere el fosfato γ al sustrato, aumenta la afinidad del sitio que une este ión Mg^{2+} , y consecuentemente este cambio de afinidad inhibe la liberación del ADP. De esta manera los iones Mg^{2+} juegan un rol crucial en regular la fosfotransferencia y en limitar la velocidad de reacción (27).

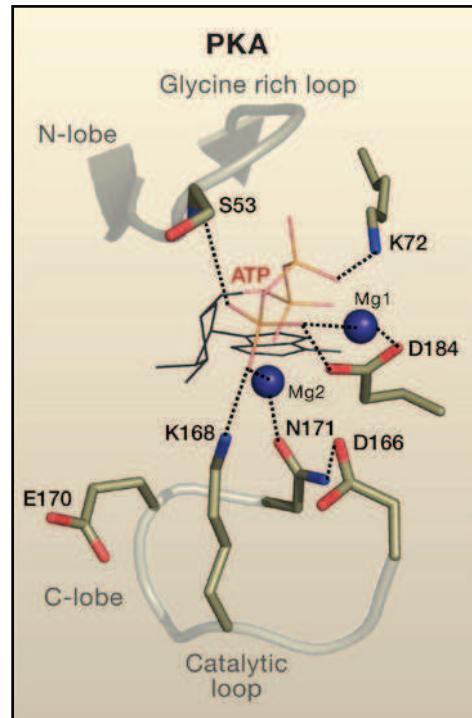


Figura 4- Posicionamiento del Mg^{2+} . El sitio activo de PKA se muestra en una conformación que representa el estado de transición (inactiva-activa). El fosfato γ del ATP está atrapado entre el *loop* rico en G y la K168 en el *loop* catalítico. Los dos iones Mg^{2+} son anclados por la N171 y el D184 en el *loop* catalítico (28).

Ni el nucleótido ni los iones Mg^{2+} solos se unen con fuerza a la PKA, pero juntos aumentan sus afinidades de unión (29). En un trabajo computacional reciente se describe que el origen de la cooperatividad está dado por neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfatos (27).

III.1.b. Reconocimiento del sustrato

El sustrato proteico se une al *loop* catalítico ubicado en el lóbulo mayor. La óptima fosfotransferencia requiere del arreglo espacial de varios residuos del subdominio VIII, los cuales se encuentran conservados en todas las quinasas conocidas, descritos en la sección anterior.

Los sustratos de la PKA son el ATP, que es el dador de fosfato y una proteína que actúa como aceptor de fosfato.

La subunidad C generalmente reconoce como sustratos a aquellas proteínas, o péptidos derivados de ellas, que presentan la secuencia básica consenso RRXS/T, donde X puede ser cualquier aminoácido (30). El péptido utilizado como sustrato clásico en los experimentos se denomina kemptido y deriva de la secuencia de la piruvato quinasa de cerdo (31).

La nomenclatura con la que se indica la posición de los residuos se basa en designar como P al residuo fosforilable. Los péptidos sustratos presentan dos aminoácidos básicos separados por uno o dos residuos de la serina o treonina que es fosforilada (posición P) a los que se les asigna la posición P-2 y P-3.

Las proteínas sustrato participan en la regulación de diferentes procesos celulares como transcripción, flujo de iones, crecimiento y muerte.

III.2. Subunidad R

A diferencia de otras quinasas, la subunidad C está regulada negativamente por la subunidad R. Además de inhibir a la subunidad catalítica, la subunidad R ancla a la holoenzima a lugares específicos de la célula (32) y previene el ingreso al núcleo de la subunidad C (33).

Todas las subunidades R comparten una estructura modular conservada y bien definida (34). En el extremo N-terminal presentan un dominio de dimerización y anclaje (D/D), a través del cual las subunidades regulatorias se unen entre sí y a las proteínas de anclaje (AKAPs) (35-37); hacia el extremo C-terminal contienen dos dominios en tandem de unión a cAMP (CNB) (38-40) y entre estas dos regiones bien estructuradas se encuentra un dominio desplegado llamado zona *linker* o bisagra que incluye el sitio inhibitorio (IS), que se une al sitio activo de C y se asemeja al sitio consenso de fosforilación de los sustratos. El *linker* es una región desordenada, que tiene gran flexibilidad (41). La región hacia el N-terminal del IS se conoce como *linker* I, mientras que la región hacia el C-terminal del IS se llama *linker* II (Figura 5).

No se conoce hasta el momento la estructura de alta resolución de la subunidad R entera, pero sí de los dominios D/D y CNB. Recientemente se lograron cristalizar algunos complejos de holoenzima formada por la subunidad C y distintas

construcciones de RII β que incluyen la región correspondiente a los CNB con seis residuos correspondientes al *linker* (42).



Figura 5- Estructura modular de la subunidad R

En mamíferos, existen dos tipos de subunidades regulatorias: I y II, dicha clasificación se basó en el patrón de elución en columnas de DEAE-celulosa (43). Cada tipo tiene dos isoformas: α y β . Estas cuatro isoformas corresponden a cuatro genes diferentes. RI α y RII α se expresan en la mayoría de los tejidos (44, 45) mientras que RI β y RII β presentan una expresión más restringida a tejidos específicos (46, 47).

Las isoformas RI α y RII α presentan estructuras conservadas (36, 48) pero difieren a nivel de secuencia (49-51). Una de las principales diferencias entre las subunidades R de tipo I y II es que RI posee una alanina en el sitio inhibitorio (sitio de pseudosustrato), mientras que las subunidades RII tienen una serina en esta posición, la cual es autofosforilada (sitio de autofosforilación).

Las isoformas se diferencian por sus propiedades bioquímicas (52) y sus funciones biológicas. Mientras que ratones *knockout* para RI α mueren *in útero* (53), mutantes en RII β tienen deficiencias nutricionales (54).

III.2.a. CNBs

Los dominios de unión a cAMP están muy conservados en secuencia y estructura en todas las subunidades R (55). Las estructuras de RI α (40) y de RII β (39) comparten la misma arquitectura con otros dominios de unión a nucleótidos cíclicos. Cada dominio consiste en dos subdominios: un subdominio α y un subdominio β . Este último es un sandwich tipo β relativamente rígido. Contiene además un motivo muy conservado llamado casete de unión a fosfato (PBC) al cual se une el cAMP. El PBC es un motivo de catorce aminoácidos, que está presente en todos los dominios de unión a nucleótidos cíclicos (38).

III.2.b. Dimerización y Anclaje

La subunidad regulatoria forma un homodímero estable que permanece intacto después de la liberación de las subunidades catalíticas. En RI los monómeros están unidos por puentes disulfuro formados entre las cisteínas 16 y 37 (56). La dimerización de RII no involucra cisteínas, sino que es mantenida por residuos del extremo amino terminal (57).

Las subunidades regulatorias a través de su interacción con las proteínas AKAPs (58) permiten localizar a la holoenzima en sitios específicos de la célula. La estructura del dominio de dimerización provee la superficie de interacción con las AKAPs, razón por la cual la dimerización es un requisito para la unión de AKAPs.

III.2.c. Zona bisagra

Es una región variable con propiedades dinámicas que incluye al sitio inhibitorio (IS) que se une al sitio activo de C impidiendo la unión de los sustratos y por lo tanto la catálisis. Las porciones denominadas *linker* presentan mucha variación entre diferentes especies (59). Mediante un análisis *in silico* se predijo que la estructura secundaria de los *linkers* de RI α , RII α y RII β está formada por *random coils* pero estos a su vez se pueden clasificar en zonas de baja y alta complejidad. Las zonas de alta complejidad presentan más estructura residual, mientras que las regiones de baja complejidad son secuencias con una composición sesgada de aminoácidos, en general no globulares y en algunos casos pueden participar en la transición de estructura desordenada a ordenada, como ocurre con regiones que participan en interacciones proteína-proteína (60, 61). A partir del análisis de las distintas R se encontraron dos regiones de baja complejidad dentro del *linker* de RII α y RII β , pero no en RI α . Dentro del *linker* de RI α se encontraron sitios de fosforilación y de interacción con otras proteínas (59).

Las diferentes subunidades R presentan diferentes conformaciones en solución. Como la región bisagra es la única poco conservada se propuso que es la responsable de las diferentes estructuras globales observadas (59).

La posibilidad de estas regiones de sufrir un cambio de desordenado-ordenado le confiere a la molécula la ventaja de poder establecer interacciones alternativas con distintas moléculas (60).

Análisis recientes a través de SAXS (*small angle X-ray scattering*) de las isoformas RII α y RII β , mostraron que mientras que el *linker* I de RII α se encuentra poco conservado, el de RII β presenta mayor conservación. Estas diferencias en el *linker* determinan importantes diferencias estructurales y funcionales (62).

III.3. Holoenzima PKA

La PKA fue identificada por primera vez en tejido esquelético de mamíferos (3), desde entonces este modelo de PKA es el más estudiado tanto desde el punto de vista bioquímico como estructural.

Existen cuatro isoformas de holoenzima de PKA que se denominan I α , I β , II α y II β en función de la isoforma de R que acompaña a C. Las propiedades diferenciales de las subunidades R les confieren a las holoenzimas de las que ellas participan propiedades características, tales como diferentes umbrales de activación por cAMP (63), diferente localización celular, ya que las PKAs de tipo I son solubles y las de tipo II particuladas (64-66). Aportan diferentes superficies que participan en la interacción con la subunidad C (67) y también difieren en el requerimiento de ATP para dicha interacción. A diferencia de la PKA de tipo II, la PKA de tipo I requiere ATP-Mg²⁺ para la formación de la holoenzima (68). Otra característica que podría explicar diferencias funcionales importantes entre ambos tipos de holoenzima es el rol del sustrato en el mecanismo de activación de cada una de ellas (ver sección IV) (69).

Las proteínas inhibidoras de la subunidad C deben cumplir dos requisitos: se deben unir a C con alta afinidad y deben inhibir su actividad catalítica. Para la inhibición se requiere de una secuencia semejante al sustrato, pero esta no es suficiente para la alta afinidad de interacción R-C (70). La obtención de las estructuras cristalográficas de los complejos RI-C α y RII-C α , permitió observar que la interacción entre las subunidades R y C de la PKA es multivalente (71), ya que además de la interacción a través del sitio activo de la subunidad C con el sitio de pseudosustrato (IS) (72), existen otros puntos de interacción.

Mediante la resolución de la estructura cristalográfica del heterodímero RI α (91-379)-C, se pudieron identificar puntos de interacción con la subunidad R y una superficie extendida en C (73). Se observó que esa superficie de C es capaz de interactuar con:

- 1) el IS,
- 2) el *linker* II y
- 3) la región helicoidal del dominio A de unión a cAMP
- 4) la α -hélice A y la α -hélice B del CNB-B

Este último punto que participan de la interacción R-C se pudo observar al resolverse la estructura cristalográfica del heterodimero RII α (90-400)-C. Sin embargo, esta interacción sólo es crítica para RII α -C. Esta observación permite resaltar otra diferencia entre ambas holoenzimas: mientras que el complejo RI α -C α requiere de la presencia de Mg²⁺-ATP para una fuerte interacción, el complejo RII α -C α , requiere de la participación del CNB-B (70). En otro trabajo en el que se comparó la interacción RI α -C y RII β -C, también se observó que si bien tanto RI como RII interactúan con C a través de ambos dominios de unión a cAMP, la interacción a través del CNB-B sólo es crítica para la formación del complejo en el caso de la interacción RII β -C (67) (Figura 6).

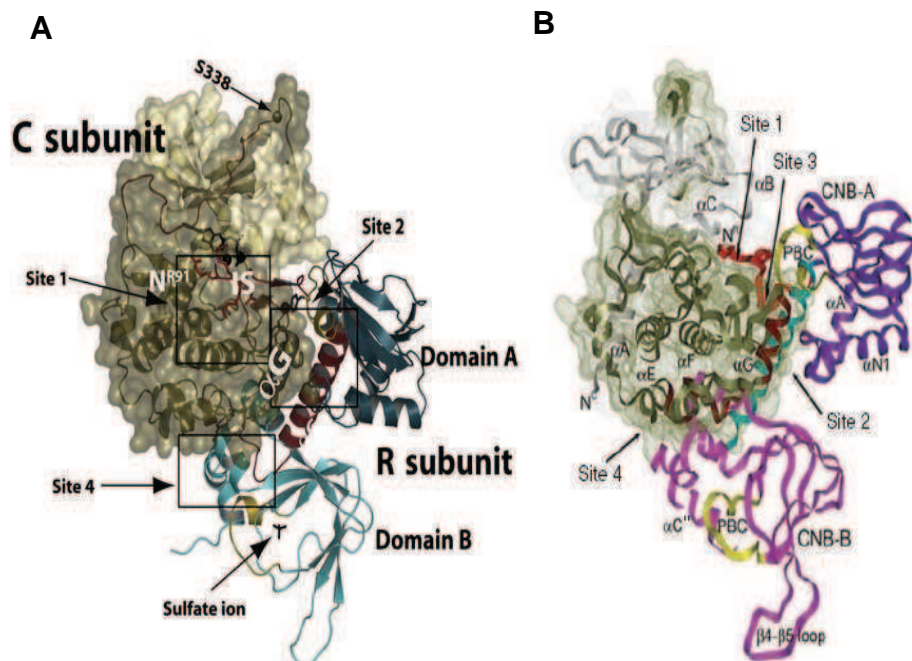


Figura 6- Estructuras cristalográficas. (A) RI α (91-379)-C (74). **(B)** RII β (102-265) (70).

La participación del *linker* I en la interacción R-C también se observó mediante un ensayo de digestión enzimática de la holoenzima. En este trabajo las regiones inmediatas hacia el N-terminal del IS se encontraron protegidas frente a la proteólisis. Esta observación permitió definir una región próxima al sitio activo en la subunidad C capaz de interactuar con la región inmediata N-terminal del IS tanto en RI como en RII, aunque se describieron diferencias específicas de cada isoforma (P-11,P-4) (75). También se observó la participación del *linker* I al resolverse la estructura de la holoenzima correspondiente a una mutante RII β (102-265), donde se demostró que 6 residuos correspondientes al *linker* I interactúan con una hoja β extendida sobre el lóbulo mayor (42).

La diversidad de isoformas es el mecanismo primario para la especificidad en la señalización por PKA.

IV. Mecanismo de activación de la PKA

El mecanismo de activación de PKA no se encuentra completamente dilucidado. El conocimiento minucioso del mismo permitiría comprender como se regula la activación temporal y espacial de una molécula clave en la transducción de señales.

En la holoenzima el cAMP se une primero al CNB-B (12, 76) que se encuentra más accesible y la unión subsecuente al sitio A lleva a la liberación de la subunidad C.

Se cree que la comunicación entre los dominios CNB es clave en el proceso de activación. La subunidad R sufre grandes cambios conformacionales al unirse a la subunidad C (70, 74) que involucran el ordenamiento del *linker* y la reorganización de los subdominios α -helicoidales de los CNBs.

De acuerdo al modelo clásico, la activación de la PKA por cAMP se da a través de la disociación de la holoenzima. Sin embargo, existen evidencias experimentales de la posibilidad de que ocurra una activación sin disociación completa, generándose una holoenzima con actividad (69, 77, 78). Para la holoenzima de tipo I, la disociación completa se alcanza con el agregado del sustrato junto con el cAMP, en cambio para la PKA de tipo II, una proporción de holoenzima permanece intacta aún luego del agregado de cAMP y sustrato (69)(Figura 7).

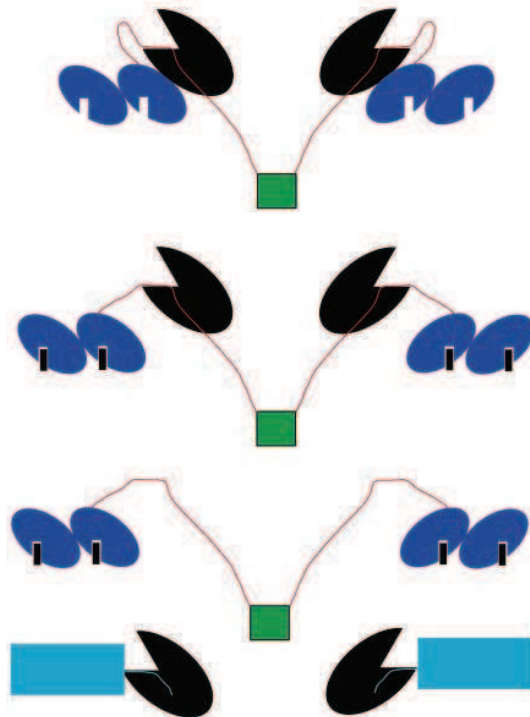


Figura 7- Representación estructural del mecanismo de activación de PKA (69).

A nivel estructural lo que ocurre durante la activación es una transición de una conformación abierta, que es la observada en la apoenzima antes de la unión con los sustratos (79), a una conformación cerrada (19), esencial en el ciclo catalítico. Durante esta transición se produce un reordenamiento de los lóbulos mayor y menor que conduce al acercamiento de los mismos, permitiendo que se abra y se cierre el sitio activo (79).

Otra característica del proceso de activación es que en la PKA al igual que en muchas quinasas, este evento está regulado por la fosforilación de residuos presentes en el segmento de activación. En el caso de la subunidad C de mamíferos se requiere la fosforilación en dos residuos, T197 y S338 (80). Esta fosforilación no parece ser tan importante en *S. cerevisiae*, que si bien posee un análogo de T197 en posición 241, una mutación T241A, no le hace perder la actividad catalítica a la isoforma TPK1, pero sí afecta la afinidad por la subunidad reguladora BCY1 (81).

V. Localización subcelular de la PKA

La PKA se activa como consecuencia de diversos eventos que conducen a la síntesis y al aumento de los niveles intracelulares de cAMP. Una de las grandes preguntas es cómo las numerosas cascadas de señalización paralelas gatilladas por PKA logran activarse en forma específica en el lugar y momento adecuado respondiendo al mismo estímulo.

Se postula que esa especificidad es alcanzada gracias a:

- Los microdominios de cAMP, generados por la adenilato ciclasa (AC) y la degradación del cAMP mediada por las fosfodiesterasas (PDE), que permiten la terminación de la señal.
- La compartimentalización de PKA en diversos sitios específicos de la célula a través del anclaje a proteínas denominadas AKAPs (82).

Los microdominios de cAMP son generados por la AC que sintetiza el cAMP y por las PDE que lo degradan. Con la localización en sitios puntuales de la célula de estas proteínas, se logra la generación de zonas con alta concentración de cAMP (83). Si no existiera esta regulación de los niveles de cAMP, los mismos aumentarían ante un estímulo en forma uniforme en toda la célula, y todos sus efectores tendrían las mismas chances de activarse. Las PDE en particular, son las responsables de la regulación temporal de la señalización por cAMP permitiendo la generación de gradientes del nucleótido (84). De esta manera, los dominios de cAMP se generan con una disposición temporal y espacial discreta en respuesta a un ligando externo (83).

La localización de la PKA en mamíferos está principalmente determinada por proteínas AKAPs, que se unen a los dímeros R_2 . La PKA de tipo I es considerada clásicamente citoplasmática, mientras que la de tipo II es típicamente particulada y restringida a estructuras subcelulares a las cuales está anclada por proteínas AKAPs (64, 66). La mayoría de los miembros de la familia de AKAPs unen la subunidad R del tipo II, conociéndose menos miembros que establezcan interacción con RI. Sin embargo, en los últimos años se han identificado algunas AKAPs que unen preferentemente RI (85), también se conocen AKAPs duales que unen tanto RI como RII (86, 87). Las proteínas AKAPs descritas hasta el momento son de

mamíferos, con excepción de una detectada en *C. elegans* (88) y la proteína Zds1 de *S. cerevisiae* que se demostró que interactúa con BCY1 determinando su localización (89). La subunidad C de la holoenzima PKA colocaliza con los complejos R-AKAPs pero luego de la disociación por cAMP, pueden desplazarse al núcleo (90) (Figura 8).

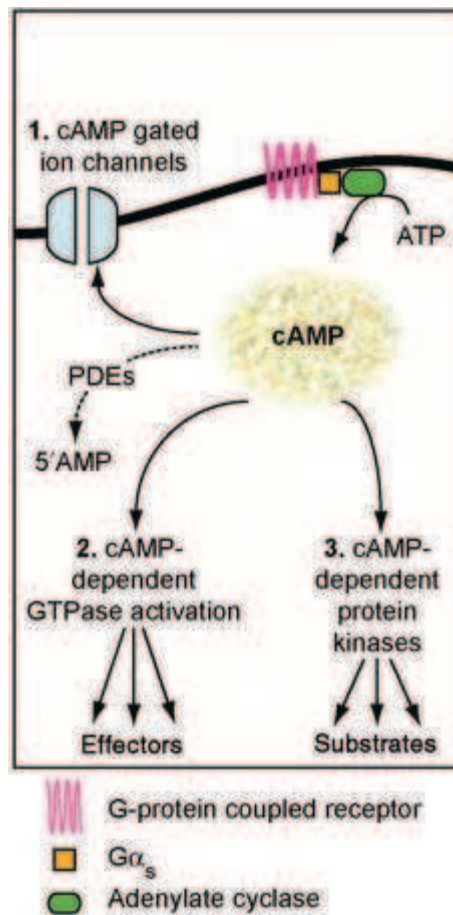


Figura 8- Efectores del cAMP y formación de gradiente del nucleótido (91).

VI. PKA en hongos

La vía de cAMP-PKA es uno de los reguladores claves de la morfogénesis y diferenciación en hongos y de otros procesos como el desarrollo sexual y la virulencia (92, 93).

De la PKA en modelos fúngicos se cuenta con menos información ya que casi todos los estudios bioquímicos y estructurales se conocen a partir del modelo de mamífero. Por este motivo mucha de la información de la que se dispone aún no se

sabe si constituyen características propias del sistema de mamíferos o si son generales de todas las PKAs.

Hasta el momento de realización de esta tesis estaba descrito un solo gen codificante para subunidad R en todos los modelos fúngicos estudiados, pero estaban descritos varios genes para subunidad C en algunos de ellos, como es el caso de *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans*, *Ustilago maydis*, *S. cerevisiae*, *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* (94-101) entre otros. Actualmente con la secuenciación de algunos genomas fúngicos se está profundizando el conocimiento de estos modelos de estudio.

Las subunidades R de hongos se clasifican como un tipo diferente de las tipo I y tipo II de mamíferos según un análisis filogenético que compara el PBC de las secuencias de toda la familia de proteínas que unen nucleótidos cíclicos (55). Si bien las R fúngicas constituyen un grupo aparte, se asemejan a las R de tipo II en que presentan un residuo de serina fosforilable en el IS.

Las subunidades R de hongos comparten la característica de organización modular de las R de mamíferos. En un estudio en el que se analizaron las secuencias de 40 hongos se pudo observar que todas presentaban los dominios CNB, pero sólo 21 presentaban el dominio D/D. Las 19 secuencias que carecían de este dominio correspondían al *subfilum* Pezizomycotina de los Ascomycetes. Otra observación general derivada de este trabajo, es que todas las secuencias fúngicas analizadas presentaban zonas de baja complejidad en la región *linker* y particularmente en el *linker* I (102).

VI.1. PKA de *S. cerevisiae*

S. cerevisiae es un hongo levaduriforme perteneciente al *filum* Ascomycetes, es un modelo muy utilizado en el estudio de transducción de señales. La holoenzima PKA existe como un heterotetrámero que consiste de dos subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas al igual que en mamíferos.

Existen tres genes que codifican para la subunidad C, *tpk1*, *tpk2* y *tpk3*. Las secuencias de las TPKs tienen una identidad de alrededor del 50% con las subunidades C de mamíferos. La identidad entre TPK1 y TPK3 es del 86%, entre TPK2 y TPK1 de 75% y entre TPK2 y TPK3 de 76%. La diversidad está restringida al extremo N-terminal (98). La TPK2 tiene un extremo N-terminal más largo, rico en

glutamina. La anulación de los tres genes de *tpk* es letal, sin embargo la presencia de uno solo de ellos (cualquiera sea) basta para que la célula viva. *In vivo*, TPK3 presenta baja actividad quinasa, debido aparentemente a la baja expresión de la proteína (103).

Existe un único gen que codifica para la subunidad R, *bcy1* (104). La disrupción de este gen no es letal, pero genera sensibilidad al *shock* térmico y a la privación de fuente de nitrógeno (105). La secuencia de BCY1 presenta alrededor de 40% de identidad con las subunidades R de mamíferos. Como todas las subunidades de hongos, BCY1 tiene un IS con una serina autofosforilable y tiene dos sitios de unión a cAMP conservados (106). La secuencia del extremo N-terminal no se parece a la de mamíferos. La región correspondiente a los primeros 124 aminoácidos es necesaria y suficiente para la localización subcelular de BCY1 (107).

Recientemente en nuestro laboratorio se resolvió la estructura cristalográfica de los dominios CNB de la subunidad BCY1 (102). Las regiones de BCY1 que difieren con las estructuras de mamíferos son las mismas regiones en las que difieren RI y RII (39), lo cual indica que la variabilidad está restringida a regiones específicas de la molécula.

En *S. cerevisiae* los niveles de cAMP son regulados por los productos de los genes RAS1 y RAS2, que son efectores positivos de la adenilato ciclasa (Cyr1). Las células no pueden sobrevivir en ausencia de ambos genes RAS, pero mutantes *ras2::LEU2* son viables, aunque crecen muy pobremente en fuentes de carbono no fermentables. Esta cepa posee una disminuida actividad de PKA, debido los bajos niveles de cAMP que posee. Además de la incapacidad de crecer en fuentes de carbono no fermentables, una actividad de PKA disminuida resulta en acumulación de hidratos de carbono de reserva (glucógeno y trealosa), activación de la gluconeogénesis, inducción de varias proteínas de respuesta a estrés y reducción de la transcripción de varios genes relacionados con el crecimiento (108-110).

VI.2. PKA de *Mucor* sp.

Dentro del género *Mucor* la PKA ha sido estudiada particularmente en *M. rouxii* y *M. circinelloides*. Ambos son hongos dimórficos que se desarrollan como levaduras multipolares o como hifas filamentosas, pertenecientes a la clase

Zygomycete, al *subfilum* Mucormycotina. Estos hongos constituyen un modelo particularmente interesante para el estudio de la PKA por las particularidades bioquímicas que presenta la enzima en estos organismos, descritas a continuación, y por verse implicada en el control del dimorfismo del hongo.

Las holoenzimas de *M. circinelloides* y de *M. rouxii* han sido descritas como holoenzimas tetraméricas y hasta el momento como isoforma única (111, 112).

En el año 2002 se clonó el primer gen descrito como el responsable de codificar para la subunidad C de PKA en *M. circinelloides* y se lo llamó *pkaC*. El gen *pkaC* contiene dos intrones putativos en el extremo 5' en las posiciones 1028-1084 y 1308-1370. Este gen codifica para una proteína de 605 residuos de aminoácidos. Esta proteína contiene un dominio de unión a ATP conservado (GQGSVG) y un sitio activo de alta homología con las proteínas serina / treonina quinasas, pero sorprendentemente, carece del residuo de ácido aspártico que es conservado en el sitio activo de las quinasas, el cual se encuentra reemplazado por una asparagina (112).

En *M. rouxii* no se clonó ningún gen que codifique para la subunidad C, pero fue descrito que la actividad quinasa se asemeja a la C de mamíferos en la especificidad del sitio consenso de fosforilación de los sustratos (113).

Junto al gen *pkaC* descrito, se clonó también la secuencia de un gen que codifica para subunidad R de *M. circinelloides* y se lo denominó *pkaR*. Este gen contiene dos intrones, uno en el extremo 5' en posición 203-254 y otro que separa los dos dominios de unión a cAMP en posición 1167-1219. El gen *pkaR* codifica para una proteína de 427 aminoácidos con un peso molecular estimado de 47 kDa. La proteína PKAR presenta un porcentaje de identidad con las subunidades R de otros hongos entre 31% y 45%, y presenta además los dominios modulares bien conservados (112).

En *Mucor rouxii* se ha identificado hasta el momento un sólo gen que codifica para subunidad R. La secuencia de aminoácidos incompleta, ya que carece del extremo N-terminal, presenta en la zona de los dominios de unión a cAMP un 47% de identidad con respecto a las subunidad R bovina y entre 50% y 54% de identidad con las R de otros hongos (114). Los dos sitios de unión a cAMP se pueden diferenciar por sus propiedades cinéticas y especificidad de análogos (76).

Se demostró que esta quinasa tiene la propiedad particular de no disociarse con el simple agregado de cAMP sino que la disociación se logra con el agregado

de cAMP, de NaCl o policationes (115). También se demostró que el grado de activación de la holoenzima depende del sustrato que se utilice (76). Existen dos interpretaciones posibles de esta observación: el sustrato participa en la disociación de la holoenzima, y/o la holoenzima tiene actividad (113). Se ha identificado un complejo ternario R_2C_2cAMP , formado por la holoenzima y dos moléculas de cAMP unidas al sitio B (116).

Al igual que ocurre con las subunidades R de mamíferos y de otros hongos, en *M. rouxii* está descrito que la autofosforilación de la subunidad R promueve la activación de la holoenzima (111, 117, 118).

VII. Morfología y desarrollo de *M. circinelloides*

Como se mencionó anteriormente, la PKA es uno de los reguladores claves de la morfología y el desarrollo en hongos.

VII.1. Ciclo de vida del hongo

M. circinelloides es un hongo generalmente saprófito, dimórfico capaz de crecer tanto como micelio filamentoso aseptado o como levaduras gemantes multipolares (119).

La morfogénesis fúngica es un proceso cíclico, generalmente se toma a las esporas como punto de referencia. Las esporas asexuales de *M. circinelloides* y *M. rouxii* (esporangiosporas) sirven como un mecanismo de dispersión del organismo y se pueden desarrollar como levaduras o como hifas filamentosas dependiendo de las condiciones ambientales. El crecimiento filamentoso ocurre en condiciones aeróbicas, incluso cuando el oxígeno está presente en cantidades mínimas (120). En condiciones ambientales desfavorables los filamentos dan lugar a la formación de artrosporas, produciendo septos que forman dentro de los filamentos cadenas de artrosporas capaces de separarse eventualmente dando lugar, según las condiciones del medio, nuevamente a levaduras o hifas. Las artrosporas sólo se forman a partir de filamentos activos preexistentes cuando las condiciones se vuelven adversas para seguir creciendo de este modo (121). Las esporas resultantes de este ciclo, luego pueden desarrollarse como formas levaduriformes o como hifas filamentosas dependiendo de las condiciones ya mencionadas (Figura 9).

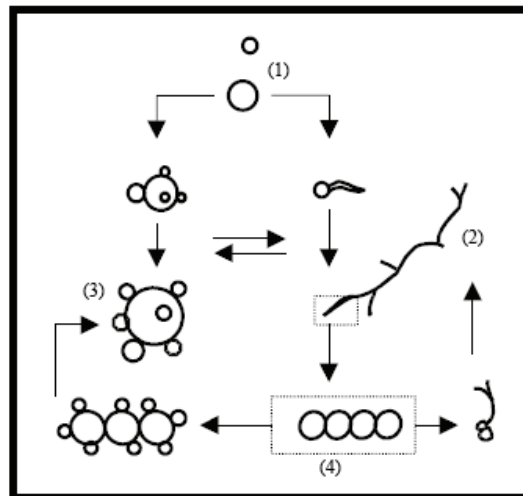


Figura 9- Ciclo de vida de *M. circinelloides* en cultivo líquido (122). (1) Esporas asexuadas, (2) hifas filamentos, (3) levaduras, (4) cadena de artrosporas.

El cambio de condiciones atmosféricas de anaeróbicas a aeróbicas induce a las levaduras a formar filamentos a partir de las células madres o de las gemas maduras. Un cambio en la atmósfera gaseosa en la dirección opuesta genera la gemación de levaduras a partir de los filamentos (123).

VII.2. Esporas asexuales

Se forman en medio sólido en condiciones aeróbicas en la porción terminal de una hifa aérea especializada llamada esporangioforo dentro de un saco llamado esporangio y son característicamente elipsoidales (124) (Figura 10A).

VII.3. Crecimiento filamentoso:

Los hongos filamentosos se definen por su habilidad para formar hifas altamente polarizadas, esto constituye un prerequisite para la colonización eficiente de sus nichos biológicos y para la utilización de sustratos. El establecimiento de la polaridad durante el crecimiento es importante tanto para el surgimiento del tubo germinativo como para las posteriores ramificaciones. Una vez que se estableció la polaridad se debe mantener durante la extensión de la hifa. En el establecimiento y mantenimiento de la polaridad juegan un rol clave elementos estructurales del citoesqueleto, especialmente actina (125).

Luego de sufrir un periodo de crecimiento isotrópico durante el cual las esporas se hinchan y sintetizan moléculas (126), el crecimiento prosigue con un patrón polarizado con el surgimiento de un tubo germinativo y su posterior ramificación. Suelen emerger varios tubos germinativos por espора. Los puntos de ramificación no presentan un patrón claro (127). Las hifas son no septadas (cenocíticas).

Para explicar la morfogénesis de la hifa se plantearon distintos modelos que proponen el cambio en las propiedades físicas de la pared celular (128), la morfogénesis de la hifa por la expansión del citoplasma (129) y el patrón de migración de vesículas (130).

Cultivos crecidos en condiciones aeróbicas en medio rico YPG de *M. circinelloides* sufren primero un crecimiento isodiamétrico durante el cual las esporas se hinchan y sintetizan moléculas (126), a partir de las 1,5 hs comienzan a deformarse indicando el inicio de la emisión del tubo germinativo y se ven como “limones” (Figura 10B), a las 3,5 hs las células poseen brotes más largos (Figura 10C), que luego continúan creciendo y ramificándose (Figura 10D).

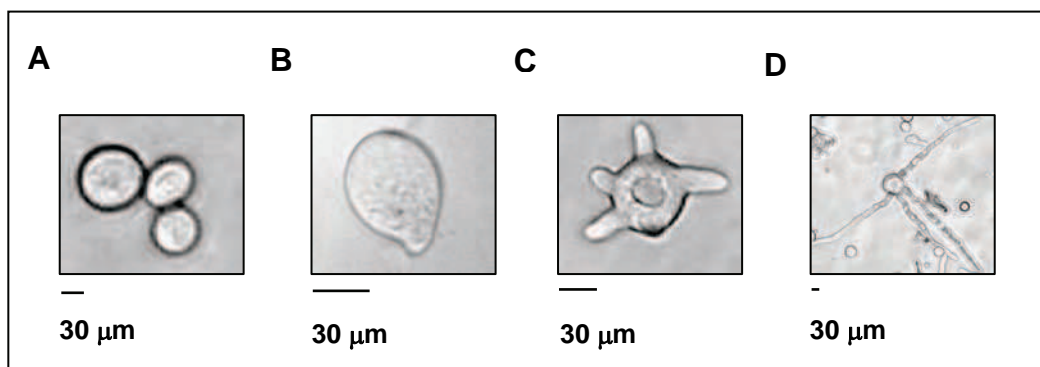


Figura 10- Germinación en aerobiosis. (A) Esporas, **(B)** 2 hs, **(C)** 3,5 hs **(D)** 5,5 hs.

VII.4. Crecimiento levaduriforme y gemación

La fase inicial del desarrollo a partir de la espора es indistinguible del de la hifa, dado que se da un crecimiento isodiamétrico.

Las levaduras son formas esféricas y la célula madre frecuentemente se cubre enteramente de gemas. No existe un patrón obvio de gemación de tal forma que se

pueda predecir donde va a surgir una gema en relación a una preexistente. La célula madre suele producir entre dos y tres brotes por unidad de tiempo que tienen el mismo volumen y sus diámetros se van incrementando a la misma velocidad. Algunas de las gemas van siendo liberadas pero muchas células madres van quedando metabólicamente inactivas mientras están aún cubiertas con gemas altamente activas (127). Se requiere de estricta anaerobiosis para que se produzca y mantenga este tipo de crecimiento (131).

La formación de levaduras a partir de hifas requiere del surgimiento de las formaciones esféricas a partir de los lados y del extremo de la hifa (132).

VII.5. Transición anaerobiosis-aerobiosis

Esporas inoculadas en medio mínimo MMC en anaerobiosis durante una noche, se desarrollan como levaduras multibrotadas (Figura 11A). Si estos cultivos son transferidos a condiciones aeróbicas, a partir de las células madres levaduriformes surgen tubos germinativos comenzando a las 2 hs (Figura 11B) de crecimiento aeróbico, y continúan extendiéndose dando como resultado un cultivo puro de filamentos a las 4 hs (Figura 11C) (123).

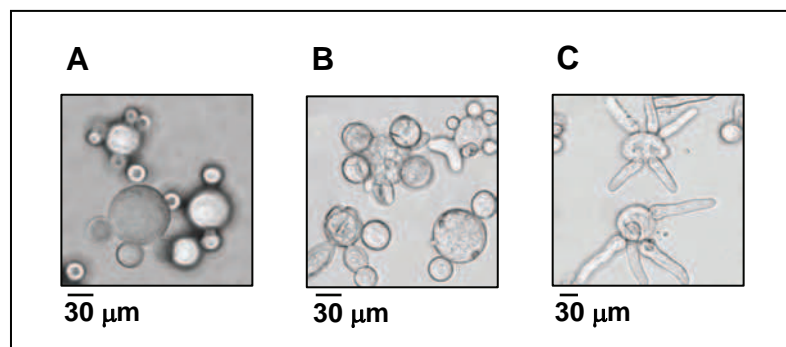


Figura 11- Transición anaerobiosis-aerobiosis. (A) Levaduras, transición anaerobiosis-aerobiosis **(B)** 2 hs **(C)** 4 hs.

VII.6. Distribución de núcleos en micelio y levaduras

En la forma levaduriforme se observan docenas de núcleos en la célula madre,

mientras que en las gemas se observan entre dos y diez núcleos. En las hifas se observa un gran número de núcleos distribuidos al azar y en las artrosporas entre cinco y doce núcleos (127).

VII.7. Formación de artrosporas

La extensión de la hifa no continúa indefinidamente. Cuando se alcanzan unos 8 mm de longitud la extensión y la ramificación se detienen abruptamente. El micelio no se vuelve completamente inactivo pero sufre numerosos cambios estructurales que dan lugar al proceso de formación de artrosporas. Se observa un engrosamiento de la hifa particularmente en los extremos que da lugar a la formación de las típicas cadenas de artrosporas (127). Se ha descrito que este proceso es una respuesta al hambreado (119), se ve favorecido en condiciones de ausencia de fuente de carbono fermentable y de alto inoculo de esporas en medio líquido (121, 131, 133).

VII.8. PKA y la morfología fúngica

Mediante estudios en diferentes hongos incluyendo Ascomycetes y Basidiomycetes se encontró que dos cascadas de transducción de señales ampliamente conservadas regulan el desarrollo y la virulencia en hongos. Una de ellas es la cascada de las MAPK, que regulan respuestas a feromonas; y la otra es la cascada de señalización de PKA que media respuestas frente a nutrientes cobrando particular importancia el rol de la señalización por cAMP en la morfología fúngica (125). La participación del cAMP en el proceso morfogenético de *Mucor* se ha visto tanto en *M. rouxii* como en *M. circinelloides* (119, 134, 135).

En varios Ascomycetes como *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. niger*, *A. nidulans*, y *A. fumigatus* y dos Basidiomycetes como *U. maydis* y *C. neoformans*, existen evidencias genéticas que muestran la participación de PKA en la polaridad celular.

En *S. cerevisiae*, cuando se anula el gen que codifica para la subunidad R se ve alterada la diferenciación a pseudohifa, proceso en el que también se vio que las tres subunidades catalíticas juegan diferentes roles (105, 136).

En *C. albicans* la formación de la hifa es necesaria como mecanismo de patogenicidad, y se demostró que anular el gen que codifica para la subunidad R impide el crecimiento filamentoso (137). Por otra parte, la delección de TPK2 bloquea

la morfogénesis en medio sólido y reduce parcialmente la virulencia. Tanto TPK1 como TPK2 tienen roles en el crecimiento filamentoso en distintos ambientes (99, 100).

En el patógeno de plantas *U. maydis* la forma filamentosa es la patogénica. Mutantes *knockout* para el gen de la subunidad R son incapaces de formar micelio y presentan defectos en la gemación y en la citocinesis (138).

En varias especies de *Aspergillus*, anular los genes que codifican para la subunidad R interrumpe el crecimiento polarizado, mientras que la delección de uno o más genes que codifican para subunidad C indican que la PKA está involucrada en procesos como crecimiento y tolerancia al estrés oxidativo (101, 139-142).

En el patógeno de mamíferos *C. neoformans*, PKA regula fuertemente su virulencia (96).

En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que las esporas de *M. rouxii* crecidas en presencia de análogos de cAMP muestran crecimiento isodiamétrico con interrupción total de la polaridad indicando que PKA está involucrada en ese proceso (134).

El momento en el que se emite el tubo germinativo se correlaciona con el momento en que se alcanza un nivel umbral de actividad específica de PKA. El crecimiento polarizado es el resultado de un proceso regulatorio en el que participa PKA y se debe mantener durante el crecimiento (135).

Esporas inoculadas en medio YPG presentan una disminución de la actividad PKA total inmediatamente después de comenzada la germinación en condiciones aeróbicas, siguiendo a un aumento transiente en los niveles de cAMP. A partir de ese momento la actividad específica de PKA total disminuye en paralelo con el aumento de volumen celular y de la síntesis de proteínas totales. Luego aumentan las subunidades R y C inmediatamente antes de la emisión del tubo germinativo (143).

En *M. circinelloides* está descrito un alto nivel de expresión de *pkaR1* durante el crecimiento anaeróbico levaduriforme y un incremento del mRNA de *pkaR1* durante la transición de crecimiento anaeróbico a crecimiento aeróbico. En el mismo trabajo se indica que la sobreexpresión de *pkaR1* provoca hiperramificación de las colonias crecidas en medio sólido y disminución de la velocidad de extensión de la hifa (112, 127).

VIII. Duplicación génica

La capacidad de evolucionar de un sistema biológico está dada por su habilidad para generar diversidad fenotípica de manera tal que permita a los distintos organismos encontrar nuevas soluciones a los problemas con los que se enfrentan mediante innovaciones evolutivas. Se puede decir, que un sistema tiene esta capacidad, cuando se pueden generar cambios fenotípicos heredables a través de mutaciones no letales. Esta posibilidad está ligada a la robustez mutacional (144).

La robustez mutacional, es una habilidad de los sistemas biológicos para resistir las mutaciones y facilita la innovación evolutiva. Con este término se describe hasta qué punto el fenotipo de un organismo permanece constante a pesar de las mutaciones. Si un organismo presenta una copia extra de un gen, adquirida mediante duplicación génica o genómica, el efecto que puede ocasionar la pérdida de una copia debe ser limitado (145). Un ejemplo de esto, está dado por las frecuentes ocasiones en que un gen *knockout*, no origina un efecto fenotípico (146). Muchas veces la ausencia de efectos observables es responsabilidad de las duplicaciones génicas (144, 147). Por lo tanto, si la robustez es alta, habrá pocas mutaciones capaces de generar efectos deletéreos con un fenotipo desfavorable (144).

Diversos tipos de mutaciones pueden afectar a un genoma, estas incluyen: mutaciones puntuales, inserciones, deleciones y duplicaciones. Dentro de estos, sólo las duplicaciones génicas y genómicas permiten incrementar la robustez mutacional (148).

Existen evidencias de que la duplicación génica ha jugado un rol primordial en la evolución de los genomas eucariotas. El cambio que implica tener una copia de un gen en un genoma a tener dos copias del mismo, es un evento significativo que constituye el primer paso en la formación de una familia génica. Se lo considera el mecanismo más efectivo a través del cual aparece una nueva función y eventualmente contribuye a las diferencias fenotípicas entre especies (149).

Se observó que los genes que se encuentran duplicados en un genoma, toleran más los cambios de nucleótidos que los genes que se encuentran como simples copias, la acumulación de cambios posibilita que las copias puedan diversificarse en función y en ocasiones muy rápidamente (150).

Se encontraron en las secuencias de muchos organismos eucariotas duplicaciones de largos segmentos de DNA (151, 152) y estudios comparativos sugieren que este hecho ha sido un evento continuo durante la evolución (153). Sin embargo, aún no está claro si estas largas regiones duplicadas se produjeron a través de la acumulación de segmentos que fueron duplicados o por duplicación del genoma completo (153, 154). Las retenciones de duplicaciones del genoma completo son muy raras, no obstante en los genomas que lograron establecerse, fueron seguidas de incrementos sustanciales de la complejidad morfológica (145).

El poder de las duplicaciones genómicas para facilitar las innovaciones radica en que no se parte de cero, sino que se perfeccionan las versiones primitivas o los precursores y se explota todo su potencial, por ejemplo quitando restricciones a los genes pleiotrópicos y facilitando su co-opción por funciones especializadas (155, 156). En algunos casos las duplicaciones pueden no ser inmediatamente útiles, sino permanecer como una reserva para ser eventualmente usadas en forma adaptativa o de perfección (157).

Luego del evento de duplicación, una de las copias del gen es libre de degenerar y perderse del genoma sin consecuencias, sin embargo, algunos genes sobreviven adquiriendo diversidad funcional.

Se han propuesto varios modelos mediante los cuales se puede explicar la retención y diversificación en función de las copias génicas. Uno de estos modelos propone que la evolución funcional rápida es responsable de la retención de las copias génicas y esta puede darse debido a:

- 1) La subfuncionalización por la pérdida complementaria de una subfunción en cada parálogo, en este proceso una función ancestral es retenida en un parálogo y otra en otro.
- 2) La neofuncionalización debida a la adquisición de una función nueva en un parálogo.
- 3) La mezcla de ambos procesos mencionados (158).

En la figura 12A se esquematiza la subfuncionalización debida a la pérdida diferencial de regiones regulatorias. Este proceso generalmente involucra la expresión de los parálogos en distintos momentos del desarrollo o en diferentes tejidos del organismo (145). Existen diversos ejemplos de expresión diferencial de genes duplicados, pero como no se conoce el patrón de expresión ancestral es difícil clasificarlos como subfuncionalización o neofuncionalización (159, 160).

Otro modelo que intenta explicar la retención de ambas copias en el genoma propone que la presencia de una segunda copia del gen, permitiría que una mutación letal en una de las copias se vea enmascarada por la presencia del parálogo. Por este motivo los genes esenciales son mantenidos como duplicados. Se han observado ejemplos de este mecanismo en plantas (161) (Figura 12B).

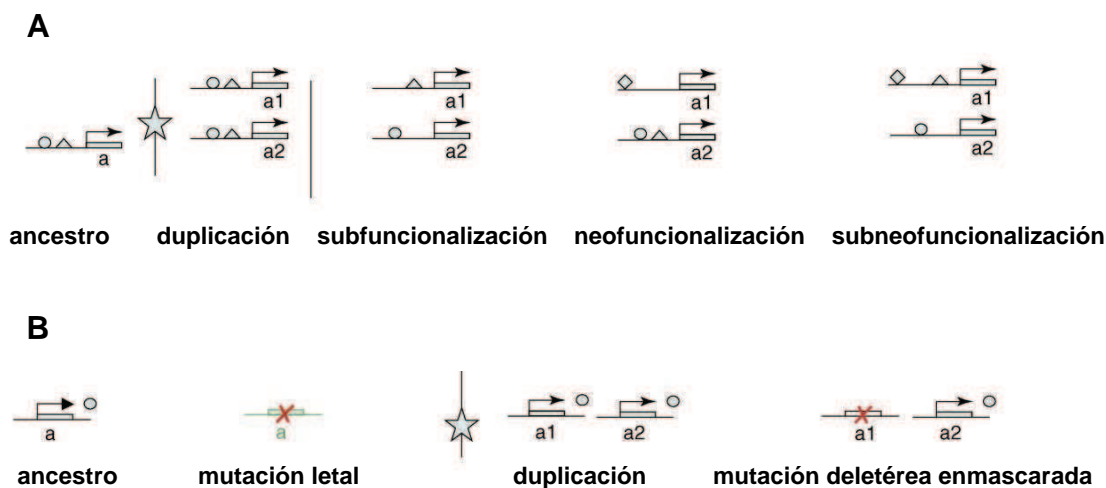


Figura 12- Modelos que permiten explicar la retención de genes duplicados. (A) Evolución funcional rápida. Los triángulos, círculos y rombos representan regiones regulatorias que posibilitan la expresión diferencial consideradas como subfunciones. **(B)** Amortiguación del efecto deletéreo (162).

Estos son solo un par de ejemplos de los diversos modelos propuestos para explicar la retención de las copias génicas. La importancia relativa de los distintos mecanismos debe diferir entre distintos grupos de organismos dependiendo de distintos factores como el tamaño de la población y el modo de reproducción (162).

Uno de los prerequisites para el desarrollo de sistemas más complejos es el incremento en el número de genes reguladores (163). Existen teorías que intentan predecir qué tipo de genes van a conservar sus duplicados. Algunos modelos predicen que los genes preferentemente preservados son aquellos con un gran número de regiones reguladoras en *cys* (164), o los que codifican para proteínas con múltiples dominios (165). Otros proponen que cierto tipo de genes tienen características bioquímicas que les permiten adaptarse más fácilmente a las funciones nuevas, mientras que otro tipo de genes son incapaces de producir funciones nuevas porque las duplicaciones de éstos originan un efecto deletéreo inmediato (166).

En el caso particular del reino hongos, es importante el estudio de sus genomas, ya que sirven como organismos modelos de todos los eucariotas. La fisiología celular y la genética fúngica comparten componentes claves con animales y plantas que incluyen la multicelularidad, los componentes del citoesqueleto, el desarrollo y la diferenciación, la reproducción sexual, el ciclo celular, las señalización intracelular, el ritmo circadiano, la metilación del DNA, la modificación de la cromatina y el origen común de los genes necesarios para realizar estas funciones fundamentales (167).

Existen cuatro grupos mayoritarios de organismos fúngicos Ascomycetes, Basidiomycetes, Zygomycetes y Chitridiomycetes. La comparación de múltiples secuencias genómicas fúngicas permitió observar lo divergentes que son los hongos a ese nivel (168), incluso entre miembros del mismo género (167). Se pueden observar numerosos microarreglos génicos que incluyen pequeñas inversiones, translocaciones, inserciones, deleciones y duplicaciones. Se demostró que en particular las duplicaciones y las translocaciones constituyen una respuesta común en levaduras sometidas a evolución experimental y por lo tanto se piensa que estos mecanismos contribuyen a la evolución en largos periodos de tiempo que sufren los genomas fúngicos (169).

En *S. cerevisiae* está demostrado que ocurrió duplicación del genoma completo "WGD" (151), pero en la rama de los Zygomycetes, si bien la duplicación génica es muy frecuente (170-172), no se demostró que haya ocurrido duplicación del genoma completo.

El estudio de los genomas eucariotas en general y de los fúngicos en particular, permitió observar que son muy dinámicos y en muchos casos permitió conectar los eventos evolutivos del genoma con aspectos fisiológicos específicos. Las duplicaciones génicas que son mantenidas en estos genomas probablemente lograron establecerse bajo condiciones específicas, pero una vez establecidas deben haber tenido un impacto pronunciado en la diversificación de las especies y haber conducido a un incremento en la complejidad biológica y en las novedades evolutivas (145).

Se puede resumir que, la duplicación génica conduce a la robustez y que ésta permite la diversificación molecular y morfológica de los organismos. Para que luego puedan generarse cambios evolutivos complejos, se requiere de la selección natural de las variaciones adecuadas (144).

Darwin propuso que incluso los caracteres nuevos creados por la evolución contienen marcas de sus ancestros, y que los numerosos cambios sucesivos debido a duplicaciones génicas, son sólo piezas de la historia de la adaptación de un organismo a su medio ambiente (173).

IX. Ubiquitinación

La ubiquitinación es un mecanismo que permite regular aspectos fisiológicos de la célula. Es una modificación post -traduccional reversible, en la que se adiciona una molécula de ubiquitina (Ub) al grupo ϵ de lisinas de las proteínas blanco, aunque menos frecuentemente puede modificarse el extremo N-terminal o un residuo de cisteína.

La Ub es un polipéptido de 76 aminoácidos cuya secuencia está muy conservada en todos los eucariotas. La conjugación de la ubiquitina ocurre a través de una serie de pasos secuenciales catalizados enzimáticamente.

Primero, actúa una proteína activadora (E1) que se une a la ubiquitina a través de una unión tiolester dependiente de ATP, luego, es transferida a una enzima conjugadora (E2) como un tiolester, y finalmente, es unida a la lisina de una proteína blanco por una ligasa (E3) (174) (Figura 13).

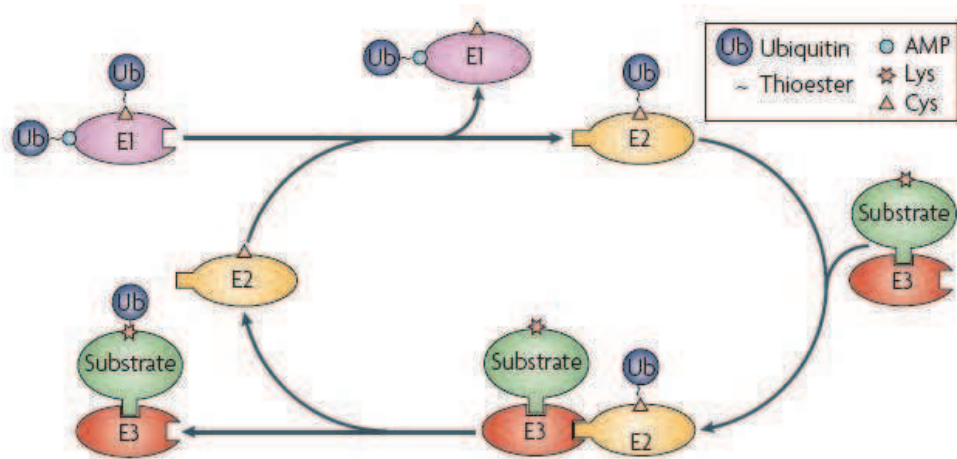


Figura 13- Esquema del proceso de ubiquitinación (175).

Habitualmente hay una única E1, varias E2 y múltiples E3. La unión a la lisina de la proteína blanco ocurre a través de la glicina C-terminal de la ubiquitina y se unen a proteínas sustratos que tienen una señal de reconocimiento específica o en algunos casos a través de una proteína adaptadora (176).

La naturaleza química de la ubiquitina le permite interactuar con otras proteínas y formar cadenas de conformaciones diversas, lo que la convierte en una modificación muy versátil y sirve como una señal que puede direccionar proteínas y es utilizada en numerosos procesos celulares.

Hoy se sabe que existen diversas formas de ubiquitinación:

- 1) Monoubiquitinación, dada por la unión de una molécula de ubiquitina a un residuo de lisina de la proteína blanco.
- 2) Multiubiquitinación, cuando varios residuos de lisina de la proteína blanco unen una molécula única de ubiquitina.
- 3) Poliubiquitinación, cuando se une a una lisina de la molécula blanco una cadena de ubiquitinas.

La monoubiquitinación y la multiubiquitinación de proteínas se vieron relacionadas a procesos que median la endocitosis (177). También se vieron implicadas en la modificación de la localización de las proteínas, en la modulación de la actividad proteica y la capacidad de interactuar con otras proteínas, ya sea reclutando interactores o inhibiendo interacciones (178, 179). En particular, en proteínas que tienen dominios de unión a ubiquitina, se observó que sufren monoubiquitinación y esta modificación posibilita cambios conformacionales que alteran su capacidad de interactuar con otras proteínas (180, 181) (Figura 14).

La poliubiquitinación puede variar dependiendo del tipo de unión entre las ubiquitinas que forman la cadena. Existen siete tipos diferentes de uniones, porque hay siete lisinas en la molécula de ubiquitina que pueden actuar como sitio aceptor de otra ubiquitina en el ensamblado para formar las cadenas. Dependiendo del tipo de conexión que se establece entre las ubiquitinas que forman la cadena, éstas pueden diferir en estructura y función.

El rol de las cadenas de poliubiquitina con algunos tipos de enlace, está bien caracterizado. La unión vía K48 generalmente media degradación vía proteosoma (174, 176, 182). Sin embargo, en levaduras gemantes, la poliubiquitinación K48 del factor de transcripción Met4p reprime su actividad sin conducirlo a la degradación (183). Otra unión involucrada en la degradación vía proteosoma es K11 (175).

Una vez que la proteína ha sido degradada, la cadena de poliubiquitina es desensamblada por la acción de una serie de proteasas llamadas enzimas deubiquitinantes (184, 185).

Otra unión bien caracterizada de las cadenas de poliubiquitina, es a través de K63, que tiene un rol en la tolerancia frente a daños en el DNA, en la respuesta inflamatoria, en la vía endocítica y en la síntesis de proteínas ribosomales (186).

Las cadenas de tipo K6 o K29, fueron detectadas *in vitro* e *in vivo* pero sus sustratos están pobremente definidos. Las cadenas en forma de horquilla, se forman por la unión de dos moléculas de ubiquitina a dos residuos de lisina de una ubiquitina que se encuentra unida a un sustrato, pero su función celular aún no fue establecida (175) (Figura 14).

Muchas veces se requiere de modificaciones previas a la ubiquitinación para que este sistema reconozca a la proteína blanco (187-189). Un ejemplo de esto es que la PKA, regula la degradación mediada por proteosoma dependiente de ubiquitina del receptor coactivador nuclear GRIP1, si bien no se demostró su fosforilación, se vio que el aumento de los niveles de cAMP o la sobreexpresión de $C\alpha$ aceleran el recambio vía proteosoma de esta proteína (190).

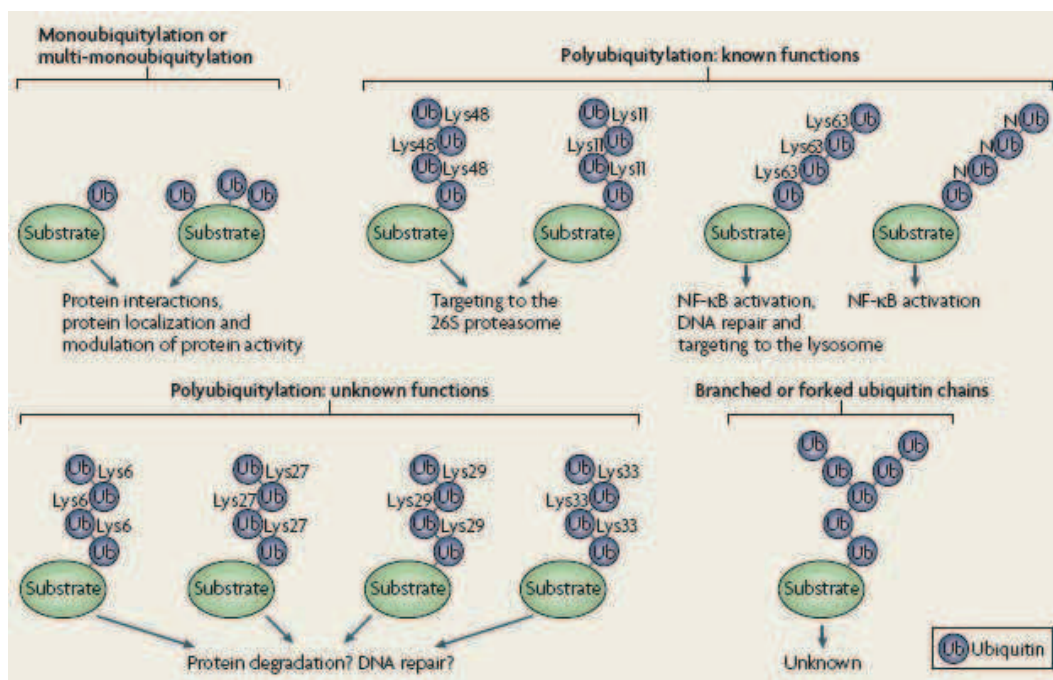


Figura 14- El código de ubiquitina (175).

A través de su versatilidad la ubiquitina se encuentra implicada en la regulación de diversos procesos. Cumpliendo un papel preponderante en la división celular, la diferenciación, el tráfico de proteínas y la transducción de señales.

Como se mencionó previamente, las proteínas quinasas son reguladores importantes de las vías de transducción de señales, por lo que sus funciones se encuentran finamente moduladas. De esta manera, son capaces de mediar sus funciones celulares y respuestas fisiológicas (191). Una vez que una proteína quinasa es activada existen diversos mecanismos para apagar su actividad y en muchos casos su propia activación inicia su *down regulation* mediante la activación de la vía de degradación ubiquitina / proteosoma (192) aunque también se describió apagado de la actividad quinasa mediado por ubiquitina pero independiente de la degradación (193).

Ejemplos de estos procesos son la proteína quinasa C (194, 195) y la proteína quinasa ribosomal S6 (196) que pertenecen a las AGC quinasas, y la quinasa SGK-1 (197). Estas quinasas son reguladas mediante degradación dependiente de ubiquitinación tras la activación de sus vías de acción. Por otra parte, en el caso de Calmodulina, se observó que su ubiquitinación modula su actividad y reduce la activación de sus quinasas blanco, pero no conduce a la degradación a Calmodulina (193).

La importancia de la ubiquitinación en la transducción de señales está dada porque proporciona un mecanismo que permite acoplar la activación con el apagado, permitiendo una regulación temporal precisa de la señalización limitando la vida media de los componentes activos de una vía.

X. Pseudoquinasas

Dentro de la gran familia de proteínas quinasas existe un grupo que se denomina pseudoquinasas o quinasas “*dead*” por carecer de uno o más de los residuos esenciales para su actividad catalítica (198, 199). Se las consideró vestigios remanentes de quinasas activas que han sido relegadas a funciones de andamiaje (200). No obstante, están cobrando importancia no sólo por la relevancia de sus funciones estructurales, sino por ser reguladores de varias vías de transducción de señales (199). La mayoría de las pseudoquinasas descritas son de humanos, pero también se han descrito en protozoos (201).

Por análisis de secuencia se observa que los residuos que están más frecuentemente alterados en las pseudoquinasas están presentes en al menos uno de tres dominios esenciales para la catálisis. Estos dominios son:

- 1) **VAIK**, en el subdominio II del dominio quinasa, dentro del cual el residuo lisina es importante para el anclaje y orientación del ATP;
- 2) **HRD**, motivo del subdominio VIB, donde el ácido aspártico funciona como residuo catalítico actuando como base aceptora en la transferencia de un protón.
- 3) **DFG**, en el subdominio VII, donde el ácido aspártico se une al Mg^{2+} que coordina la unión del ATP a través de los fosfatos α y γ .

Sin embargo, se encontraron algunas quinastas que inicialmente fueron definidas como inactivas, por carecer de residuos conservados en la secuencia primaria, que conservaban actividad catalítica a pesar de esas alteraciones.

Kinase	G-Loop	G-Loop Status	β 3	hrD	DFG	Notes
Unconventional Active Kinases						
CASK	GKGPFS	I	FAVK	HRD	QFG	Active, compensation for missing DfG is unknown (Mukherjee et al., 2008)
WNK1	GRGSFK	P	VAWQ	HRD	DLG	Active, K in G-loop compensates for missing K in β 3 (Min et al., 2004)
Titin	GRGEFG	I	YMAK	HFD	EFG	Active, structure shows that E of EFG functionally replaces D (Mayans et al., 1998)
Selected Pseudokinases						
VRK3	IRDNQG	D	FSLK	HGN	QFG	Experimentally inactive (Nichols and Traktman, 2004), cannot bind ATP
HSER (GC-C)	BRDTIQ ^a	D	VILK	HGR	DFG	Binds ATP despite highly degraded G-loop motif, experimentally inactive (Jaleel et al., 2006)
STRAD (STLK5)	GKGFED	P	VTVR	HRS	QLR	Binds ATP despite moderate degradation in G-loop and substitution in β 3, experimentally inactive (Boudeau et al., 2004)
ILK	NENHSG	D	IVVK	RHA	DVK	Experimentally inactive (Boudeau et al., 2006)
EphB6	GTGSFG	I	VAIQ	HRS	RLG	Experimentally inactive (Gurniak and Berg, 1996)
HER3 (ErbB3)	GSQVFG	I	VQJK	HRN	DFG	Experimentally inactive, reversion of HRN to HRD fails to reactivate (Prigent and Gullick, 1994)
Pseudokinases with Moderate Deficits						
RYK	QEGTFG	P	AEVK	HKD	DNA	Experimentally inactive, reversion of DNA to DFG reactivates (Katso et al., 1999)
KSR1	GQGRWG	I	VAIR	HKD	DFG	Experimentally inactive (Kolch, 2005; Morrison, 2001)
KSR2	GKGRFG	I	VAIR	HKD	DFG	Experimentally inactive (Kolch, 2005; Morrison, 2001)
CCK4	GKSEFG	P	VLVK	HKD	ALG	Experimentally inactive, repair of altered DfG motif in <i>Hydra</i> ortholog fails to reactivate (Kroiher et al., 2001)
SuRTK106	CSGSCG	P	VILK	HGD	QLG	
IRAK3 (IRAK-M)	GEGEIF	P	YAVK	CGS	DFA	Experimentally inactive (Wesche et al., 1999)
JAK1 Dom2	GRGTRT	P	VILK	HGN	DPG	
JAK2 Dom2	GQGTFI	P	VLLK	HGN	DPG	
JAK3 Dom2	GHGSFI	P	VLLK	HGN	DPG	
TYK2 Dom2	GQGTRT	P	VVLK	HGN	DPG	
SgK071	NPGALG	P	HVIK	HRN	DLS	
PSKH2	GTGSFS	I	FAIK	HRN	DFG	

Tabla 1- Quinastas poco usuales y pseudoquinasas (202).

Ejemplos de esto son las quinasas Wnk, CASK e IRAK2. En el caso de Wnk la lisina ausente en el motivo VAIK es sustituida por una lisina del subdominio I (203). Un hallazgo atípico publicado recientemente es el de la quinasa CASK, que carece del ácido aspártico del motivo DFG que coordina al Mg^{2+} , pero es capaz funcionar independientemente de este ión (204), más aún la presencia de Mg^{2+} inhibe su actividad. En el caso de IRAK2 a pesar de carecer tanto del ácido aspártico del motivo DFG como del motivo HRD, recientemente se le demostró actividad catalítica (205), no obstante, no está descrito el mecanismo por el cual logra reemplazar la función de esos residuos conservados que carece.

En la tabla 1 se resumen ejemplos de quinasas poco usuales, de pseudoquinasas y de los motivos claves alterados en cada una de ellas.

Dado que en los últimos años se pudo dilucidar la estructura de muchas proteínas quinasa, esto permitió realizar estudios en profundidad de la relación entre estructura, función y regulación de las mismas como así también conocer más acerca de la evolución de estas proteínas complejas. De esta forma se pudieron apreciar no sólo de las propiedades catalíticas de las proteínas quinasas, sino también de la relevancia de su rol en el andamiaje de complejos multiproteicos. El plegamiento único de las proteínas quinasas no sólo evolucionó para permitir el posicionamiento de residuos claves para la unión de ATP y la transferencia de fosfato, sino también para exponer superficies químicamente diversas que sirvan como sitios de unión con otras moléculas. Dentro de las pseudoquinasas con función conocida se incluyen:

- 1) Coreceptores que interactúan con receptores tirosina quinasa, como HER3, EphB6, EphA10, CCK4. Son similares a los receptores con actividad tirosina quinasa, pero presentan alguna sustitución en los residuos claves para la actividad. De las dos primeras mencionadas está bien descrito que tras la interacción con el ligando son capaces de interactuar con verdaderas tirosinas quinasas activándolas (206-208).
- 2) Reguladores de un segundo dominio quinasa dentro de la misma proteína, tal es el caso de JAKs y GCN2. Dentro de las isofromas JAK1, JAK2 y JAK3 existe un dominio con actividad tirosina quinasa y otro pseudoquinasa que regula directamente al dominio con actividad (209, 210), un mecanismo similar existe en GCN2 (211).

3) Andamiaje, como en el caso de STRAD, ILK, KSR, TRRAP, Trb3. STRAD, por ejemplo, participa de la formación de un complejo con MO25 que permiten la activación de LKB1 (212). En el caso de KSR1 y KSR2, interactúan con las proteínas quinasas Raf, ERK y MEK para formar un complejo regulatorio localizado en la membrana que coordina la propagación de la señal a través de la vía de ERK (213, 214).

Recientemente se resolvió la primera estructura cristalográfica de una pseudoquinasa, VRK3 y se la comparó con la de una quinasa activa relacionada VRK2. De este análisis se pudo observar que la pérdida de función catalítica de VRK3 está relacionada a la imposibilidad de unir ATP y que la molécula tiene un patrón invertido de conservación de secuencia, mientras que está pobremente conservada la correspondiente al sitio activo, existe una alta conservación de secuencia en regiones correspondientes a porciones superficiales de la molécula sugiriendo que la conservación evolutiva de esta molécula puede estar dada por su rol en la interacción con otras (202).

Uno de los mayores cuestionamientos es cómo determinar cuándo una putativa pseudoquinasa es verdaderamente inactiva. Hoy existe el consenso de que se puede inferir esta respuesta analizando la estructura de la proteína en conjunto con la secuencia primaria para comprender la relevancia funcional de los cambios evolutivos. Por lo tanto, para entender la importancia funcional de las pseudoquinasas es importante contar con las estructuras y para poder interpretar adecuadamente la variabilidad en la secuencias también es esencial identificar sus interactores (215).

OBJETIVOS GENERALES

OBJETIVOS GENERALES:

El prototipo de proteína quinasa A es la PKA de mamíferos de la cual se dispone de mucha información bioquímica y estructural, sin embargo es importante profundizar el conocimiento de PKAs provenientes de modelos diferentes a las de mamíferos ya que esto posibilitará generar conceptos más generales sobre estas proteínas.

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar bioquímicamente la PKA en el hongo *Mucor circinelloides* y determinar su rol en el desarrollo y diferenciación del hongo para avanzar en el entendimiento del mecanismo de activación de la PKA. Hemos elegido este hongo filamentoso como modelo de estudio dado que, como se ha mencionado en la introducción, la PKA de *Mucor* presenta la peculiaridad de poseer una afinidad de interacción entre las subunidades regulatoria (R) y catalítica (C) mayor que la observada en levaduras y eucariotas superiores, característica que la hace particularmente diferente al prototipo de proteínas quinasas que es la PKA de mamíferos.

Los miembros del género *Mucor* son hongos dimórficos y en nuestro laboratorio se ha estudiado la relación existente entre la vía de señalización por PKA y la morfología fúngica estableciéndose un rol esencial de la quinasa en este proceso.

Como hemos mencionado en la introducción la subunidad R presenta una estructura de dominios bien definida. Entre el dominio de dimerización y anclaje (D/D) en el extremo N-terminal y los dominios de unión de cAMP, hay una zona denominada bisagra que incluye el sitio inhibitorio o de pseudosustrato (IS). A ambos lados del IS se definen el *linker* I y *linker* II. Dada la alta variabilidad del *linker* I, fue de nuestro interés analizar la participación del mismo en la interacción R-C. Mediante un análisis de comparación de secuencias de aminoácidos de la región *linker* I de subunidades R de distintos organismos pudimos observar la existencia de residuos ácidos presentes en mayor número y dispuestos en forma agrupada en la subunidad R de *Mucor*. Estudiamos, entonces si esta región participa en la interacción con la subunidad C y si es responsable de la diferencia de afinidad en la interacción R-C en *M. circinelloides*.

Si bien en nuestro laboratorio hemos demostrado que el cAMP y la PKA están involucrados en determinar la morfología en *M. rouxii* y *M. circinelloides*, con

el objetivo de evaluar en detalle y mediante abordajes genético-moleculares el rol que cumple la PKA en la diferenciación, el desarrollo y la morfología de *M. circinelloides*, nos propusimos generar una cepa mutante que tuviera anulado el gen que codifica para la subunidad R (*pkaR*). La construcción de la mutante junto con la finalización del proyecto genoma de *M. circinelloides* nos permitieron identificar tres genes adicionales que codifican para proteínas con homología con PKAR. Estos resultados plantearon una nueva situación, similar a la observada en mamíferos donde existen isoformas de subunidad R y C, que nos hizo abordar un nuevo objetivo de estudio que fue el análisis de la expresión y participación de estas isoformas en la morfología, desarrollo y diferenciación de *M. circinelloides*.

Del el análisis de la expresión de los genes *pkaR* se observó la existencia de subunidades R de *M. circinelloides* con un PM aparente mucho mayor que el predicho por la secuencia de aminoácidos. Nos planteamos entonces la posibilidad de que algunas de las subunidades R pudiera sufrir alguna modificación post-traducciona.

Finalmente, así como demostramos la existencia de isoformas de subunidad R, en nuestro laboratorio se demostró la existencia de múltiples genes a partir de los cuales se expresan isoformas de subunidad C. Una de ellas presenta características muy peculiares dado que carece de residuos claves presentes en el centro catalítico necesarios para la actividad quinasa. Nos planteamos la posibilidad de que sea una pseudoquinasa catalíticamente inactiva y comenzamos entonces los estudios bioquímicos que permitan definirla como este tipo quinasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Cepas utilizadas

I.1. Cepas de *M. circinelloides*

Cepa de <i>M. circinelloides</i>	Auxotrofia	Cita	Cepa Original	plásmido	Medio de cultivo
Mu402	<i>leu⁻ pyrG⁻</i>	(216)			YPG+uridina (200 µg/ml)
KFA89		(112)	R7B	pEUKA2	YNB
R7B (ATCC0680)	<i>leu⁻</i>	(217)	f. <i>lusitanicus</i> CBS277.49		MMC
ΔR1		(218)			MMC
ΔR1+ R1		(218)	ΔR1	pEUKA4R (contiene el cDNA de <i>pkaR1</i> bajo el promotor <i>gpd1</i>)	YNB
ΔR1+ pLeu4			ΔR1	pLeu4 (contiene el marcador de selección <i>leuA</i>)	YNB
ΔR1+JO9			ΔR1	JO9 (contiene el cDNA de <i>pkaR1</i> bajo su propio promotor)	YNB
ΔR2					YNB

Tabla 2- Cepas de *M. circinelloides* utilizadas

I.2. Cepas de *S. cerevisiae*

Cepa de levaduras	genotipo	Nomenclatura	Cita	Medio de cultivo
S13-3A	<i>Matα his3 leu2 ura3 trp1 ade8 tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 bcy1::LEU2</i>	TPK1bcy1 Δ	(219)	YPD
S18-1D	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 ade8 tpk1^{w1} tpk2::HIS3 tpk3::TRP1</i>	tpk ^{1w} (tw)	(220)	YPD
RS13-58A-1	<i>Matα his3 leu2 ura3 trp1 ade8 tpk^{1w}, tpk2::HIS3 tpk3::TRP1, bcy1::LEU2</i>	tpk ^{1w} bcy1 Δ (twb Δ)	(219)	YPD
KT1115	<i>MATα leu2 ura3 his3 pep4Δ</i>	1115	(221)	YPD

Tabla 3- Cepas de levadura utilizadas

II. Preparación de esporas.

Se parte de un *stock* de esporas a partir de las cuales se crece el hongo en medio sólido. El medio que se utiliza depende de la auxotrofia de la cepa y se prepara a pH 4.5 ya que favorece la esporulación. Se incuba a 30°C en oscuridad hasta la esporulación (en general unos 6 días). Las esporas se cosechan agregando H₂O estéril al cultivo, despegando mecánicamente las esporas del micelio con una varilla de vidrio y recogiendo el H₂O con las esporas. Luego se centrifuga la suspensión, se lava con H₂O estéril por centrifugación y decantación, hasta que el sobrenadante esté limpio. El *stock* de espora se cuantifica al microscopio óptico con una cámara de Neubauer y se guardan a 4°C hasta su utilización.

III. Construcción de proteínas mutantes R1 y R2

Las mutantes de la subunidad R (PKAR1) de *M. circinelloides* se obtuvieron mediante PCR usando como *primers* oligonucleótidos complementarios a distintas

regiones de PKAR1 y usando como templado el plásmido pYES-R, plásmido pYES2 (Invitrogen, figura 15) que contiene la secuencia de cDNA de PKAR1. La subunidad mutante R1 carece de los residuos N-terminales (1-127) y la mutante R2 carece de los residuos ácidos (110-125). Para generar la mutante R1 los *primers* usados fueron B1 y B2 que hibridan con la secuencia de PKAR1 que corresponde a los aminoácidos 128-134 (B1) y 421-427 (B2). El producto de PCR de 900 pb se clonó en los sitios *Hind* III-*EcoR* I del pYES. Para la mutante R2 se usaron dos *primers* B3 y B4 para dos reacciones de extensión del *primer* pre-PCR a partir del pYES-R. Las reacciones después se mezclaron y se usaron como templado para la PCR usando B5 y B6. El producto de PCR de 720 pb se clonó en los sitios *Hind* III-*BstE* II del pYES. Las construcciones se verificaron mediante secuenciación de DNA. Los plásmidos se denominaron pYES-R1 y pYES-R2 respectivamente. Las secuencias de los *primers* se indican en la tabla 5, en la sección XXIV.

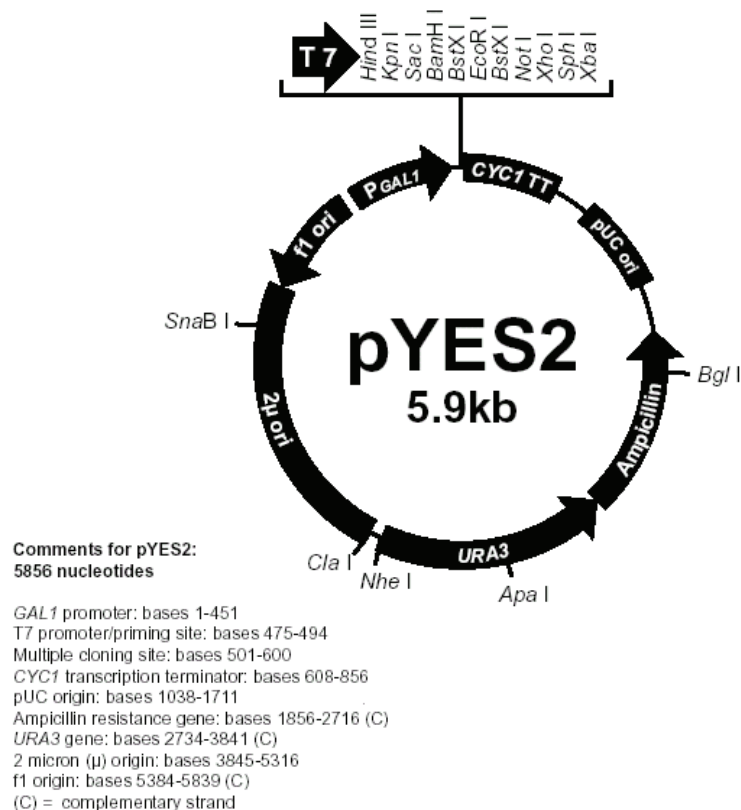


Figura 15- Vector pYES (Invitrogen)

IV. Expresión y purificación de proteínas en levadura

IV.1. Expresión y purificación de las subunidades Rwt, R1, R2 y BCY1

Las proteínas Rwt (PKAR1) y las mutantes R1 y R2 de *M. circinelloides* fueron expresadas en la cepa TPK1bcy1 Δ de *S. cerevisiae* transformada por el método de acetato de litio (222) con los plásmidos pYES-R, pYES-R1 o pYES-R2 respectivamente. Para la expresión de proteínas las cepas fueron crecidas en medio mínimo YNB *ura*⁻ en presencia de glucosa durante una noche y luego pasados a medio rico YPgal durante 16 horas a 30°C en agitación a 150 r.p.m. La cepa TPK1bcy1 Δ (Tabla 3) lleva una delección que elimina la expresión del gen *bcy1* endógeno.

Para la purificación de BCY1 se cultivó en medio líquido YPgal la cepa de *S. cerevisiae* 1115/BCY1 (1115 transformada con el plásmido pYEP51-BCY) (Tabla 3), durante 16 horas a 30°C en agitación a 150 r.p.m.

Para verificar la expresión de las proteínas de las distintas cepas se preparó extracto crudo usando perlas de vidrio de 0,5 nm y buffer A (ver soluciones, sección XXIII). Se analizaron los extractos crudos por *Western blot* y se revelaron con anticuerpo policlonal anti-R de *M. rouxii*, anticuerpo policlonal preparado en nuestro laboratorio (111).

Los extractos crudos se fraccionaron por gradientes de sacarosa y las fracciones de mayor actividad de unión a cAMP se juntaron y liofilizaron.

IV.2. Expresión y purificación de la subunidad C de *M. circinelloides* en levaduras

Se subclonó en el plásmido pESC-ura (Stratagen, figura 16) la secuencia del cDNA del gen *pkaC* de *M. circinelloides* (pESC-ura-C). La proteína PKAC fue expresada como proteína de fusión con el epítopo c-Myc en las cepas *tpk*^{1w} y *tpk*^{1w}bcy1 Δ (Tabla 3) de *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido pESCura-C. Para la expresión de proteínas las cepas fueron crecidas en medio mínimo YNB *ura*⁻ en presencia de glucosa durante una noche y luego crecidas en medio YPgal durante 16 horas a 30°C en agitación a 150 r.p.m. La expresión de la proteína se verificó mediante preparación de extracto crudo y *Western blot* revelado con anticuerpo anti-cMyc (COVANCE).

mediante purificación por cromatografía de afinidad utilizando resina 8-AHA-cAMP-agarosa como fue descrito previamente (111). Se juntaron las fracciones con mayor actividad de fosfotransferencia y se ensayó en el día.

VII. Purificación de subunidades R de *M. circinelloides*

Se cultivaron las cepas de *M. circinelloides* R7B, Δ R1, Δ R1 + R1 y Δ R2 (Tabla 2) en distintas condiciones:

- a) en medio YPG pH 4,5 (10^6 esporas/ml) durante 4 o 4,30 hs hasta emisión de tubo germinativo,
- b) en medio MMC (10^5 esporas/ml) en anaerobiosis toda la noche y
- c) en medio MMC (10^5 esporas/ml) en anaerobiosis toda la noche y transferidos a condiciones aeróbicas durante 4 hs.

En todos los casos se crecieron a 30°C en agitación a 150 r.p.m. Se realizaron extractos crudos de los cultivos y se sembraron en resina 8-AHA-cAMP-agarosa. Luego de lavado exhaustivo con en buffer A adicionado de 0.5M NaCl, se agregó buffer de siembra.

VIII. Preparación de la holoenzima de PKA de *M. circinelloides*.

Las cepas R7B, Δ R1, KFA89 y Δ R2 (Tabla 2) se cultivaron en medio líquido YPG pH 4,5 con un inóculo de 10^6 esporas/ml en aerobiosis durante 4 hs hasta la emisión del tubo germinativo, o en medio MMC con un inóculo de 10^5 esporas/ml durante una noche en condiciones de anaerobiosis y luego de la transición a condiciones aeróbicas. La holoenzima se preparó como se describe en (76) mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando resina de DEAE-celulosa. Después de lavar con buffer A, se realizó la elución con buffer A adicionado de 0.35M NaCl. Las semipurificaciones fueron empleadas en el momento de la preparación.

IX. Ensayo de unión a cAMP

El ensayo de unión a cAMP se realizó mediante ensayo de unión a nitrocelulosa de [3 H]cAMP (Perkin Elmer Life Sciences). Se incubaron las distintas fuentes de subunidad R durante 30 minutos a 30°C en un volumen final de 70 μ l con

0,3 μM de [^3H]cAMP (62 000 d.p.m./pmol) y 0,5 M NaCl en buffer A. Se sembró luego una alícuota sobre membranas de nitrocelulosa bajo vacío y se lavó con buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,5 (223). En esta concentración el cAMP es saturante. La actividad de R se expresó en fmoles de cAMP unido. Las fuentes de R ensayadas en los distintos casos fueron subunidad Rwt, R1 o R2 expresadas y purificadas en levadura; extractos crudos de distintas cepas, fracciones del gradiente de sacarosa o fracciones enriquecidas en holoenzima de las cepas de *M. circinelloides* que fueron utilizadas en los distintos ensayos.

En la curva de medición de saturación de cAMP se utilizó la mezcla de reacción con cantidades crecientes de [^3H]cAMP entre (0.25-3 μM).

X. Ensayo de actividad quinasa

La actividad quinasa se determinó ensayando su actividad fosfotransferasa usando kemptido (SIGMA) como sustrato en una mezcla de incubación que contiene 15 mM MgCl_2 , 0.1 mM [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (Perkin Elmer Life Sciences), (300-1500 dpm/pmol), 200 μM kemptido y 10 μM cAMP. El ensayo se inició por adición de las distintas fuentes enzimáticas en cada caso. Se incubó 10 minutos a 30°C y luego las alícuotas se procesaron según el método de papeles de fosfocelulosa (p81 Whatman) (224). La actividad de PKA se expresa en unidades (U) definidas como pmol de fósforo incorporado en el sustrato por minuto a 30°C o por minuto μg de proteína ensayada cuando se especifica en la leyenda de la figura.

Las fuentes enzimáticas utilizadas a lo largo de la tesis fueron: subunidad C α de *Bos taurus* (C_B) recombinante (fue cedida por la Dra. Susan Taylor, de la Universidad de California, San Diego), subunidad C de *M. circinelloides* (C_M) purificada, holoenzima semipurificada por cromatografía de intercambio iónico mediante resina DEAE-celulosa, extracto crudo de levadura, o fracción enriquecida en holoenzima por precipitación de extracto crudo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60%. En los experimentos del capítulo II también se ensayó utilizando el péptido NTh-1 como sustrato y en presencia y ausencia de MgCl_2 .

Kemptido: Péptido de 7 aminoácidos (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly) derivado de la piruvato quinasa de cerdo (31).

NTh-1: Péptido de 12 aminoácidos (Gly-Arg-Gln-Arg-Arg-Leu-Ser-Ser-Leu-Ser-Glu-Phe) derivado de la trealasa neutra de *S. cerevisiae*.

En algunos casos la actividad quinasa se ensayó en presencia y ausencia de 10 μM cAMP, o en presencia de 10 μM cAMP adicionado o no de 0.5 M NaCl, según se indica en las figuras de cada capítulo.

XI. Ensayo de inhibición de actividad quinasa

La subunidad C se preincubó durante 30 minutos a 30°C con varias concentraciones de subunidad R (0.02-1,5 nM) en 20 mM buffer Tris-HCl pH 7,5, 1 mM β -mercaptoetanol, 10 mM MgCl_2 y 0,1 mM ATP en un volumen final de 70 μl . La cantidad de subunidad C utilizada están indicadas en las leyendas de las figuras.

La reacción de fosforilación se inició por el agregado de 10 μl de solución *start* que contiene kemptido y [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP de manera tal de obtener una concentración final de 200 μM de kemptido y 0,1 mM ATP (1000-1500 cpm/pmol) se incubaron a 30°C 10 minutos y luego se procesaron alícuotas de 50 μl como se describió en el ensayo de actividad quinasa.

XII. Ensayo de disociación de holoenzima reconstituida

Se reconstituyeron las holoenzimas de PKA combinando las subunidades C_M o C_B con las subunidades Rwt, mutantes R1 y R2 o R_S en buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM β -mercaptoetanol, 10 mM MgCl_2 y 0,1 mM ATP. Se preincubó por 30 min a 30°C. Las holoenzimas reconstituidas fueron utilizadas para medir actividad quinasa a varias concentraciones de cAMP (0.001-10 μM). La reacción se inició por agregado de 50 μl de las holoenzimas reconstituidas a tubos que contenían 10 μl de solución *start* (descrita en el punto anterior) y las distintas cantidades de cAMP indicadas. Se incubaron a 30°C 10 minutos y luego se procesaron alícuotas de 50 μl como se describió en el ensayo de actividad quinasa.

Las cantidades de subunidades utilizadas para la reconstitución de las holoenzimas están indicadas en las leyendas de las figuras.

XIII. Transformación de *M. circinelloides*

XIII.1. Producción de protoplastos

Se recogieron esporas de micelios crecidos en placas de YPG pH 4,5, se centrifugaron 3 minutos a 2000 r.p.m. a temperatura ambiente y se hizo un lavado con 5 ml de agua destilada.

Las esporas cosechadas fueron crecidas en 25 ml de YPG pH 4,5 (si la cepa era MU402 adicionada de 200 µg/ml uridina) con un inóculo de 1×10^7 esporas/ml en un erlenmeyer de 250 ml y se incubó una hora a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C.

A la mañana siguiente se incubó a 26°C a 300 r.p.m., hasta que la mayoría de las esporas germinaron (aproximadamente 3,5 horas).

Se centrifugó 5 minutos a 900 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml de buffer PS (ver soluciones). Este lavado se repitió una vez.

Se resuspendieron las esporas en 4 ml de buffer PS. Se colocaron en un erlenmeyer de 25 ml y se añadió 5 mg de *Lysing Enzymes* (SIGMA) en 1 ml de buffer PS y 100 µl (0.75 mg) de Quitosanasa (US Biological).

Se incubaron a 30°C con agitación suave (60 r.p.m.) hasta que se vio la pared digerida (1,5 horas). Se trasvasó a un tubo a rosca, se llenó de MS (ver soluciones) y se centrifugó 5 minutos a 900 r.p.m. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 5 ml de MS y se centrifugó 5 minutos a 900 r.p.m. Se descartó el sobrenadante, y se llevó a 800 µl con MS. Esta preparación de protoplastos está lista para ser transformada.

XIII.2. Mezcla de transformación

Se agregaron los componentes en el siguiente orden:

- 1) 1 µl de ATA (ácido aurin tricarbóxico, SIGMA) 1 M
 - 2) 20-30 µg DNA plasmídico* en no más de 25 µl
- Cuando el objetivo era interrumpir un gen se utilizó el vector *knockout* indicado en cada caso linealizado.
 - Cuando el objetivo era complementar una mutación se transformó con plásmido sin digerir.
- 3) 20 µl de PEG4000 en MS

Se incubó 30 minutos en hielo y luego se añadieron los siguientes componentes en el orden indicado:

- 1) 0,5 ml de PEG4000 en MS
- 2) 0,5 ml de PEG4000 en MS
- 3) 1 ml de PEG4000 en MS

Se incubó 25 minutos a temperatura ambiente. Se completó el tubo con MS y se centrifugó 5 minutos a 900 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de YPG pH 4,5 + 0.5 M sorbitol (SIGMA).

Se centrifugó 5 minutos a 900 r.p.m., se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 650 μ l de YNB pH 4,5 + 0.5 M sorbitol. Se sembró en medio selectivo adicionado de sorbitol.

XIII.3. Selección de transformantes:

Se sembró inicialmente en medio selectivo YNB o MMC según la cepa, adicionado de sorbitol a pH 3,2 para obtener colonias aisladas. Se tomaron las colonias aisladas y a cada una de ellas se las pasó a medio selectivo pH 4,5 para producción de esporas. Se sembraron las esporas obtenidas en medio pH 3,2 +/- selección y se registró el porcentaje de crecimiento con selección respecto a sin selección. Se continuó dando pases a partir de las colonias crecidas en medio con selección hasta obtener un alto porcentaje de crecimiento en el medio selectivo respecto al medio sin selección.

Como el hongo es un sincicio de núcleos y la transformación da como resultado inicialmente individuos que presentan una mezcla de núcleos wt e interrumpidos, a estos hongos se los denomina (heterocariontes). Sometiendo a estos hongos a sucesivos pasajes en medio selectivo (generalmente 3) se seleccionan los individuos que poseen solo núcleos interrumpidos (homocariontes).

Para el caso de la transformación con plásmido circular empleada en las complementaciones, no es necesario dar pases, se elige un individuo que en el primer pase de alto porcentaje de crecimiento en el medio selectivo respecto al medio sin selección.

XIV. Construcción de vectores *knockout*

El plásmido pUC18R que lleva el gen *pkaR1* (-430 a 1982), se generó clonando dentro del vector pUC18 un fragmento *EcoR* I de 2,412 kb que se obtuvo mediante PCR utilizando DNA genómico como templado y *primers* específicos que incluyen el sitio de restricción *EcoR* I.

Se construyó el plásmido pRpyrG, que contiene el gen *pyrG* de *M. circinelloides* flanqueado por secuencias de *pkaR1*, para anular el gen *pkaR1*. El gen *pyrG* permite complementar la auxotrofia por uridina ya que codifica para la enzima orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa (OMPD) que participa en la síntesis de pirimidinas.

Para generar este vector *knockout*, se amplificó mediante PCR a partir del vector pUC18R usando los *primers* *pkaRp1* y *pkaRp2*, ambos contienen el sitio *Bgl* II en su secuencia (en *itálicas*, Tabla 5). Estos *primers* amplifican hacia afuera desde la secuencia de *pkaR1* hacia la del vector produciendo una delección de 0,561 kb de la región codificante de *pkaR1*. El producto de PCR digerido con *Bgl* II, se ligó con un fragmento *BamH* I de *pyrG* obtenido a partir del plásmido pEMP1 (Figura 17) (225). El plásmido se linealizó por digestión con *EcoR* I y se utilizó para transformar protoplastos de Mu402.

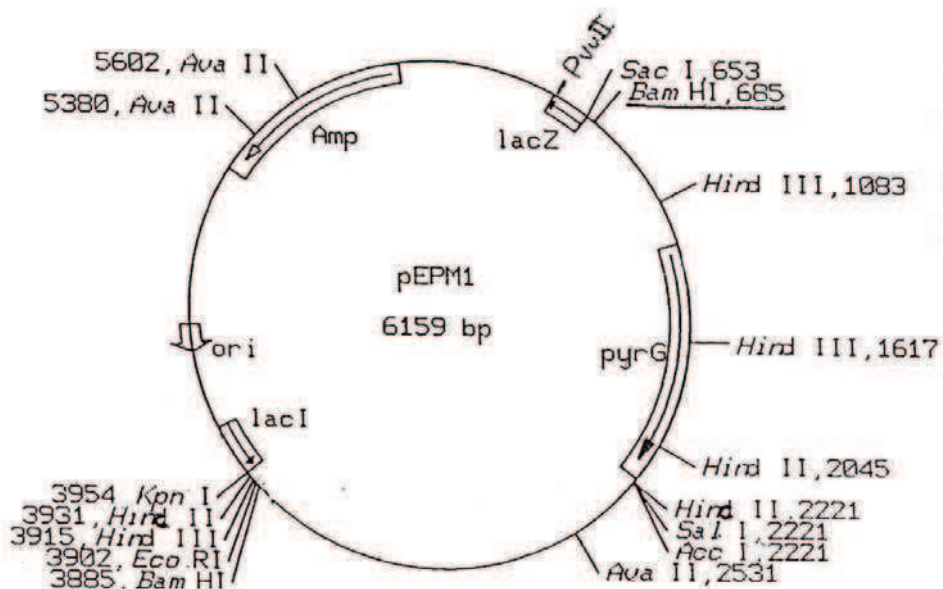


Figura 17- Vector pEMP1

El plásmido pUC19R2 que lleva el gen *pkaR2* (-718 a 1730), se generó clonando dentro del vector pUC19 un fragmento que se obtuvo mediante PCR utilizando DNA genómico como templado y *primers* específicos. Se construyó el plásmido pR2pLeuA, que contiene el gen *leuA* de *M. circinelloides* flanqueado por secuencias de *pkaR2*, para anular dicho gen. El gen *leuA* codifica para la enzima α -isopropilmalato isómeras que participa en la vía de síntesis de leucina. Para generar este vector *knocout*, se amplificó mediante PCR a partir del vector pUC19R2 usando los *primers* S1n y S1c, ambos contienen el sitio *Pst* I en su secuencia (en *itálicas*, Tabla 5). Estos *primers* amplifican hacia afuera desde la secuencia de *pkaR2* hacia la del vector produciendo una delección de 0,594 kb de la región codificante de *pkaR2*. El producto de PCR digerido con *Pst* I, se ligó con un fragmento *Pst* I de *leuA* obtenido a partir del plásmido pLeu4. El plásmido se linealizó por digestión con *Pvu* II y se utilizó para transformar protoplastos de R7B.

El plásmido pUC18C que lleva el gen *pkaC* (-453 a 2007), se generó clonando dentro del vector pUC18 un fragmento *EcoR* I de 2,460 kb que se obtuvo mediante PCR utilizando DNA genómico como templado y *primers* específicos que incluyen el sitio de restricción *EcoR* I.

Se construyó el plásmido pCpyrG, que contiene el gen *pyrG* de *M. circinelloides* flanqueado por secuencias de *pkaC*, para dicho gen. Para generar este vector *knockout*, se amplificó mediante PCR a partir del vector pUC18C usando los *primers* pkaC-p1 y pkaC-p2, ambos contienen el sitio *Bgl* II en su secuencia (en *itálicas*, Tabla 5). Estos *primers* amplifican hacia afuera desde la secuencia de *pkaC* hacia la del vector produciendo una delección de 0,537 kb de la región codificante de *pkaC*. El producto de PCR digerido con *Bgl* II, se ligó con un fragmento *BamH* I de *pyrG* obtenido a partir del plásmido pEMP1 (225). El plásmido se linealizó por digestión con *EcoR* I y se utilizó para transformar protoplastos de Mu402.

XV. Purificación y análisis de ácidos nucleicos.

XV.1. Preparación de DNA plasmídico

Para las realizar las preparaciones de DNA plasmídico se utilizó el kit comercial *Wizard plus* (PROMEGA).

XV.2. Preparación de DNA cromosómico

Se crecieron las cepas sobre celofán en medio selectivo durante 3 días. Se tomó el micelio crecido sobre $\frac{1}{4}$ de placa y se procesó con N_2 líquido. Se agregó 700 μ l buffer de extracción (ver soluciones) y 30 μ l de proteinasa K (2 ng / ml) y 30 μ l de RNAsa 10 mg/ml (Roche). Se incubó durante 3 hs a 37°C. Se agregó un volumen de fenol, se centrifugó 10 minutos a 10.000 r.p.m. y se repitió este paso una vez. Se agregó un volumen de isopropanol y se dejó precipitar durante 30 min a -70°C. Se centrifugó 20 minutos a 10.000 r.p.m. a 4°C. Se lavó el pellet con un volumen de etanol 70% y se resuspendió en 30 μ l de Buffer TE (ver soluciones).

XV.3. Preparación de RNA para Northern blot

Se crecieron las cepas sobre celofán en medio selectivo durante 3 días. Se tomó el micelio crecido sobre $\frac{1}{4}$ de placa y se procesó con N_2 líquido. Se agregaron 700 μ l buffer de extracción (ver soluciones) y 6 μ l de β -mercaptoetanol agitando. Se centrifugó 20 min a 4°C a 9000 g. Se preparó un tubo de ultracentrífuga con 900 μ l de mezcla CsCl 5,7 M / EDTA pH 8 10 mM y sobre esta solución se añadió con cuidado el sobrenadante de la centrifugación anterior. Se centrifugó a 50.000 r.p.m. 15 horas a 4°C. El RNA se resuspendió en 50 μ l agua MilliQ.

XV.4. Preparación de RNA para RT-PCR

Se crecieron las cepas en 100 ml de YPG pH 4,5 10^6 esporas/ml durante 4,30 hs. Se filtró el cultivo a través de papel de filtro y se lavó con H_2O . Se partió el micelio en 4 porciones y a cada una de ellas se las resuspendió en buffer TES (ver soluciones).

Se agregó un volumen de fenol ácido y se agitó durante 10 segundos. Se incubó durante 1 hora a 65°C y se agitó durante 10 segundos cada 5 min. Se incubó en hielo 5 min. Se centrifugó a 4°C a 12000 r.p.m. durante 5 min. Se pasó la fase acuosa a otro tubo y se repitió la extracción con fenol una vez.

Se agregó 0,1 volumen de acetato de sodio y 2 volúmenes y medio de etanol absoluto (Merck).

Se centrifugó 15 min a 12000 r.p.m. a 4°C y se conservó en 100 ml de etanol absoluto a -70°C hasta su utilización.

XVI. Southern blot y Northern blot

Para el análisis por *Southern blot*, se hibridó DNA cromosómico (1 µg) en filtros de nylon cargados positivamente (GE Healthcare Life Sciences) y se hibridó a 65°C a sondas marcadas radiactivamente en una solución de hibridación que contiene 0,1 g/ml dextran sulfato. Para los *Northern blot*, se utilizaron 15-25 µg de RNA total de cada muestra. Se corrieron en un gel de agarosa 1,2% con formaldehído y 1x MOPS, se hibridó en filtros de nylon cargados positivamente en 0,9 M NaCl, 0,5 % SDS y 0,1 g/ml dextran sulfato. Las sondas se marcaron con [α -³²P]CTP (*Ready-to-Go DNA labellingbeads*, GE Healthcare Life Sciences).

XVII. PCR y RT-PCR semicuantitativa

XVII.1. PCR

Se realizaron PCRs para analizar la interrupción del gen *pkaR1* con los pares de *primers* p1/ p2; para analizar la interrupción del gen *pkaC* se utilizaron los pares de *primers* Caf /Car y Sec2F / p2 y para analizar la interrupción del gen *pkaR2* se utilizaron los pares de *primers* S1F/LeuAR1 y S1F/ S1t. Se analizó mediante PCR también si quedaban retos de vector pkCpyrG sin digerir en los clones ΔC heterocariontes utilizando los *primers* pv y MC5. Las secuencias de los *primers* se muestran en la tabla 5.

XVII.2. RT-PCR semicuantitativa

Se preparó RNA de las cepas R7B, $\Delta R1$ y $\Delta R2$ de *M. circinelloides* crecidas hasta distintos estadios. Se realizó RT-PCR semicuantitativa usando el gen del factor de elongación EF-1a (*tef-1*) como control interno. El gen *tef-1* se expresa constitutivamente a través de la germinación en *M. circinelloides* (226). Para la reacción de amplificación mediante RT-PCR se realizó un primer paso de obtención de cDNA, para ello se utilizó Transcriptasa reversa (Supertranscript II de Invitrogen), se calibró de manera tal que permitiera la detección de los transcritos de mRNA apropiados para que se mantenga la amplificación de los mismos en fase logarítmica. Una vez obtenido el cDNA se realizó la PCR utilizando los pares de *primers* adecuados. Los *primers* utilizados fueron: pkaR1F /pkaR1R, pkaR2F

/pkaR2R, pkaR3F /pkaR3R, pkaR4F /pkaR4R para detectar cada gen *pkaR* respectivamente. Mientras que para los genes *pkaC1-6* los pares de *primers* utilizados fueron S0F/S0R, S1F/S1R, S2F/S2R, S3F/S3R, S5F/S5R, S8F/S8R y Caf/Car para la detección del gen *pkaC*.

El tamaño de los productos de PCR esperados eran 775 pb, 955 pb, 817 pb y 994 pb para *pkaR1*, *pkaR2*, *pkaR3* y *pkaR4* respectivamente; 858 pb, 929 pb, 902 pb, 854 pb, 969 pb y 821 pb para los genes *pkaC1-6* respectivamente; 1124 pb para *pkaC* y 550 pb para *tef-1*.

También se preparó RNA de las cepas de levadura tpk^{1w} , $tpk^{1w} bcy1\Delta$, tpk^{1w} /V , tpk^{1w} /C , $tpk^{1w} bcy1\Delta/V$ y $tpk^{1w} bcy1\Delta/C$ y se analizó la expresión en levaduras del gen *pkaC* con los *primers* Caf y Car. El tamaño esperado en este caso era 1124 pb.

Los productos de PCR se analizaron por geles de agarosa 1% teñidos con BrEt y cuantificaron usando (Bio-Imaging Analyzer Bas-1800II and Image Gauge 3.12, Fujifilm) expresando las intensidades en unidades arbitrarias.

Las secuencias de los *primers* se detallan en la tabla 5.

XVIII. Crecimiento radial y esporulación

Se inocularon por triplicado en el centro de una placa 10 μ l de una suspensión de esporas (10^3 esporas/ml) en medio mínimo pH 4,5 suplementado o no con leucina. Se monitoreó el crecimiento radial a 30 °C midiendo el diámetro de la colonia cada 24 horas entre las 24 y 72 hs. las velocidades de crecimiento se expresaron como μ m h^{-1} .

Para comparar la esporulación de las distintas cepas, se sembraron 100 esporas en placas de medio mínimo de las cepas R7B, Δ R1 y Δ R1 + R1 o KFA 89 y Δ R2, y se incubaron a 30 °C por 5 días. Luego se cortaron trozos de micelio de 1cm², se embebieron en agua destilada y se agitó con vortex, se centrifugó y se realizó el recuento de esporas.

XIX. Análisis microscópico.

Para los análisis microscópicos las células se fijaron con glutaraldehído 8% y se usó un microscopio Nikon E-600. Las fotos se tomaron con una cámara Nikon

Cool Pix 5000. El volumen celular y el largo de hifa se calcularon analizando 500 células de cada cepa y usando los programas Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y Science Lab98, Image Gauge versión 3.12. Ambos parámetros se expresaron en unidades arbitrarias y cada valor representa la media +/- SEM de tres experimentos independientes.

XX. Predicción de las secuencias de R, análisis por espectrometría de masas y análisis filogenético

XX.1. Predicción de las secuencias de R y análisis por espectrometría de masas

La predicción de genes adicionales de R, se realizó por búsqueda por comparación de secuencias en el genoma de *M. circinelloides* en la versión de ensamblaje 4x del Instituto Joint Genome, utilizando como secuencia de partida la del gen *pkaR1*.

Las secuencias de cDNA y proteínas se obtuvieron luego de la predicción de intrones y de la búsqueda de homología de secuencias. Los datos de espectrometría de masas de la digestión trípica de las bandas del gel de SDS-PAGE teñido con *Coomassie Blue* coloidal, se obtuvieron usando un espectrómetro de masas MALDI –TOF-TOF Ultraflex II (Bruker), del servicio del CEQUIBIEM, Depto. De Qca. Biológica, FCEyN, UBA. El análisis de los datos es parte de este trabajo de tesis y no del servicio CEQUIBIEM. Se hizo interpretación manual del espectro para la identificación de las proteínas que aún no estaban en la base de datos por comparación de los resultados obtenidos del MS y MS-MS experimental con la digestión trípica *in silico* de las nuevas PKARs predichas.

XX.2. Análisis filogenético

El árbol filogenético fue construido utilizando los resultados de alineamiento de ClustalW2 de las secuencias de proteínas de subunidad R de distintos hongos (Zygomycetes, Ascomycetes y Basidiomicetes). En la tabla 4 se muestran los números de acceso de las secuencias utilizadas.

gi 6322156 ref NP_012231.1	<i>Saccharomyces</i>
gi 150863720 ref XP_001382284.2	<i>Pichia pastori</i>
gi 68472545 ref XP_719591.1	<i>Candida albicans</i>
gi 110293154 gb ABG66306.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
gi 156043067 ref XP_001588090.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
gi 45252346 ref XP_001397686.1	<i>Aspergillus niger</i>
gi 119187827 ref XP_001244520.1	<i>Coccidioides immitis</i>
gi 39972039 ref XP_367410.1	<i>Magnaporthe grisea</i>
gi 85103516 ref XP_961532.1	<i>Neurospora crassa</i>
gi 400120 sp P31320.1	<i>Blastocladiella emersonii</i>
gi 238842 gb AAB20314.1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
gi 71024735 ref XP_762597.1	<i>Ustilago maydis</i>
gi 11096028 gb AAG30146.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>
jgi Phybl1 41174	<i>Phycomyces</i>
gi Phybl1 70276 geneshPB_pg.33_11	R2 <i>Phycomyces</i>
jgi Phybl1 74992 estExt_fgeneshPB_pm.C_180005	R3 <i>Phycomyces</i>
jgi Phybl1 69062 fgeneshPB_pg.25_230	R4 <i>Phycomyces</i>
RO3G_05751.1	R1 <i>Rhizopus</i>
RO3G_06050.1	R6 <i>Rhizopus</i>
RO3G_15555.1	R4 <i>Rhizopus</i>
RO3G_16579.1	R5 <i>Rhizopus</i>
RO3G_00025.1	R3 <i>Rhizopus</i>
RO3G_14827.1	R2 <i>Rhizopus</i>
AJ400723	<i>pkaR1 M. circinelloides</i>
AJ431364.1	<i>pkaC M. circinelloides</i>

Tabla 4- números de acceso de las secuencias utilizadas

XXI. Otros métodos utilizados

XXI.1. Western blot

Se analizaron las muestras proteicas por SDS-PAGE (227) en geles de poliacrilamida 10%. Se transfirió a membranas de nitrocelulosa (Amersham) a 90 V durante 1 hora en buffer 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5%, 0.05% Tween 20 en buffer Tris salino. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-R de *M. rouxii* (111) y anti-Ubiquitina (Santa Cruz) preparados en conejo utilizados 1/20000 y 1/100 respectivamente; y anti-cMyc (COVANCE) monoclonal preparado en ratón utilizado 1/200. Los anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón, IgG-conjugados con

peroxidasa (SIGMA), se utilizaron 1/5000 o 1/1000 respectivamente. Se revelaron con reactivo quimiolumincente (ECL, GE Healthcare).

XXI.2. Tinción con *Coomassie Blue* coloidal

Luego de realizar el PAGE-SDS, se procedió a la tinción del gel con azul de *Coomassie* coloidal. En primer lugar, se realizan tres incubaciones de 30 minutos con Solución I (Etanol 30%, ácido fosfórico 2%) en agitación moderada. Posteriormente, se realizan 3 lavados de 20 minutos con Solución II (ácido fosfórico 2%), y luego se incuba por 30 minutos en Solución III (Etanol 18%, ácido fosfórico 2%, Sulfato de amonio 15 %). Finalmente, se agregan a 25 ml de la solución III, 1 ml de *Coomassie* G250 2%. Se deja 24 horas en agitación moderada. Por último, se realizan una serie de lavados con agua milliQ, con el objeto de eliminar el *background* de colorante en el gel.

XXI.3. Acumulación de glucógeno en levaduras

Se realizaron *spots* sobre placas YPgal de las cepas de levaduras tpk^{1w} , $tpk^{1w} bcy1\Delta$, tpk^{1w} /V , tpk^{1w} /C , $tpk^{1w} bcy1\Delta/V$ y $tpk^{1w} bcy1\Delta/C$ y $TPK1bcy1\Delta$ y se crecieron 48 horas a 30°C. La acumulación de glucógeno se evaluó mediante el color marrón obtenido por las células luego de la tinción con yodo. Esta incubación se realiza por inversión de la placa conteniendo los *spots* de células en un recipiente saturado con vapores de yodo (1).

XXI.4. Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa

Los gradientes de sacarosa se utilizaron con fines preparativos para purificar subunidad R de *M. circinelloides* y de *S. cerevisiae* y con fines analíticos para estimar el coeficiente de sedimentación de la subunidad C y de las subunidades R. En todos los casos el gradiente fue lineal de sacarosa 5-20% (p/v) en buffer A, con un volumen final de 4,2 ml. El volumen de la muestra que se cargó sobre el gradiente fue de 200-300 μ l y la concentración de proteína total fue de entre 300 y 700 μ g. Con el fin de calibrar el gradiente para estimar los coeficientes de sedimentación, se incluyó la proteína estándar (3,5S) peroxidasa (SIGMA). La centrifugación se realizó en una ultracentrífuga Beckmann SW50 a 35.000 r.p.m. por

15 horas a 4°C en rotor SW55Ti. Cuando los gradientes fueron disociantes contenían NaCl 0,5 M y cAMP 1 mM. Se colectaron en todos los casos 25 fracciones de 200 µl cada una desde el fondo del tubo.

XXI.4.a. Ensayo de peroxidasa

Se agregan al gradiente 10 µg de peroxidasa (SIGMA). El ensayo consiste en mezclar 500 µl de solución A (0,5% (v/v) H₂O₂ en 10 mM Tris-HCl pH 7.0), 10 µl de solución B (punta de espátula de ortodianisidina en 1 ml de metanol) y 10 µl de cada fracción del gradiente. En pocos minutos se desarrolla un color naranja en aquellas fracciones en las cuales está presente la enzima. La fracción con mayor actividad peroxidasa corresponde a aquella donde se observe coloración más intensa.

XXI.5. Inmunoprecipitación

Se preparó un extracto proteico de la cepa R7B a partir de cultivo aeróbico de 8 hs y se lo incubó con anticuerpo primario anti-R de *M. rouxii* 1 hora a 4°C. Luego se incubó con la resina proteína A agarosa (Santa Cruz) 6 horas a 4°C. Se realizaron 4 lavados con buffer A 0.1M NaCl y 1mM cAMP y luego un lavado con buffer A. La muestra se analizó por SDS-PAGE y *Western blot* y se reveló con anticuerpo primario anti-Ubiquitina y anti-R de *M. rouxii*.

XXI.6. Determinación de concentración de proteínas.

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Bradford con BSA como proteína estándar (228).

XXII. Medios de cultivo

Medio rico para levaduras (YPGlu/YPGal)

Extracto de levaduras 1% (Oxoid/Merck)

Peptona 2% (Oxoid/Merck)

Glucosa / Galactosa 2% (Oxoid/Merck)

Medio mínimo *ura⁻* para levaduras

Yeast nitrogen base (YNB) 0,67% (Difco)

Drop out *ura⁻* 0,077 %

Fuente de carbono 2%

Llevar a pH 6,5 con KOH

(Para placa 1,5% agar)

Medio Luria-Bertani (LB)

Peptona 1%

Extracto de levadura 0,5%

NaCl 0,5% (Merck)

Medio rico para *M. circinelloides* (YPG)

Extracto de levaduras 0,3%

Peptona 1%

Glucosa 3%

Agar 1,5 %

pH 4,5

Suplementados con uridina 200 µg/ml cuando es necesario

MMC

Casaminoácidos 1% (Difco)

YNB 0,05 %

Glucosa 2%

- Medio líquido para cultivos anaeróbicos o para transición anaerobiosis-aerobiosis

No se lleva a pH

- Medio sólido:

Agar 1,5 %

pH 3 para aislar colonias

pH 4,5 para obtener esporas

Vitaminas 1 µg/ml ácido Nicotínico y Tiamina clorhídrico.

YNB para *M. circinelloides*:

YNB 0, 2 %

Sulfato de amonio 0,15%

Glucosa 2%

Agar 1,5 %

pH 3 para aislar colonias

pH 4.5 para obtener esporas

Vitaminas 1µg/ml ácido Nicotínico y Tiamina clorhídrico.

NOTA: En los medios para *M. circinelloides* con pH ácido el agar se debe autoclavar aparte resuspendiendo el medio en la mitad del volumen final y el agar en la otra mitad.

XXIII. Soluciones

Buffer A

Tris-HCl pH 7.5 10 mM

EDTA 5 mM (Merck)

EGTA 2 mM (Merck)

β-mercaptoetanol 2 mM (Merck)

Mezcla de Inhibidores de proteasas (Roche)

PMSF (para los extractos de *M. circinelloides*)

Buffer Fosfato de sodio 0.1M pH 6.5

- 100ml 0.1M Na₂HPO₄
- 100 ml 0.1M NaH₂PO₄

Se añaden aproximadamente 53 ml del Na₂HPO₄ a los 100 ml del NaH₂PO₄

MOPS 1M pH 6.3

Se ajusta el pH con NaOH

Buffer MS

0.5M sorbitol

10mM MOPS (Merck)

50mM CaCl₂ (Merck)

Buffer PS

0.5M sorbitol

Para 200ml: 20 ml Buffer Fosfato de sodio 0.1M pH 6.5

PEG4000 en MS

20g PEG4000 en 50ml de MS (Merck)

Buffer TE

10 mM Tris-HCl pH 8

1 mM EDTA

Buffer de Extracción de DNA/RNA

200 mM Tris-HCl

100 mM EDTA

1% SDS

Buffer TES

20 mM Tris-HCl pH 7,5

10 mM EDTA

0,5 % SDS

XXIV. Primers utilizados

pkaR1F	5'-CTTGTTTGATACCAATGATACCAGTAATG-3'
pkaR1R	5'-CTCCTGTCCATCTCCAAAATAAACT-3'
pkaR2F	5'-AGACAAGTAGTTGAACATCAGCCTG-3'
pkaR2R	5'-TTGCTGAGAGCCGTCAGGCAGCTTCTT-3'
pkaR3F	5'-CATCCCATGTGGGCGGCATTGGCCC-3'
pkaR3R	5'-CCTTGCTTCATTTTCATTGACCAACTG-3'
pkaR4F	5'-GATGTGTACTGCAAAGATCAGCCTCA-3'
pkaR4R	5'-CTGCAAGATAACATGCTCTCCATCATTG-3'
S0F	5'-CTACGACAACGCTATACGAATTACG-3'
S0R	5'-GGCATGTGGATCGAAATATGC-3'
S1F	5'-CGATCCACACCCACGTATACTTCGG-3'
S1R	5'-ACTGAGGGTATTTGACACGACCTGC-3'
S2F	5'-CAGCACAAGCCATCTACCTGACAGC-3'
S2R	5'-TCAGGGCTCATGCTAGAGGGAAACG -3'
S3F	5'-CCCAACAACATCAAGCAACGTCGCC-3'
S3R	5'-GAGGTCGGCACTCATATCTTCGGGC-3'
S5F	5'-CAGCAGCAATCTTCGGAACAATCGC-3'
S5R	5'-TGGGATCAAATAAGATGGCCAACG-3'
S8F	5'-AGTGGACATAATTCCAACAAGAGCC-3'
S8R	5'-GAAGATGGATATTTGGGCTGGGTGG-3'
Caf	5'-GTCGAGCTGATCTTTCCTCTTCACG-3'
Car	5'-ATCACATTGGCATTGGTAGACTCGG-3'
Tef-1	5'-TCACGTGATTCCGGTAAGTC-3'
Tef-2	5'-TATCACCGTGCCAGCCAGA-3'
pkaRp1	5'-AC GAGATCT GTTTGTGGGAGGCAGCGAGG-3'
pkaRp2	5'-ATTTT AGATCT GGACAGGAGGTTGTGAAGC-3'
S1n	5'-TGTAG CTGCAG CACACTGTTTCAGCTCTTGC-3'
S1c	5'-ATGT ACTGCAG GCCTCGTGCTGCCTCC-3'
pkaCp1	5'-TGCTA AGATCT CCCAAGAAGCGATCTTCACC-3'
pkaCp2	5'-GTTT GAGATCT AAGCGTTGCCAATTCTTTGC-3
B1	5'-CT AAGCTT CAACTGAACCTTTGCCCTC-3'
B2	5'-TC GAATTC TATGATTGCTGGTTAATGACAG-3
B3	5'-TCCCAACGACCAAGGTGCTCTTTCAT-3'
B4	5'-GGGCAAAGGTTCAAGTTGAAAATTT-3'
B5	5'-CT AAGCTT ATGATCACTGACGAACATCC-3'
B6	5'-AC GGTAACCT TGTTTGGCCCAATAAAAC-3'
p1	5'-GCTTTATTCATTTCACTGGTCAACG-3'
p2	5'-GTGGCTGATTGGACTCAAACAGG-3'
Caf	5'-GTCGAGCTGATCTTTCCTCTTCACG-3'
Car	5'-ATCACATTGGCATTGGTAGACTCGG-3'
S1F	5'-GTGCCAGCCAATGTCTAGTGGTAG-3'
LeuAR1	5'-AGTACAGTGCAACGAATGCAGGTC-3'
S1t	5'-GACGTCTGTGTACTGCTCTTCGTC-3'
Sec2F	5'-AATCATGATGAGCGCTAGTTCTCCC-3'
S1S	5'-ATCTCGCCAATACGACCAGCACCTC-3'
pkaR2R	5'-TTGCTGAGAGCCGTCAGGCAGCTTCTT -3'
MC5	5'-TCGAAATCAAAGGTCTGCTAGT-3'
pv	5'-GTA AACGACGGCCAGTGC-3'

Tabla 5- Primers utilizados

CAPITULO I

**Interacción entre las subunidades R y C de la PKA
de *Mucor circinelloides***

I.1. Introducción y objetivos específicos

La Proteína Quinasa dependiente de cAMP (PKA) de los hongos *Mucor circinelloides* y *Mucor rouxii* son holoenzimas tetraméricas que se asemejan a las holoenzimas de eucariotas superiores. Esto se predijo por la secuencia de aminoácidos y se demostró mediante estudios cinéticos (229, 230). La activación de la PKA de *M. rouxii* por cAMP usando kemptido como sustrato es parcial y para lograr su total activación se requiere el agregado de 0.5 M NaCl o policationes además de cAMP en el ensayo (231). Esta característica hace a la PKA de *Mucor* sp. un buen modelo para el estudio del mecanismo de activación de PKA aún no dilucidado completamente.

La subunidad R de PKA presenta una estructura modular. En el extremo N-terminal, presenta un dominio de dimerización y anclaje (D/D); hacia el extremo C-terminal presenta dos dominios en tandem de unión a cAMP (CNB) y entre estas dos regiones se encuentra un dominio llamado zona *linker* o bisagra que incluye el sitio inhibitorio (IS). La región hacia el N-terminal del IS se conoce como *linker* I, mientras que la región hacia el C-terminal del IS se denomina *linker* II. Los dominios de unión a cAMP están altamente conservados entre las especies (55), mientras que la región *linker* presenta mucha variación (59).

Del análisis de las secuencias de 40 hongos pertenecientes a los *filums* Ascomycete, Basidiomycete, Blastocladiellamycete y Glomerulomycete, se encontraron regiones de baja complejidad correspondientes a la zona bisagra, siendo más abundantes en la zona del *linker* I (102). Las regiones de baja complejidad son secuencias con una composición sesgada de aminoácidos, en general regiones no globulares y en algunos casos pueden participar en interacciones proteína-proteína (61). En la región *linker* I de la subunidad R de *M. circinelloides*, *M. rouxii* y *Blastocladiella emersoni* se observa además la presencia de residuos ácidos presentes en mayor número que en otras especies, y particularmente en *M. circinelloides* se encuentran más agrupados. La RII α de *Bos taurus* también presenta un número elevado de residuos ácidos pero no se encuentran tan agrupados como en el caso de *M. circinelloides*. Si bien estaba demostrada la mayor afinidad entre R y C para la holoenzima de *M. rouxii* se cuenta solo con una secuencia parcial de su subunidad R (114), mientras que la secuencia de R de *M. circinelloides* se conoce completa. Estos antecedentes y características

de la secuencia, condujo a la elección de la PKA de *M. circinelloides* como modelo de estudio de interacción R-C.

El objetivo de este capítulo de la tesis fue evaluar la participación de la región amino terminal de R (de la isoforma descrita en el momento de realizar el trabajo correspondiente a este capítulo de la tesis) en la interacción R-C y si los residuos ácidos presentes en el *linker* I tienen alguna implicancia en determinar la mayor fuerza de interacción observada entre las subunidades de la holoenzima de *M. circinelloides*. Para contestar esta pregunta, se construyeron dos mutantes de subunidad R. La mutante R1, que carece del extremo N-terminal completo desde la primera metionina hasta el IS, y R2, que carece solamente del grupo de residuos ácidos. Las mismas fueron utilizadas para evaluar su interacción con la subunidad C a través de ensayos de inhibición de la actividad fosfotransferasa y de ensayos de activación por cAMP de holoenzima reconstituida.

I.2. Resultados

I.2.1. La holoenzima PKA de *M. circinelloides* presenta alta afinidad de interacción R-C

En primer lugar para analizar si la PKA de *M. circinelloides* (PKAMc) presenta una alta afinidad de interacción de sus subunidades al igual que la de *M. rouxii*, se evaluó su actividad fosfotransferasa en presencia de cAMP. Resultados previos del laboratorio demostraron que la activación de la PKA de *M. rouxii* por cAMP usando kemptido como sustrato es parcial y que para lograr su total activación se requiere el agregado de 0.5 M NaCl o policationes en el ensayo junto con cAMP (231). Para estudiar el comportamiento de PKAMc, se midió la actividad quinasa ensayando cantidades crecientes de esta holoenzima en presencia de 10 μ M cAMP con el agregado o no de 0.5 M NaCl.

Se observó que la actividad quinasa cuando se agregó NaCl, además de cAMP, a la mezcla de incubación fue mayor y se mantuvo la linealidad con la cantidad de proteína ensayada (Figura 18). En ausencia de NaCl, se observó falta de proporcionalidad de la actividad quinasa respecto a la cantidad de proteína ensayada. La falta de proporcionalidad en ausencia de NaCl, evidencia una activación incompleta de la holoenzima en esas condiciones.

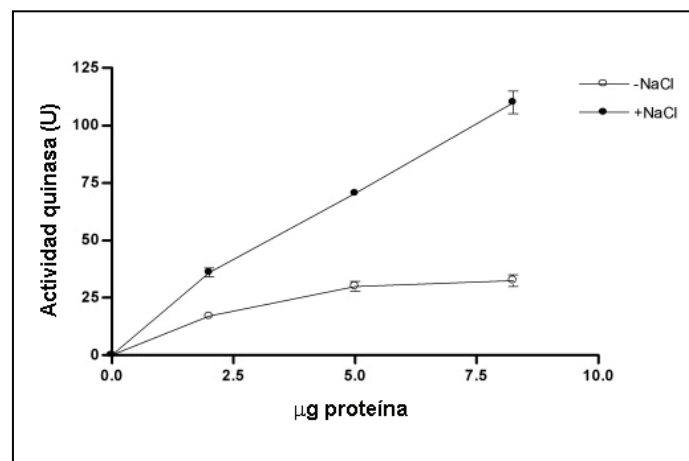


Figura 18- Ensayo de actividad quinasa en presencia o ausencia de fuerza iónica. Se ensayó actividad quinasa utilizando distintas cantidades de una preparación semipurificada de holoenzima PKAMc en presencia de 10 μ M cAMP +/- 0,5 M NaCl. La actividad quinasa se expresa en unidades (U) según se define en materiales y métodos.

Para corroborar la mayor interacción entre R y C de la PKAMc se analizó el comportamiento de la holoenzima en cromatografías de afinidad de cAMP-agarosa en comparación con la holoenzima de *S. cerevisiae*.

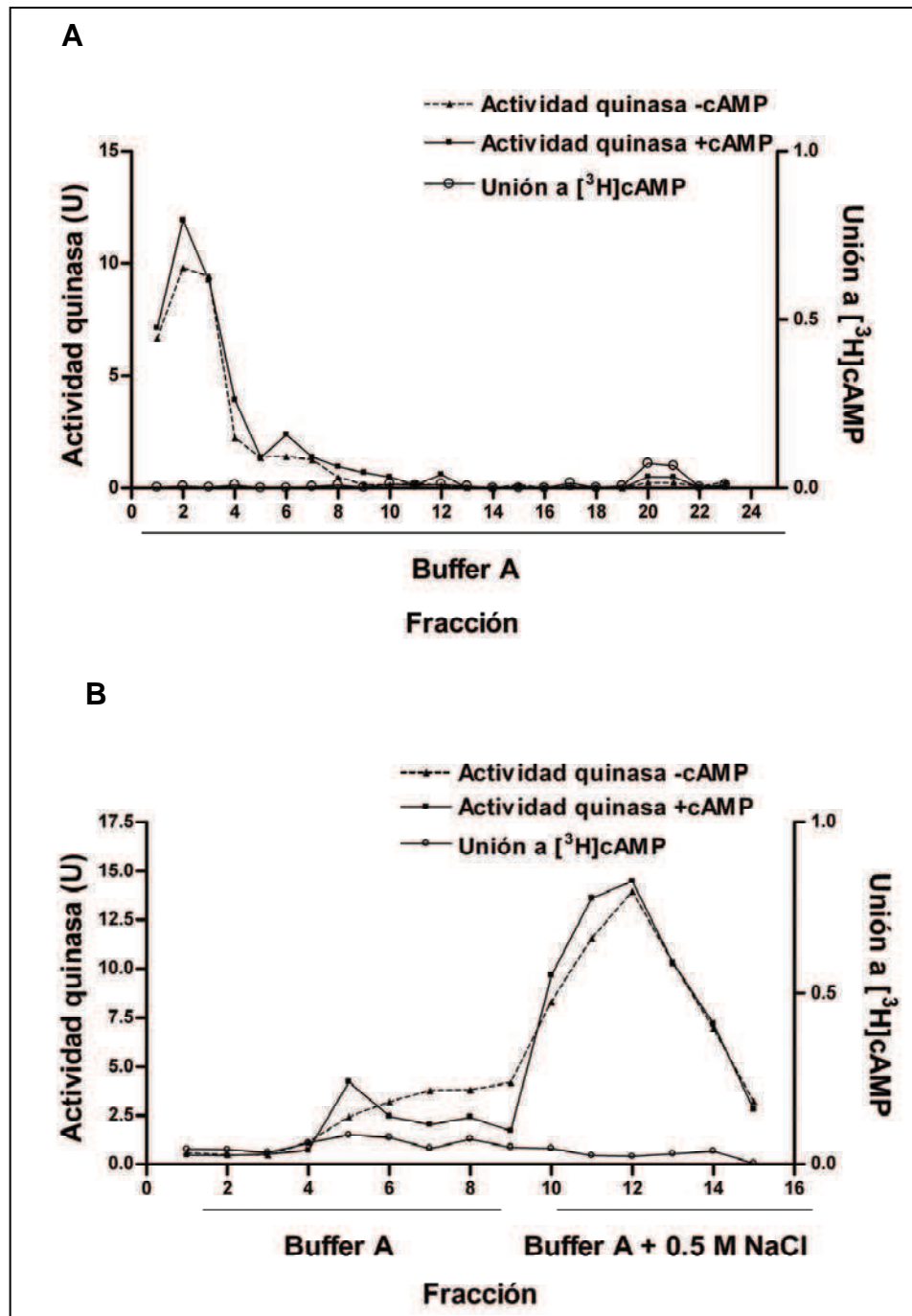


Figura 19- Purificación por cAMP agarosa de la subunidad C de *S. cerevisiae* (A) y de *M. circinelloides* (B). Se sembraron holoenzimas en resina de afinidad de cAMP-agarosa, se lavaron con buffer A y posteriormente con buffer A con 0.5 M NaCl. Se ensayó actividad PKA +/- cAMP y actividad de unión a [³H]cAMP en cada fracción. La actividad quinasa se expresa en unidades (U) según se define en materiales y métodos. Unión a cAMP expresa los fmoles de [³H]cAMP unidos por fracción.

En la región *linker* I se observa la presencia de residuos ácidos que están presentes en diferente distribución y número en las distintas especies. En particular, en las especies del género *Mucor* y en *B. emersonii* estos residuos están agrupados. Esta observación junto con la necesidad del agregado de NaCl para lograr la activación completa de la holoenzima de *Mucor* por cAMP, nos condujo a plantear la hipótesis de que este grupo de residuos ácidos podría participar en la interacción R-C.

Para poder evaluar si la secuencia N-terminal y particularmente el grupo de residuos ácidos tienen importancia en determinar la fuerte interacción R-C en la PKAMc, se generaron subunidades R mutantes, R1 y R2 (Figura 21). La mutante R1 carece del extremo N-terminal desde el primer residuo metionina hasta veinte residuos antes del sitio de autofosforilación (1-127), y R2 carece sólo de 16 aminoácidos que corresponden al grupo de residuos ácidos 110-125 (Figuras 20 y 21).

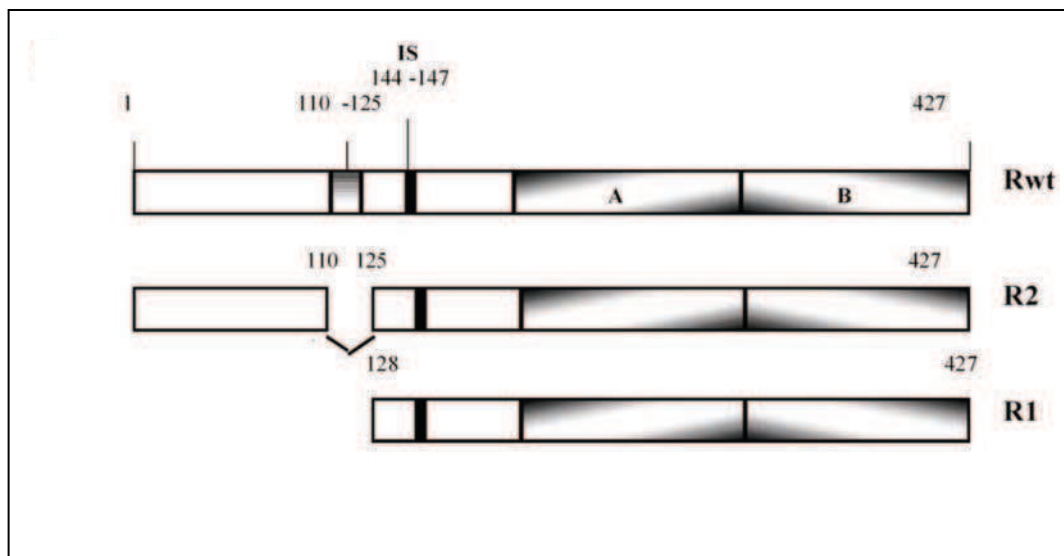


Figura 21- Representación esquemática de R (Rwt), R1 y R2 de *M. circinelloides*. Se muestran las regiones de R ausentes en las mutantes R1 y R2. A / B indican dominios A y B de unión a cAMP respectivamente.

I.2.3. Expresión y propiedades de las subunidades Rwt R1 y R2 de *M. circinelloides* en levadura

Las subunidades Rwt, R1 y R2 se expresaron y purificaron en la cepa S13-3A (TPK1bcy1 Δ) de *S. cerevisiae* transformada con los plásmidos pYES-R, pYES-R1 y

pYES-R2 respectivamente. Se verificó su expresión analizando extractos crudos por *Western blot* revelado con anti-R de *M. rouxii*, preparado en nuestro laboratorio (111). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión ni en la afinidad de unión a cAMP de las tres proteínas indicando que las mutaciones generadas en el extremo N-terminal de la subunidad R no tuvieron efecto en la estabilidad, ni en la afinidad de R por cAMP (Figura 22).

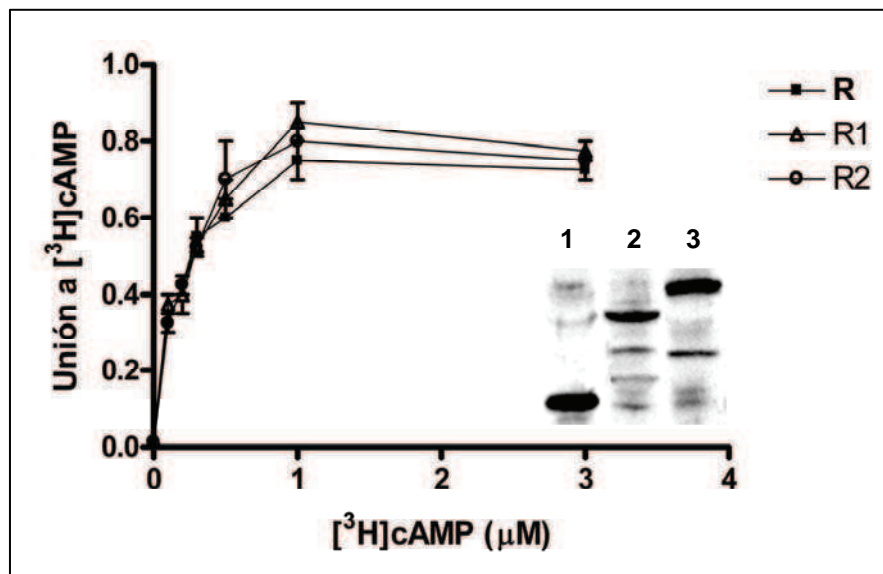


Figura 22- Expresión y propiedades de Rwt R1 y R2. Cantidades iguales de Rwt R1 y R2 purificadas se ensayaron para determinar actividad de unión a cAMP en presencia de cantidades crecientes de [³H]cAMP. En el panel insertado se muestra un *Western blot* revelado con anti-R (*M. rouxii*), calles 1, 2 y 3 corresponden a R1, R2 y Rwt respectivamente. Unión a [³H]cAMP expresa los fmoles de [³H]cAMP unido por alícuota ensayada.

I.2.4. Ensayos de estabilidad de C

Para evaluar si las subunidades catalíticas de *M. circinelloides* (C_M) o de corazón bovino (C_B) son estables luego de la incubación a 30°C durante 30 minutos, condición que se usará en los ensayos siguientes, se incubaron durante distintos tiempos (10-60 min) a 30°C y se les determinó actividad quinasa utilizando kemptido como sustrato.

Se pudo corroborar que tanto C_M como C_B , son estables hasta la hora de incubación inclusive (Figura 23).

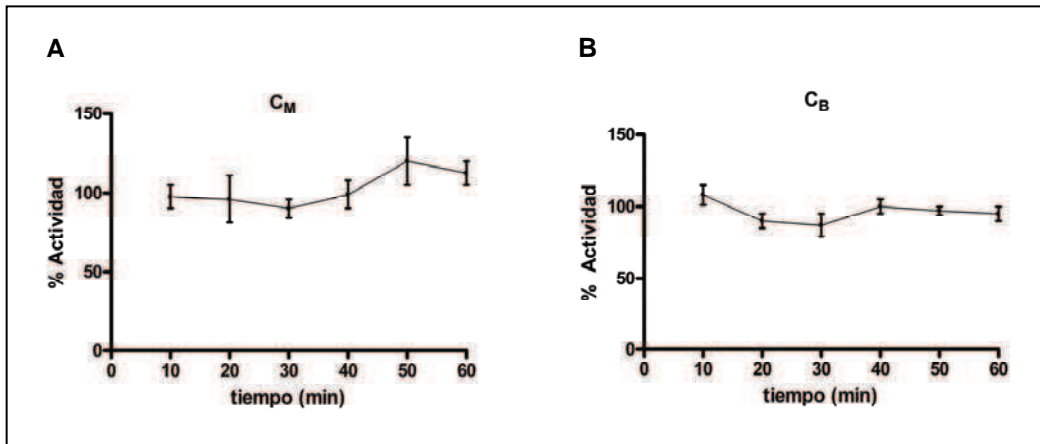


Figura 23- Ensayo de estabilidad de C. Se incubaron las subunidades (A) C_M o (B) C_B a 30°C durante distintos tiempos (10-60 min) y se ensayo actividad quinasa cada 10 minutos. La actividad se define como pmol ³²P incorporado en el sustrato a 30°C.

I.2.5. Inhibición de la actividad quinasa de la subunidad C por las subunidades R

El primer abordaje para analizar la interacción R-C fue medir la habilidad de las subunidades Rwt, R1 y R2 de inhibir la actividad de la subunidad C purificada de *M. circinelloides* (C_M).

En la Figura 24A se muestra que la actividad de PKA fue inhibida por concentraciones del orden nM de las tres subunidades. No obstante la habilidad de las subunidades R1 y R2 para asociarse con C_M fue varias veces menor que la de Rwt. En el ensayo mostrado en la Figura 24A la IC₅₀ para Rwt fue de 0.075 nM mientras que se necesitaron concentraciones de 0,3 - 0,4 nM de las proteínas R1 y R2 para inhibir el 50% de la actividad fosfotransferasa (Tabla 6).

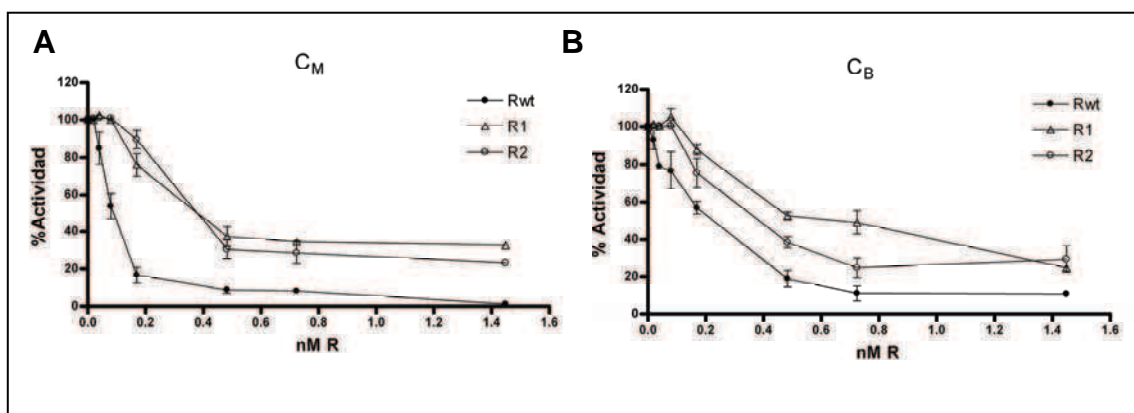


Figura 24- Ensayos de inhibición de actividad quinasa. Subunidades C_M (0,7 U) (A) o C_B (0.02 pmol) purificadas se preincubaron (B) 30 minutos a 30°C con varias concentraciones de las subunidades Rwt, R1 y R2 (0.02-1.5 nM) previo al ensayo de actividad quinasa. Cada valor representa la media +/- SD para tres experimentos independientes.

	IC₅₀ C_M (nM)	IC₅₀ C_B (nM)
Rwt	0,075 +/- 0,01	0,221 +/- 0,05
R1	0,413 +/- 0,05	0,960 +/- 0,10
R2	0,303 +/- 0,06	0,415 +/- 0,07

Tabla 6- IC₅₀ para Rwt, R1 y R2 con C_M o C_B

La ausencia de sólo los residuos ácidos en R2, produjo el mismo efecto en la interacción con la subunidad C que la falta de todo el extremo N-terminal de la subunidad R, indicando que los aminoácidos ácidos cumplen un rol en la interacción R-C en PKAMc.

Para evaluar si en establecer la fuerza de interacción R-C, intervienen componentes de C además de residuos presentes en la subunidad R, se analizó la interacción de Rwt, R1 y R2 con una subunidad heteróloga. Se utilizó la C de corazón bovino (C_B). Los resultados presentados en la Figura 24B y en la Tabla 6, muestran que las diferencias en la inhibición de actividad de la subunidad C bovina por R1 y R2 cuando se compara con Rwt no son tan marcadas como el efecto observado con la subunidad C de *Mucor*, donde se analizó interacción homóloga. Sin embargo, se puede observar que la mutante R1 es la más afectada en la interacción con C_B y que R2 no se comporta en forma similar a R1, como ocurre en la interacción homóloga. Estos resultados indican la existencia de componentes específicos de la subunidad C de *Mucor* que determinan el efecto que poseen los residuos ácidos en la fuerza de interacción R-C_M.

No se pueden sacar conclusiones de las afinidades relativas Rwt-C_M y Rwt-C_B, dado que, la IC₅₀ depende de la concentración de C utilizada en el ensayo. Si bien se puede estimar la cantidad de C_B purificada recombinante, no se puede estimar la concentración de C_M semipurificada. Tampoco es válida la comparación de las unidades enzimáticas de ambos ensayos ya que no se demostró si las diferentes subunidades C tienen la misma eficiencia catalítica (*k_{cat}* para el kemptido).

I.2.6. Disociación de holoenzima reconstituida por cAMP

Se usó un segundo abordaje para evaluar la interacción de las subunidades R y C que consistió en la reconstitución y posterior activación por cAMP de

holoenzimas wt o mutantes. Se esperaba que cuanto menor fuera la afinidad entre R y C, menor sería la concentración de cAMP necesaria para promover la activación. En estos ensayos también se incluyó la reconstitución de holoenzima heteróloga usando C_B, no para comparar los parámetros absolutos con los obtenidos con la holoenzima homóloga, sino para corroborar que los efectos observados no sólo se deban a las mutaciones en la subunidad R, sino también a componentes de la subunidad C.

Se reconstituyeron las holoenzimas con Rwt, R1 o R2 y C_M o C_B incubando subunidad C con cantidades iguales de cada subunidad R de manera de obtener 60-90% de inhibición. Se determinó la actividad quinasa de las holoenzimas reconstituidas en presencia de concentraciones variables de cAMP. La figura 25, muestra la activación de las holoenzimas homólogas y heterólogas reconstituidas con Rwt, R1 y R2 con C_M o C_B respectivamente partiendo de dos porcentajes de inhibición iniciales diferentes. Para el caso de la holoenzima homóloga, partiendo del 50% de inhibición inicial, se observó que la activación máxima de las holoenzimas R1-C_M o R2-C_M se logró con una concentración de 0.1 µM cAMP, mientras que para lograr la máxima activación para la holoenzima Rwt-C_M se necesitó 10 µM cAMP. La A_{0.5} para la holoenzima Rwt-C_M fue un orden mayor que para las holoenzimas R1-C_M o R2-C_M independientemente del grado de inhibición del que se partía (Figura 25A y B y Tabla 7).

Estos resultados concuerdan con los mostrados en la figura 24A dado que la ausencia del grupo de residuos ácidos o del extremo amino terminal completo de la subunidad R dan como resultado una disminución similar en afinidad de R-C.

	A_{0,5} C_M (µM) (A)	A_{0,5} C_B (µM) (C)
Rwt	0,0480 +/- 0,01	nd
R1	0,0064 +/- 0,002	0,029 +/- 0,01
R2	0,0063 +/- 0,002	nd
	A_{0,5} C_M (µM) (B)	A_{0,5} C_B (µM) (D)
Rwt	0,060 +/- 0,02	nd
R1	0,012 +/- 0,005	0,1 +/- 0,03
R2	0,011 +/- 0,005	nd

Tabla 7- A_{0,5} para Rwt , R1 y R2 con C_M o C_B.

Las figuras 25 C y D muestran la activación por cAMP de las holoenzimas reconstituidas con Rwt, R1 y R2 con C_B partiendo también de dos grados de

inhibición iniciales diferentes. Se puede observar que en ambos casos el comportamiento de la holoenzima R1-C_B, fue completamente diferente al de las holoenzimas R2-C_B y Rwt-C_B. Cuando la subunidad R carece del dominio amino terminal completo presenta una marcada disminución de la interacción con la subunidad C_B en comparación con lo observado para las holoenzimas Rwt-C_B y R2-C_B. A la concentración de cAMP a la cual las holoenzimas Rwt-C_B y R2-C_B comienzan a activarse, la holoenzima R1-C_B se encuentra 100% activa. En este abordaje se resalta más el comportamiento diferencial de R1 en su interacción con C_B que en el ensayo de inhibición mostrado en la figura 24B.

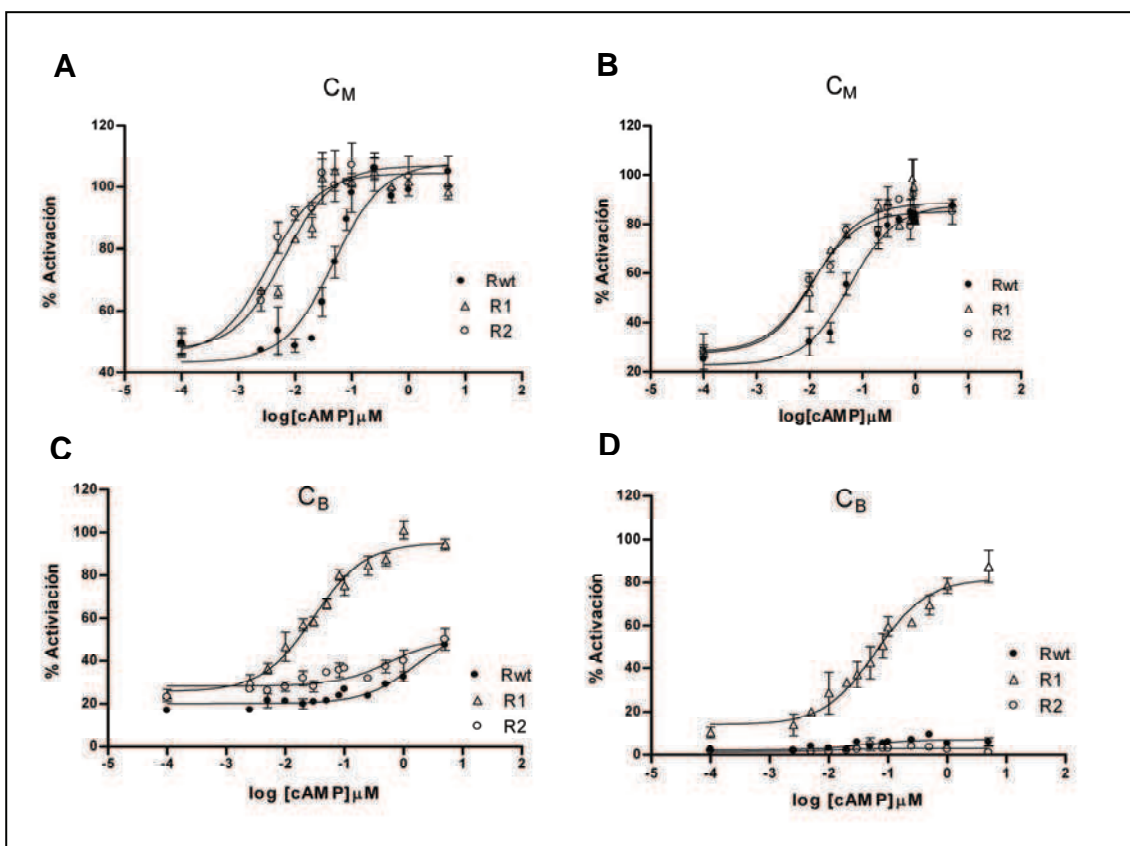


Figura 25- Ensayos de disociación de holoenzima reconstituida. C_M o C_B se preincubaron con subunidad Rwt, R1 o R2 para reconstituir la holoenzima de PKA y se realizó por medición de actividad quinasa a diferentes concentraciones de cAMP (0.001-10 μM). Las holoenzimas reconstituidas se prepararon con 0.7 U de C_M y 0.05 (A) ó 0,1 (B) pmol de Rwt, R1 o R2. Las holoenzimas heterólogas se prepararon 0,05 pmol de Rwt, R1 o R2 con 0,03 (C) y 0,01(D) pmol C_B.

Estos resultados confirman que el grupo de residuos ácidos presentes en la región *linker I* de la subunidad R de *M. circinelloides* es decisivo en la interacción R-C de la PKAMc. A partir de estos resultados podemos sugerir que determinantes

presentes en la superficie de la subunidad C también son importantes para establecer la fuerza de interacción entre las subunidades dado que el comportamiento de la mutante R2 fue diferente con C_B que con C_M .

I.2.7. Importancia de la naturaleza química del *linker I*

Los resultados presentados anteriormente podrían ser el resultado de un cambio en la conformación de R2 al carecer de una región de 16 aminoácidos de la proteína y no por la ausencia en si de una zona de residuos con características ácidas.

Como aproximación a contestar esta pregunta se realizó un ensayo de disociación de holoenzima reconstituida empleando la subunidad R de *S. cerevisiae* (R_S). Esta subunidad R tiene la particularidad de presentar una alta homología con la subunidad R de *Mucor* pero tiene un número mucho menor de residuos ácidos en el *linker I* (Figura 20). Del análisis de la comparación de secuencias del dominio D/D de distintos hongos se observó que estas poseen cierto grado de conservación. Presentan un 42% de identidad entre secuencias fúngicas y un 20% con respecto a las subunidades R de mamíferos y además están presentes los residuos esenciales para la dimerización (102). Para este ensayo reconstituimos holoenzimas con R_S , Rwt, R1 o R2 de *M. circinelloides* y C_B . En la figura 26 se puede observar que la ausencia del grupo de residuos ácidos en la R de *S. cerevisiae* determina un comportamiento para la holoenzima R_S-C_B similar al de $R2-C_B$.

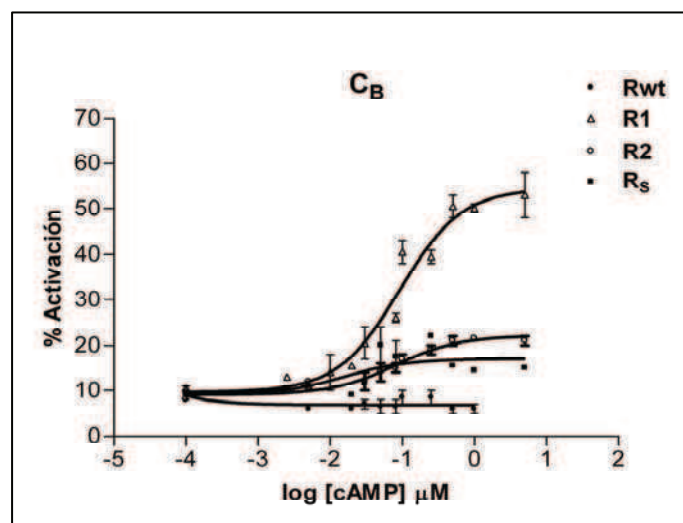


Figura 26- Naturaleza química del *linker I*. C_B se preincubó con subunidad Rwt, R1, R2 o R_S para reconstituir la holoenzima de PKA. Se midió actividad PKA a diferentes concentraciones de cAMP (0.001-10 μ M). Las holoenzimas reconstituidas se prepararon con 0.01 pmol C_B y 0.1 pmol de Rwt, R1, R2 o R_S .

Este análisis sugiere que la presencia de un alto número de residuos ácidos es importante para determinar el grado de interacción R-C.

I.2.8. Influencia de la subunidad C en la fuerza de interacción con R

Los resultados de los ensayos previos permitieron observar un comportamiento diferencial de R2 con C homóloga o heteróloga y se planteó que la fuerza de interacción R-C no sólo estaba determinada por características de R, sino que serían importantes también componentes de la subunidad C. Con el objetivo de corroborar esta hipótesis, se reconstituyó una holoenzima heteróloga con Rwt de *M. circinelloides* y la subunidad C de *S. cerevisiae* (Rwt-C_S) para evaluar la afinidad de interacción R-C heteróloga.

En la figura 27 se puede observar que la holoenzima Rwt-C_S se disocia en mayor grado a concentraciones menores de cAMP que la holoenzima Rwt-C_M. La A_{0.5} para Rwt-C_S es 0.002 mientras que para Rwt-C_M es 0.04. Estos resultados indican que para determinar la mayor interacción R-C en la PKA de *M. circinelloides* también participan elementos presentes en la subunidad C que podrían estar determinados por sus residuos de aminoácidos y su estructura.

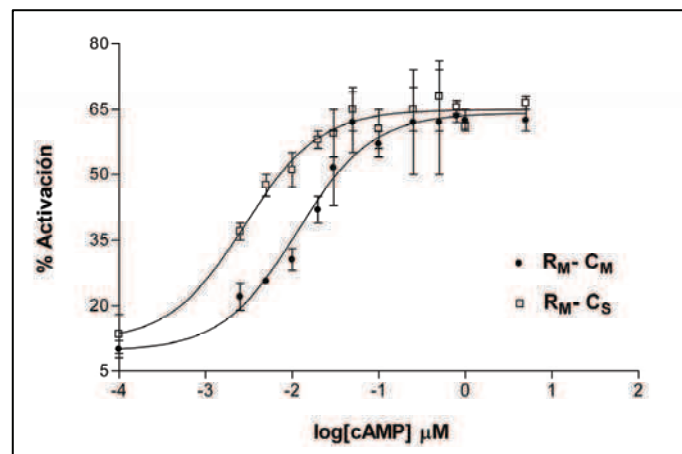


Figura 27- Participación de C en la fuerza de interacción con R Se pre incubó C_M o C_S con Rwt, para reconstituir la holoenzima de PKA. Se midió actividad PKA a diferentes concentraciones de cAMP (0.001-10 μM). Las holoenzimas reconstituidas se prepararon con 0.7U de C_M o C_S y 0.2 pmol de Rwt.

I.3. Discusión

Como mencionamos en la introducción en eucariotas superiores se demostró un modo multivalente de interacción entre las subunidades R y C de la PKA (71), ya que además de la interacción a través del sitio activo de la subunidad C con el sitio de pseudosustrato (IS) de la subunidad R (72) se describen puntos adicionales de interacción. Hasta el momento los puntos de interacción R-C descritos Incluyen: una superficie extendida en C que interacciona con IS, el *linker* II y la región helicoidal de los dominios A y B de unión a cAMP (70, 74) y distintos puntos en una región próxima al sitio activo en la subunidad C que interaccionan con la región inmediata amino terminal del IS (P-11,P-4) (75).

En un trabajo muy reciente y posterior a la publicación de nuestro trabajo, se demostró para la PKA de mamíferos que la región N-terminal al sitio inhibitorio se une en forma diferente a C en los casos de RI y RII, y se demostró también que 6 residuos hacia el N-terminal del IS, correspondientes al *linker* I, aumentan la afinidad de interacción R-C. En la estructura de la holoenzima correspondiente a una mutante RII β (102-265), se demostró que esa pequeña zona del *linker* I, hace interacción con una hoja β extendida sobre el lóbulo mayor (42). En este trabajo sin embargo, no se avanza hasta la zona que correspondería a la zona de residuos ácidos de *M. circinelloides*, pero le dan importancia al *linker* I en la interacción R-C, al igual que en este capítulo.

En trabajos de nuestro laboratorio se ha demostrado por análisis de secuencias de las subunidades R de hongos (40 hongos diferentes) que la zona bisagra correspondiente al *linker* I, IS y *linker* II, posee regiones de baja complejidad, que pueden participar en la interacción proteína-proteína (102). En este caso participarían en la interacción con la subunidad C.

Por abordajes *in vitro* con péptidos que incluyen la región del *linker* I de subunidades R de *M. rouxii* y *S. cerevisiae*, se demostró que los residuos de las posiciones P-2 a P-42 participan en la interacción R-C (233).

En este capítulo de la tesis se enfocó el estudio en una secuencia no conservada del *linker* I, y se propuso que este dominio podría explicar las diferencias en la afinidad de interacción R-C observadas entre especies. Se analizó la influencia del grupo de residuos ácidos presentes dentro de esta región de las subunidades R de algunos hongos como *M. circinelloides*. Por trabajos previos (111,

115, 230) y por este trabajo se sabe que la interacción R-C en la PKA de *Mucor* es mayor que en otros modelos. En este capítulo se demostró que la remoción del grupo de residuos ácidos de la subunidad R produce una disminución en la afinidad hacia la subunidad C, y que esa disminución es igual a la disminución producida por la falta del extremo amino terminal completo. Este resultado explica la necesidad del agregado de fuerza iónica o policationes para promover la disociación completa de la holoenzima en ensayos *in vitro*.

Los residuos ácidos tienen un impacto menor en la interacción de la subunidad R de *Mucor* con una subunidad C heteróloga como C_B. Se infiere a partir de estos resultados la necesidad de una superficie complementaria en la subunidad C capaz de interactuar con residuos ácidos. La falta del extremo amino terminal completo en la R fúngica logra disminuir la interacción con la C heteróloga, destacando la importancia general del *linker* I en la interacción R-C en las PKAs.

En resumen, se demostró la importancia de la región *linker* I en la interacción R-C y en particular se destaca que el tipo de residuos que conforman la región tienen importancia en determinar las diferencias de interacción R-C observadas entre especie.

CAPITULO II

Isoformas de subunidad R

II.1. Introducción y objetivos específicos

Los hongos filamentosos se caracterizan por su habilidad para formar hifas altamente polarizadas, lo cual constituye un prerrequisito para la eficiente colonización de sus nichos biológicos y la utilización de sustratos. Durante el crecimiento vegetativo, el establecimiento de la polaridad es un paso importante para la emisión primaria del tubo germinativo a partir de la espora y para emitir ramificaciones a partir de las hifas preexistentes. Una vez que se estableció la polaridad se debe mantener durante la extensión de la hifa. Componentes estructurales del citoesqueleto, principalmente actina, juegan un rol primordial en establecer y mantener el crecimiento polar (125). Uno de los reguladores claves de la polaridad en hongos, así como de otros procesos como el desarrollo, crecimiento y virulencia es la vía de señalización por PKA (92, 93). En algunos hongos se observan fenotipos muy severos frente a la anulación de los genes de la vía de PKA (137, 234) mientras que en otros los efectos son más sutiles (142). *M. circinelloides* es un hongo dimórfico que pueden desarrollarse como levaduras multipolares y como micelio filamentosos en respuesta a numerosas condiciones ambientales que incluyen la disponibilidad de nutrientes y la atmósfera gaseosa (119).

El objetivo de esta parte de la tesis fue evaluar en forma directa la participación de la PKA en la morfología y desarrollo de *M. circinelloides*. Para esto se construyó una cepa mutante que carece del gen *pkaR*, que codifica para la subunidad R descrita hasta ese momento, denominada en este trabajo PKAR1.

El análisis de las características fenotípicas y bioquímicas de la cepa mutante dieron indicios de que deberían existir otras isoformas de R.

Durante el desarrollo del trabajo presentado en este capítulo de la tesis, se tuvo acceso a la base de datos del genoma de *M. circinelloides*. Si bien en ese momento la secuencia del genoma no estaba completa ni era de acceso público, nos permitió corroborar la existencia de más de un gen codificante para la subunidad R de PKA.

El objetivo final de este capítulo fue entonces la identificación y el análisis funcional de las isoformas de R. Se identificaron cuatro isoformas de subunidad R: PKAR1, PKAR2, PKAR3 Y PKAR4. Se analizó la expresión de cada uno de los genes *pkaR* en distintos estadios del desarrollo y se estudió la participación en la morfología y desarrollo de las isoformas PKAR1 y PKAR2, mediante la construcción

de cepas *knockout* para los genes que las codifican. Finalmente, se realizó un análisis de posibles modificaciones post-traduccionales de las isoformas de PKAR.

II.2. Resultados

II.2.1. Construcción de la cepa *knockout* para el gen *pkaR1*

Antecedentes de nuestro laboratorio indicaban la participación de la vía de cAMP-PKA en la morfología de *M. rouxii* (134, 135) y *M. circinelloides* (112, 127).

Para evaluar en forma directa el rol de la PKA en el desarrollo y la diferenciación, se decidió construir una cepa *knockout* para el gen codificante para la subunidad R, conocido y descrito hasta ese momento. Si bien la nomenclatura fue establecida posteriormente a la construcción de esta primera cepa mutante, para simplificar la lectura se denominará al gen anulado en esta cepa *pkaR1*. Esta parte del trabajo, obtención de la cepa mutante $\Delta R1$, fue realizada en colaboración con el Dr. Victoriano Garré de la Universidad de Murcia, España.

La construcción de la cepa se realizó mediante reemplazo génico, usando un vector *knockout* que contiene al gen *pyrG* como marcador de selección rodeado por secuencias del gen *pkaR1* del largo suficiente para permitir la recombinación homóloga. El gen *pyrG* codifica para la enzima orotidina 5'-fosfato-decarboxilasa, que participa de la vía de síntesis de las pirimidinas. Se transformó la cepa Mu402 de *M. circinelloides* (*wilde type* para PKA, pero auxotrófa para uracilo y leucina) con un fragmento de restricción del vector *knockout* según se describe en materiales y métodos. Se obtuvieron varias transformantes iniciales que se crecieron durante varios ciclos vegetativos hasta obtener finalmente una transformante homocariote que denominamos $\Delta R1$.

La disrupción del gen *pkaR1* se confirmó mediante análisis por *Southern blot* y PCR (Figura 28A y B). El *Southern blot* del DNA de la transformante y de la cepa parental se reveló con una sonda de *pkaR1* que hibrida tanto con el alelo wt como con el interrumpido (Figura 28A, panel izquierdo). El DNA de la cepa transformante mostró la presencia de un fragmento con el incremento de tamaño esperado de 2,6 kb comparado con el fragmento de la cepa wt. Esto indica el reemplazo de 0,6 kb de DNA del alelo wt por el fragmento de 3,2 kb correspondiente al marcador *pyrG* (Figura 28D). Para confirmar la interrupción del gen, se utilizó una sonda interna de *pkaR1* que hibrida sólo con el gen wt (Figura 28A, panel derecho). La ausencia de banda revelada en la cepa transformante, confirma que la misma es homocariote para la anulación del gen *pkaR1*.

Este resultado también se corroboró mediante PCR utilizando un *primer* (p1) que hibrida con una región de *pkaR1* por fuera de la secuencia reemplazada y otro *primer* (p2) que hibrida dentro del marcador de selección *pyrG* (Figura 28B).

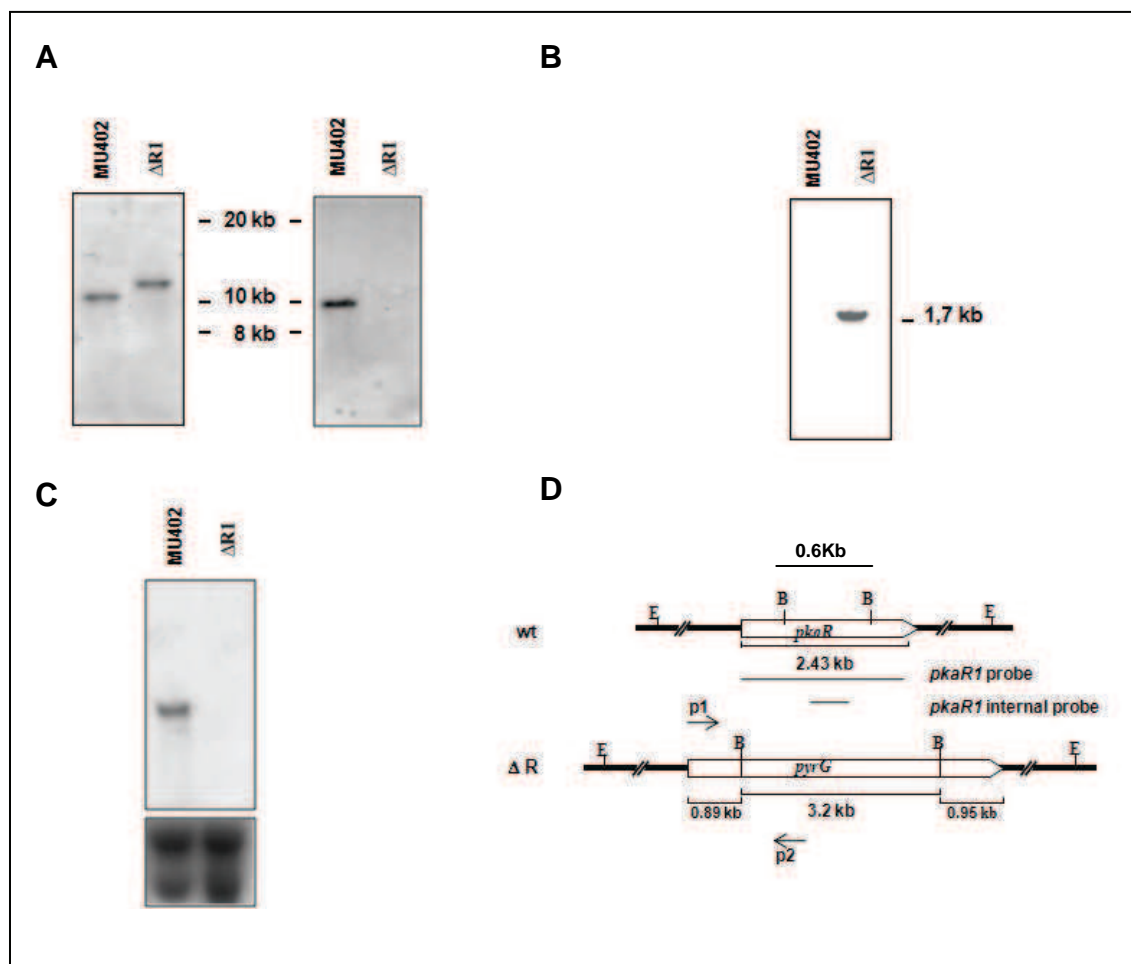


Figura 28- Anulación del gen *pkaR1*. (A) Se digirió con *EcoRI* DNA genómico de la cepa wt Mu402 y de la cepa *knockout* para *pkaR1* ($\Delta R1$) y se los hibridó con la sonda *pkaR1* (panel izquierdo) y con una sonda interna (panel derecho). Las posiciones y los tamaños de los fragmentos de DNA están indicados en la parte central de ambos *Southern blot*. (B) La PCR se llevó a cabo con los *primers* p1 y p2 que hibridan dentro de *pkaR1* y *pyrG* respectivamente. (C) *Northern blot* realizado con la sonda *pkaR1*, en el panel de abajo se muestra el RNA total cargado en cada calle teñido con BrEt. (D) Estructura genómica del locus wt de *pkaR1* y luego de la recombinación homóloga con el reemplazo de fragmento. Están indicados los *primers* y las sondas usadas (E: *EcoRI*, B: *BglII* en la cepa wt y *BglII/BamHI* en la cepa mutante).

Finalmente, se analizó la expresión del gen *pkaR1* mediante *Northern blot* en las cepas wt y $\Delta R1$. Para preparar el RNA, ambas cepas fueron crecidas en condiciones anaeróbicas (crecimiento levaduriforme) durante 16 hs y luego crecidos

en condiciones aeróbicas durante 4 hs. Estas condiciones de cultivo a las que se hará referencia como: transición anaerobiosis-aerobiosis, fueron elegidas ya que resultados previos sugerían una mayor expresión de *pkaR1* en estas condiciones (112).

Sólo se observó la banda correspondiente al gen *pkaR1* en la cepa wt confirmando que la cepa mutante carece de un gen *pkaR1* funcional (Figura 28C).

II.2.2. Caracterización bioquímica de la cepa $\Delta R1$

Como en el momento en que se construyó la cepa $\Delta R1$ estaba descrita una única subunidad R de PKA en *M. circinelloides*, se esperaba que anular el gen que codifica para la subunidad R, resultara en la pérdida total de la capacidad de unión a cAMP, y que consecuentemente, la actividad de PKA, perdiera su regulación por cAMP. Para verificar estas predicciones se midieron estas actividades tanto en la cepa wt como en la mutante $\Delta R1$.

II.2.2.a. Ensayo de unión a cAMP

Como se había descrito que la expresión de *pkaR1* era mayor en la transición anaerobiosis-aerobiosis (112), se midieron en primera instancia los niveles de unión a [³H]cAMP en esa situación. En estos ensayos y en los subsiguientes se utilizó como cepa wt para PKA la cepa R7B, ya que presenta el mismo fondo genético que la mutante $\Delta R1$ (*leu*), por lo tanto cualquier cambio observado en la mutante fue considerado debido a la ausencia de *pkaR1* y no a la presencia del marcador *pyrG*.

El ensayo de unión a cAMP se realizó en extractos crudos de las cepas R7B y de la mutante $\Delta R1$ crecidas en medio mínimo MMC hasta emisión del tubo germinativo, 4 hs luego de la transición anaerobiosis-aerobiosis. En presencia de una cantidad saturante de cAMP, la cepa mutante $\Delta R1$ mostró una disminución de 3 veces en la actividad de unión a cAMP en comparación con la cepa wt. Si bien se detectó esta disminución, la actividad, seguía siendo significativa y no nula como se esperaba. También se realizaron mediciones de actividad de unión a cAMP en extractos crudos de las cepas wt y $\Delta R1$ provenientes de la transición anaerobiosis-aerobiosis crecidas en medio rico YPG pH 4,5 y en este mismo medio en condiciones aeróbicas obteniéndose resultados similares (Figura 29A).

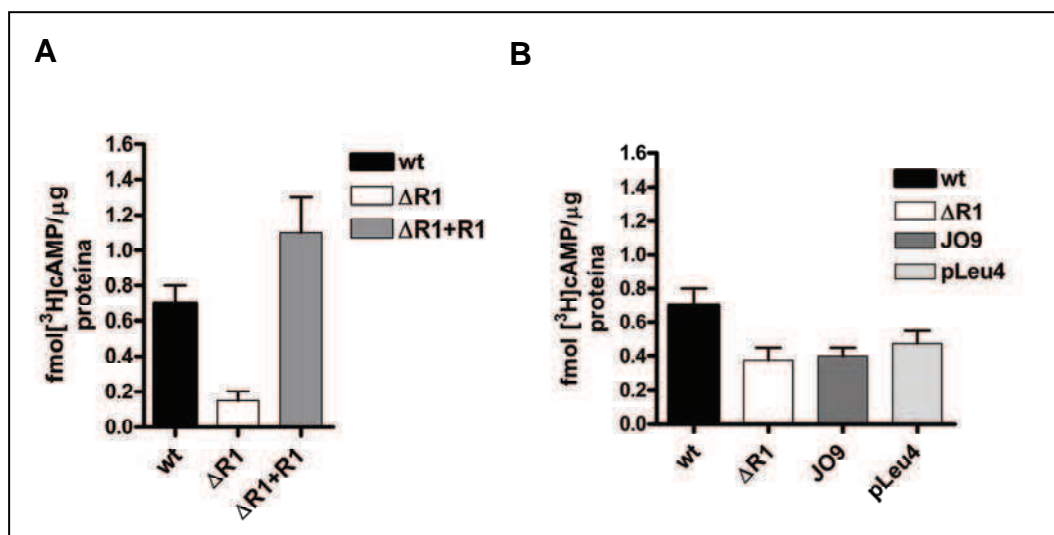


Figura 29- Ensayo de unión a cAMP. Se midió actividad de unión a [³H]cAMP en extractos crudos provenientes de las cepas **(A)** wt, ΔR1 y (ΔR1+R1) y **(B)** wt, ΔR1, (ΔR1+ JO9) y (ΔR1+ pLeu4) crecidas en condiciones de transición aerobiosis-anaerobiosis en A y de aerobiosis en B. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de cinco ensayos realizados con preparaciones independientes. Los datos están presentados como la media +/-SD de cuatro replicados en cada ensayo.

Para corroborar que la disminución de la actividad de unión a cAMP se debía a la ausencia del gen *pkaR1*, se transformó a la cepa ΔR1 con un plásmido autorreplicativo (pEUKA4R), que contiene el marcador de selección *leuA* y el alelo wt de *pkaR1* bajo el promotor *gpd1*, inducible por glucosa. El gen *leuA* codifica para la enzima α-isopropilmalato isómerasa que participa en la vía de síntesis de leucina. La cepa ΔR1 transformada con el plásmido pEUKA4R denominada ΔR1+R1, presentó una actividad de unión a cAMP 5 veces mayor que la cepa ΔR1 y 1,5 veces mayor que la cepa wt debido a la sobreexpresión del gen *pkaR1* (Figura 29A). El gen *pkaR1* se sobreexpresó utilizando un promotor heterólogo debido a que no se observó expresión cuando se utilizó el plásmido JO9 que contenía el alelo wt mas una secuencia que incluía 0,5 kb adicionales río arriba del gen descrita como la región promotora del gen (112)(Figura 29B). Seguramente, esta construcción no debió contener el promotor completo y funcional del gen *pkaR1*. Finalmente, también se transformó a la cepa ΔR1 con el vector pLeu4 que lleva el marcador *leuA*, para tener la seguridad que los cambios observados al complementar la mutación se deban al aporte del gen *pkaR1* y no sea un efecto de la presencia del marcador de selección *leuA* (Figura 29B). En este caso, el ensayo se realizó en

extractos crudos de las cepas crecidas en forma aeróbica en medio rico YPG pH 4,5 durante 4 hs.

II.2.2.b. Medición de actividad quinasa de $\Delta R1$

Para determinar la actividad quinasa, se utilizaron muestras semipurificadas de la cepa wt y de la cepa $\Delta R1$ crecidas en condiciones aeróbicas 4 hs. Se purificaron por cromatografía de intercambio iónico por resina de DEAE-celulosa. El ensayo se realizó en la fracción eluida con 0,35 M NaCl en presencia y ausencia de cAMP.

Aunque tanto la cepa mutante como la cepa wt muestran actividad con dependencia de cAMP, la relación de actividades $-/+$ cAMP fue mayor en la cepa mutante (0,6) que en la wt (0,23) indicando una menor dependencia de cAMP en $\Delta R1$. Además, la actividad de PKA total medida en presencia de cAMP fue 2,5 veces mayor en la cepa wt que en la cepa mutante (Figura 30).

Los resultados indican que la ausencia de la subunidad regulatoria codificada por el gen *pkaR1* modifica la actividad quinasa haciéndola menos dependiente de cAMP, pero esta regulación no fue eliminada por completo.

La presencia de actividad de unión a cAMP y la dependencia con cAMP de la actividad quinasa en $\Delta R1$, sugirieron la existencia de más de un gen de subunidad R en *M. circinelloides*

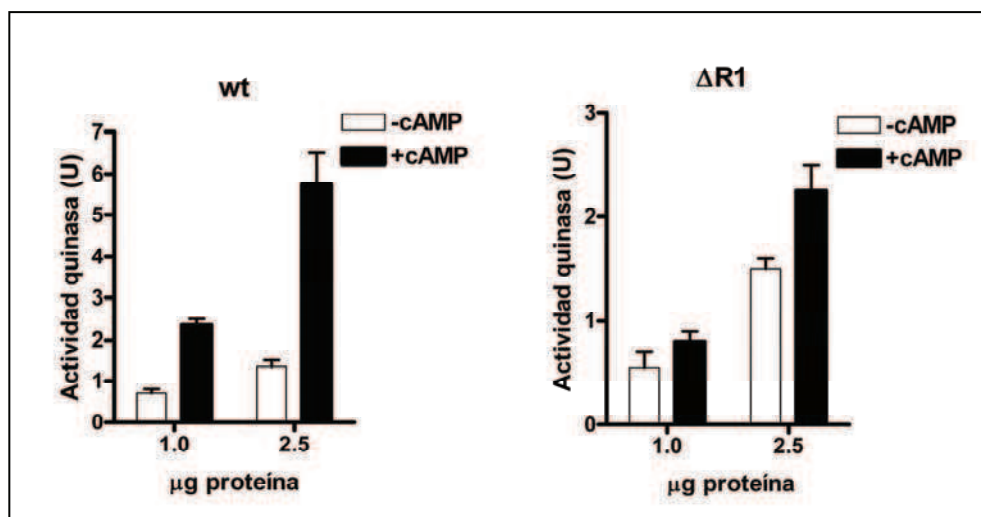


Figura 30- Determinación de actividad quinasa. Se midió actividad quinasa en muestras de fracciones semipurificadas provenientes de cultivo aeróbico crecido durante 4 hs de las cepas wt y $\Delta R1$ en ausencia y presencia de cAMP. La actividad quinasa se expresa en unidades (U) según se define en materiales y métodos. Los datos mostrados corresponden a cinco ensayos realizados con preparaciones independientes. Los valores están presentados como la media \pm SD de cuatro replicados en cada ensayo.

I.2.2.c. Análisis por *Western blot*

La posibilidad de la existencia de otros genes *pkaR* se reforzó cuando preparaciones de subunidad R purificadas por cromatografía de afinidad de cAMP-agarosa de las cepas wt, $\Delta R1$ y de la cepa complementada $\Delta R1+R1$, se analizaron por *Western blot* revelado con un anticuerpo policlonal contra la subunidad R de *M. rouxii*. Las muestras de las cepas wt y $\Delta R1+R1$ presentaron una banda que estaba ausente en la muestra de la mutante $\Delta R1$, sugiriendo que la misma correspondía al producto del gen *pkaR1*. Dos bandas adicionales se revelaron en todas las cepas (Figura 31), las cuales podían corresponderse a los productos de otros genes *pkaR*.

En conjunto, los resultados de medición de actividad de unión a cAMP, actividad quinasa y *Western blot* indicaron la existencia de otras isoformas de subunidad R en *M. circinelloides*.

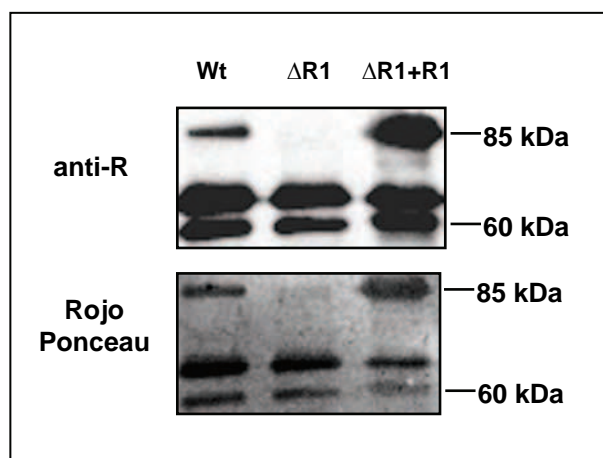


Figura 31- Análisis por Western-blot. Se analizaron muestras provenientes de cultivos aeróbicos de 4 hs purificadas mediante cromatografía de afinidad de cAMP-agarosa mediante SDS-PAGE y *Western blot* revelado con anticuerpo policlonal anti-R de *M. rouxii*. Debajo de cada calle se muestra el control de carga teñido con Rojo Ponceau.

II.2.3. Crecimiento y esporulación de la mutante nula de *pkaR1*

Se monitoreó el rol de *pkaR1* en la morfología y en el crecimiento de la hifa analizando el fenotipo de las cepas wt, $\Delta R1$ y $\Delta R1+R1$ en medio sólido y líquido en condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y luego de la transición anaerobiosis-aerobiosis.

El crecimiento radial en medio sólido de la cepa wt fue 1,5 veces mayor que en la cepa $\Delta R1$ (Figura 32A). La mutante además mostró una reducción significativa de la producción de esporas (Figura 32B), no obstante el tamaño de las esporas fue el mismo en ambas cepas.

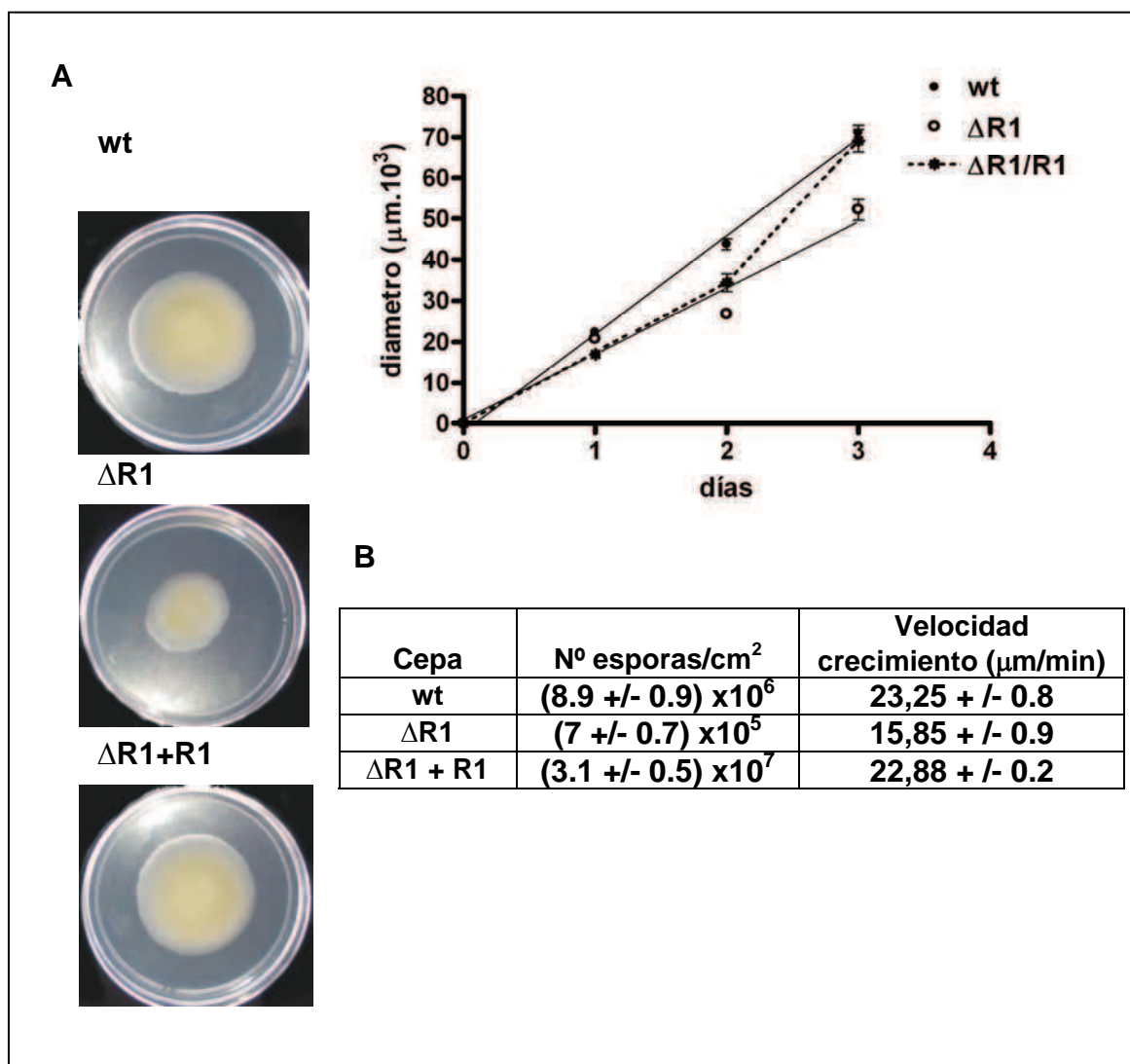


Figura 32- Crecimiento y esporulación de la mutante $\Delta R1$. (A) Se inocularon alícuotas de igual concentración de esporas de las cepas indicadas en placas de medio mínimo a pH 4,5 por triplicado y se monitorearon durante 3 días. Panel derecho, representación gráfica de la velocidad de crecimiento radial calculado a partir de tres experimentos. (B) Se plaquearon cien esporas de cada cepa en placas de medio mínimo por triplicado y se incubaron a 30°C durante 5 días. Se cortaron trozos de agar de 1cm² para calcular la producción de esporas.

El fenotipo alterado de la mutante fue revertido luego de introducirle el alelo wt de *pkaR1*. Por lo tanto, la transformante complementada presenta una velocidad de crecimiento radial y una producción de esporas similar a la cepa wt (Figura 32A y B). La cepa complementada presentó dos pendientes de crecimiento en función del tiempo y se estimó su velocidad tomando los puntos iniciales y finales. Las diferencias entre la cepa transformada y la wt, probablemente sean un efecto de la sobreexpresión de *pkaR1* por haberse utilizado un plásmido de alto número de copias bajo el promotor *gpd1* (promotor fuerte inducible por glucosa).

II.2.4. Morfología y germinación de la mutante nula de *pkaR1*

Las velocidades de crecimiento en medio líquido en aerobiosis de las cepas wt, $\Delta R1$ y $\Delta R1+R1$ fueron similares y tampoco se observaron diferencias en el peso húmedo y peso seco del micelio después de 80 hs de crecimiento. Al examinar microscópicamente los cultivos se encontró que las cepas wt y $\Delta R1$ diferían en la cinética de crecimiento, el volumen de la célula madre y la longitud del tubo germinativo.

En los cultivos crecidos en condiciones aeróbicas durante 3 hs, el volumen de las células $\Delta R1$ fue menor que el de la cepa wt. Estas diferencias se revirtieron parcialmente en la cepa complementada. La emisión del tubo germinativo en estas condiciones de crecimiento fue más temprano en la cepa mutante que en la cepa wt (Figura 33A). Si bien la mutante $\Delta R1$ germina más temprano su cinética de crecimiento luego se retrasa respecto a la cepa wt, ya que a las cuatro horas presenta tubos germinativos más cortos.

En cultivos crecidos en condiciones de transición anaerobiosis-aerobiosis, la mutante mostró en ambos aspectos del crecimiento un fenotipo distinto al de la cepa wt. El volumen de la levadura de la cepa mutante fue 2,5 veces menor que el de la wt (Figura 33B) y luego de la transición a aerobiosis el tubo germinativo de la cepa mutante fue más corto que el de la cepa wt (Figura 33C). El fenotipo de la transformante complementada es difícil de comparar dado que sus células en crecimiento anaeróbico presentaban una morfología deformada y aparecen en grupos. Esta morfología puede deberse a la alta actividad de unión de cAMP de la cepa (Figura 29A).

En resumen, la anulación del gen *pkaR1* afecta el crecimiento, la esporulación, la emisión del tubo germinativo y la morfogénesis de levadura a hifa.

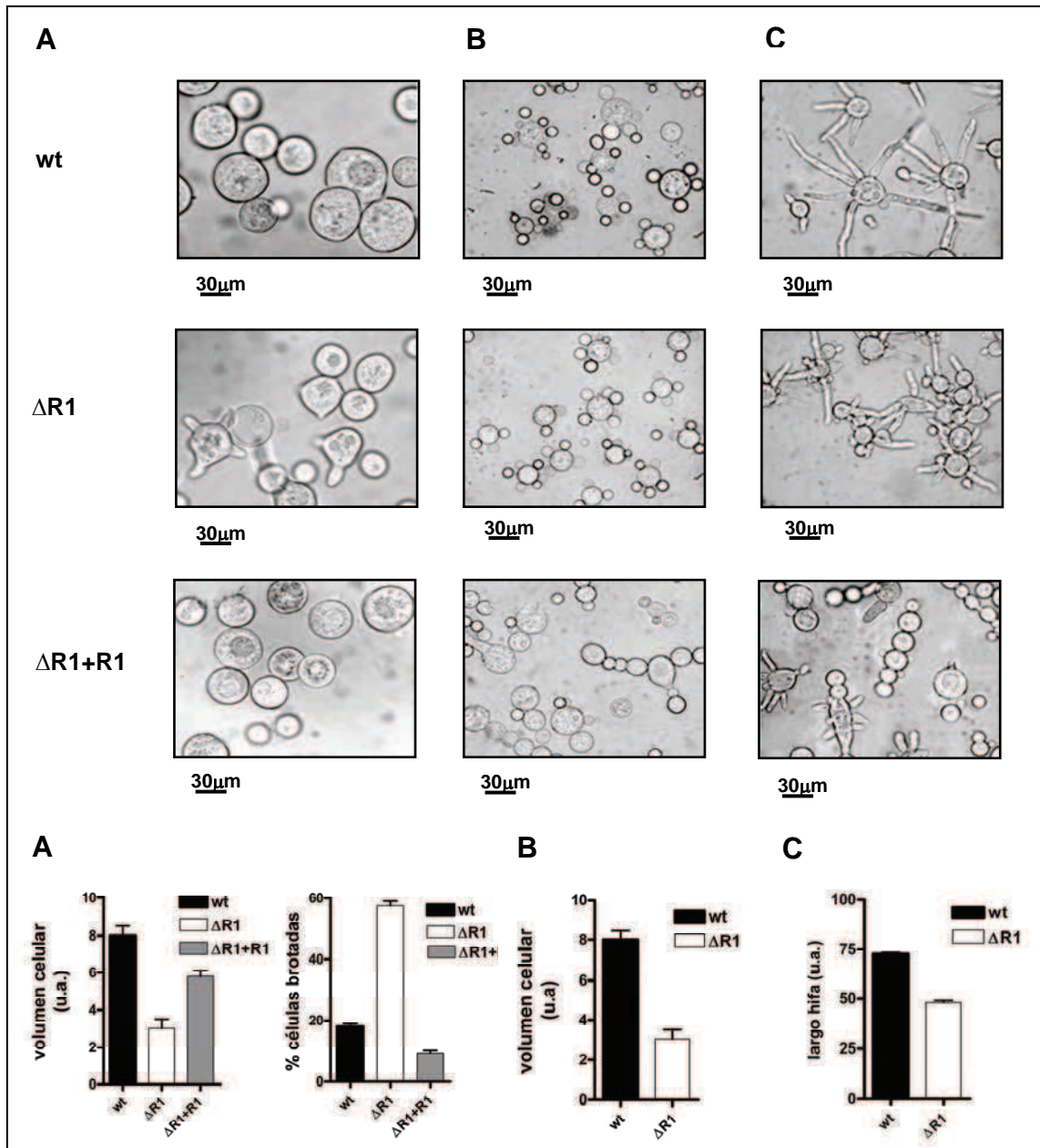


Figura 33- Morfología y germinación de la mutante nula de *pkaR1*. Examen microscópico de las cepas indicadas (A) crecidas durante 3 hs en aerobiosis en medio YPG pH 4,5. Se calculó el volumen de la célula madre y el número de células con tubo germinativo emitido y se expresó como porcentaje del total de células. (B) Células crecidas una noche en condiciones anaeróbicas. Volumen de la célula madre. (C) Cultivos crecidos en condiciones de transición anaerobiosis-aerobiosis. En el gráfico se representa el promedio del largo del tubo germinativo. Los volúmenes se estimaron a partir de los diámetros medidos en unidades arbitrarias (u.a.). Cada valor representa la media +/- SEM para tres experimentos independientes. Para el cálculo de estos parámetros se analizaron en cada experimento 300 células.

II.2.5. Identificación de otros genes *pkaR* en *M. circinelloides*

En paralelo a nuestras investigaciones en el instituto Joint Genome (<http://www.jgi.doe.gov>) se estaba llevando a cabo el proyecto de secuenciación del

genoma de *M. circinelloides*. Si bien en ese momento la secuenciación no estaba completa y no era de acceso público, se pudo por la colaboración establecida con la Universidad de Murcia, utilizar un ensamblado preliminar generado usando una cobertura de secuencia 4x. Se realizó una búsqueda empleando el programa blast tomando como secuencia de partida la disponible de *pkaR1*.

Se encontraron en la secuencia del genoma de *M. circinelloides* tres secuencias diferentes, además de *pkaR1*, con los parámetros *e-value* y *score* significativos. Se realizó un alineamiento de secuencias con las secuencias de aminoácidos deducidas y se encontró que todas las secuencias presentaban alta similitud con otras subunidades regulatorias de PKA y mantenían los residuos altamente conservados. Por lo tanto a estos genes se los llamó *pkaR2*, *pkaR3* y *pkaR4*. Los números de acceso en el genoma de *M. circinelloides* son fgeneshMC_pm.13_#_2, e_gw1.8.247.1, e_gw1.2.493.1, respectivamente.

La región más conservada de las subunidades R son los CNB y dentro de estos particularmente el PBC. En los sistemas de mamíferos las subunidades R se clasifican en tipo I y tipo II. Las R de tipo II contienen en el IS un sitio real de sustrato con una serina fosforilable seguida de un residuo hidrofóbico (ψ) y una cisteína (RRxS ψ C), pero las subunidades R de tipo I tienen una secuencia IS de pseudosustrato que presenta un aminoácido no-fosforilable seguida de un residuo hidrofóbico y una serina (RRx[A/G] ψ S). Las subunidades R de hongos se asemejan a las R de tipo II en que presentan la serina fosforilable en el IS, pero se asemejan a las R de tipo I en presentar la serina en vez de cisteína en la posición P+2. Por estas particularidades las R de hongos se clasifican como un grupo aparte basado en un análisis filogenético que compara el PBC de las secuencias (55).

Antecedentes del laboratorio que surgen del alineamiento de 40 secuencias de R de hongos contrastadas con 65 secuencias de R de mamíferos demuestran que los dominios CNB están altamente conservados especialmente en la zona correspondiente al PBC presentando un 50% de identidad entre secuencias fúngicas y un 40% de identidad respecto a secuencias de mamíferos (102).

El extremo amino terminal de las subunidades R es la región menos conservada excepto por la porción más extrema que constituye el dominio de dimerización y anclaje. Los dominios D/D presentan cierto grado de conservación. En el mismo trabajo se describe también, como mencionamos en el capítulo I, que si bien no todos los hongos presentan esta secuencia, en las que está presente se

observa un 42% de identidad entre secuencias fúngicas y un 20% de identidad respecto a la de mamíferos. Dentro del D/D existen 12 residuos que se conservan en identidad o propiedades fisicoquímicas en todas las secuencias analizadas.

Como ocurre con todas las subunidades R, en las PKAR de *M. circinelloides* existe una alta similitud en el extremo carboxilo terminal que incluye los sitios A y B de unión a cAMP y en el IS (Figura 34). El N-terminal es el menos conservado pero se conservan los 12 residuos mencionados.

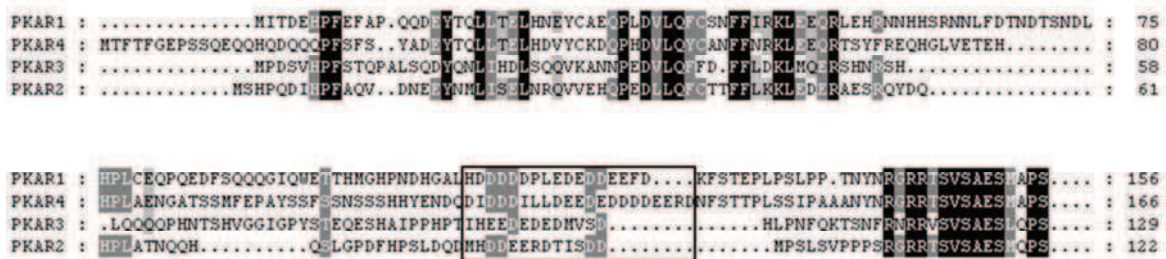


Figura 34- Proteínas PKAR. Alineamiento de secuencia del extremo N-terminal de las proteínas PKAR de *M. circinelloides*. Se muestra sólo el extremo N-terminal de las secuencias de las proteínas PKAR. Los residuos idénticos se indican con letras blancas sobre fondo negro y los similares con sombreado gris. La región rica en residuos ácidos se encuentra recuadrada.

Para verificar si los genes *pkaR* se expresan como subunidades R e identificar cada isoforma, se purificaron las proteínas a partir de las cepas wt y $\Delta R1$ provenientes de cultivos aeróbicos de 4,30 hs a través de cromatografía de afinidad usando resina de cAMP-agarosa y se analizaron las proteínas purificadas mediante SDS-PAGE y tinción con *Coomassie Blue* coloidal o *Western blot* usando anticuerpo anti-R de *M. rouxii*. Las bandas proteicas fueron analizadas por espectrometría de masas.

Se identificaron tres bandas principales en las fracciones purificadas de la cepa wt y dos en las fracciones purificadas de $\Delta R1$. Todas positivas para la detección con el anticuerpo anti-R (Figura 35A) como se mencionó anteriormente. Los espectros de MALDI-TOF obtenidos a partir de digestos trópticos de las bandas proteicas, permitieron identificar a la banda de menor movilidad, que estaba presente en la cepa wt pero no en $\Delta R1$, como el producto del gen *pkaR1* con un score de 126 y un e-value de $8,6 \times 10^{-8}$ (Figura 35B), siendo el porcentaje de cobertura del 40% con una identificación de 17 péptidos del total de los posibles de la proteína. Para identificar a las otras bandas, se predijo *in silico* las masas de los

péptidos trípticos teóricos de PKAR2, PKAR3 y PKAR4, permitiendo un corte perdido, y se comparó con las masas de los péptidos obtenidos del espectro de MALDI-TOF-MS.

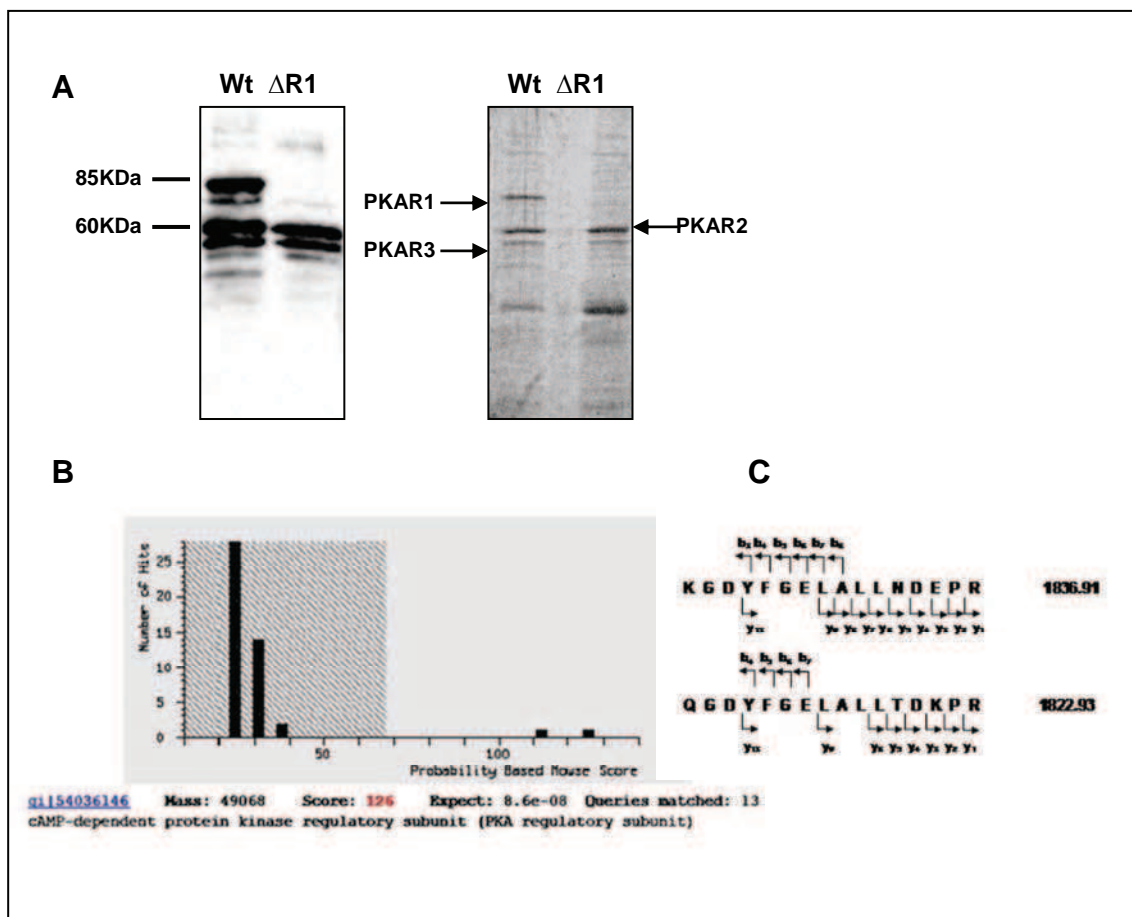


Figura 35- Identificación de los genes *pkaR*. (A) Purificación por cAMP-agarosa de las proteínas con actividad de unión a cAMP. Panel izquierdo *Western blot* revelado con anticuerpo anti-R. Panel derecho tinción con *Coomassie Blue* coloidal. Las flechas indican las proteínas PKAR identificadas. (B) Resultado de la búsqueda en MASCOT del análisis del MS obtenido por MALDI-TOF de PKAR1. (C) Iones *y* y *b* obtenidos de un péptido (1836,91 de PKAR2 y 1822,93 de PKAR3) de cada espectro de MALDI-TOF de PKAR2 y PKAR3 respectivamente.

Con este análisis se pudo identificar a las bandas de PKAR2 y PKAR3 dado que se encontraron 12 péptidos de PKAR2 que representaban un 27% de cobertura y 11 péptidos de PKAR3 que representaban un 29.1% de cobertura de las proteínas completas. Para verificar la identidad de estas bandas se realizó un análisis de MS/MS de un péptido representativo de cada proteína. Se tomó el ión 1836.91 de PKAR2 y el 1822.93 de PKAR3. En ambos casos se pudo identificar varios iones de

las series *y* y *b* confirmando la identidad de las bandas (Figura 35C). Si bien por *Western blot* se revelaba una cuarta banda con anti-R, la subunidad PKAR4 no se pudo identificar por espectrometría de masas en las condiciones del ensayo (crecimiento aeróbico 4,30 hs). La banda de mayor movilidad teñida con *Coomasie Blue* coloidal, que no es positiva por *Western blot*, se identificó como gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

II.2.6. Expresión de los genes *pkaR*

II.2.6.a. Análisis de los niveles de mRNA de los genes *pkaR* en distintas condiciones de crecimiento

Se analizó la expresión de los mRNA de la cepa wt crecida en medio líquido en aerobiosis, anaerobiosis y en la transición anaerobiosis-aerobiosis. Se midieron los niveles de los transcritos de cada gen *pkaR* mediante RT-PCR semicuantitativa utilizando el mRNA del gen *tef-1* (factor de elongación) para normalizar los resultados, ya que sus niveles no presentan variación en los distintos tipos de morfología celular (235). Estos análisis se realizaron con la colaboración de Lucas Fernández Núñez, estudiante de doctorado del laboratorio.

Se encontraron diferencias en la expresión de cada gen *pkaR* durante el crecimiento en aerobiosis (Figura 36A).

En esporas, el nivel del mRNA de *pkaR3* fue mayor, comparado con el de las otras tres isoformas. Su nivel baja cuando se produce la emisión del tubo germinativo a las cuatro horas y se mantiene bajo durante el crecimiento a través de las 8 y 16 horas. Por el contrario, los niveles de mRNA de *pkaR1*, comienzan a aumentar a las 4 horas y aumentan aún más a las 8 horas de crecimiento. Entre las 5 y 8 horas de crecimiento también se incrementan los niveles de los mRNA de *pkaR2* y *pkaR4*. Pero los niveles más altos logrados en este momento son los del mRNA de *pkaR1*. Luego de las 16 horas los niveles de *pkaR1* y *pkaR2* permanecen altos pero los de *pkaR4* disminuyen.

También se analizaron los niveles de mRNA de los genes *pkaR* durante la transición anaerobiosis-aerobiosis (Figura 36B). En anaerobiosis los niveles de mRNA de *pkaR1* y *pkaR2* fueron similares y más altos que los de *pkaR3*, mientras que los de *pkaR4* fueron indetectable. Luego del pasaje a aerobiosis durante 4 hs el mayor cambio observado fue el incremento de los niveles del mRNA de *pkaR4*.

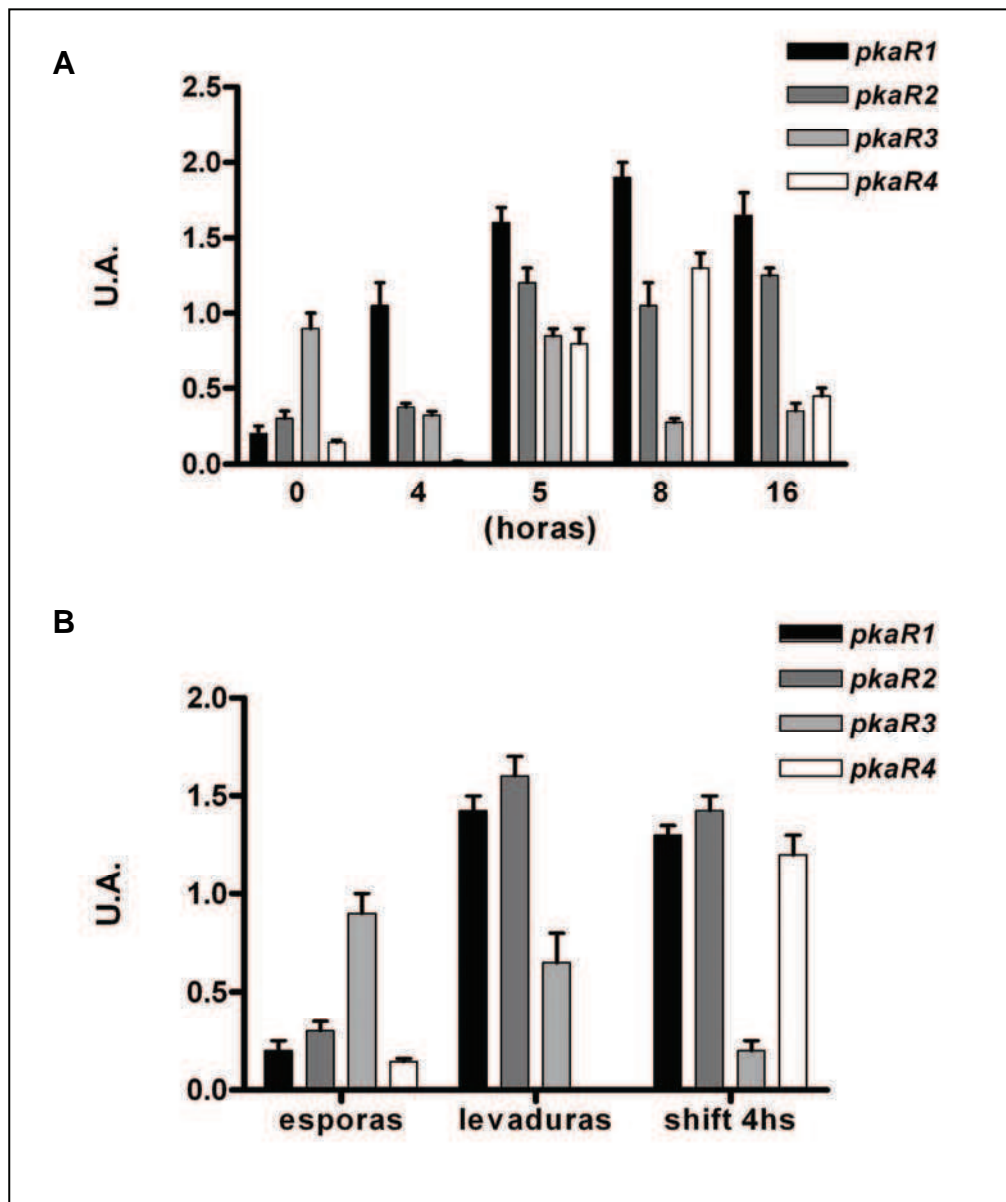


Figura 36- Expresión de genes *pkaR*. Se midió mediante PCR semicuantitativa la abundancia relativa de los mRNA de cada gen *pkaR* normalizado respecto al gen *tef-1*. El mRNA se extrajo de cultivos crecidos durante (A) 0 (esporas), 4, 8 y 16 hs en condiciones aeróbicas y (B) cultivos crecidos toda la noche en anaerobiosis y transferidos a aerobiosis durante 4 hs. Las bandas correspondientes a los productos de PCR se analizaron y cuantificaron expresando la intensidad en unidades arbitrarias (u.a.) relativo a la intensidad de banda del gen *tef-1*. Cada valor representa la media +/- SD de cuatro experimentos independientes.

En resumen, *pkaR3* fue el gen de mayor expresión en esporas, *pkaR2* y 3 presentaron altos niveles de expresión tanto durante el crecimiento aeróbico como anaeróbico y la expresión de *pkaR4* se indujo marcadamente luego de la transición anaerobiosis-aerobiosis. Estos resultados sugieren que cada isoforma de *pkaR*

podría cumplir un rol diferencial durante el crecimiento y la diferenciación de *M. circinelloides*

Se analizaron también los niveles de expresión de los distintos genes *pkaR* en condiciones de crecimiento aeróbico, anaeróbico o transición anaerobiosis-aerobiosis en la mutante $\Delta R1$ con el fin de analizar si existía algún tipo de regulación de la expresión entre ellos (Figura 37).

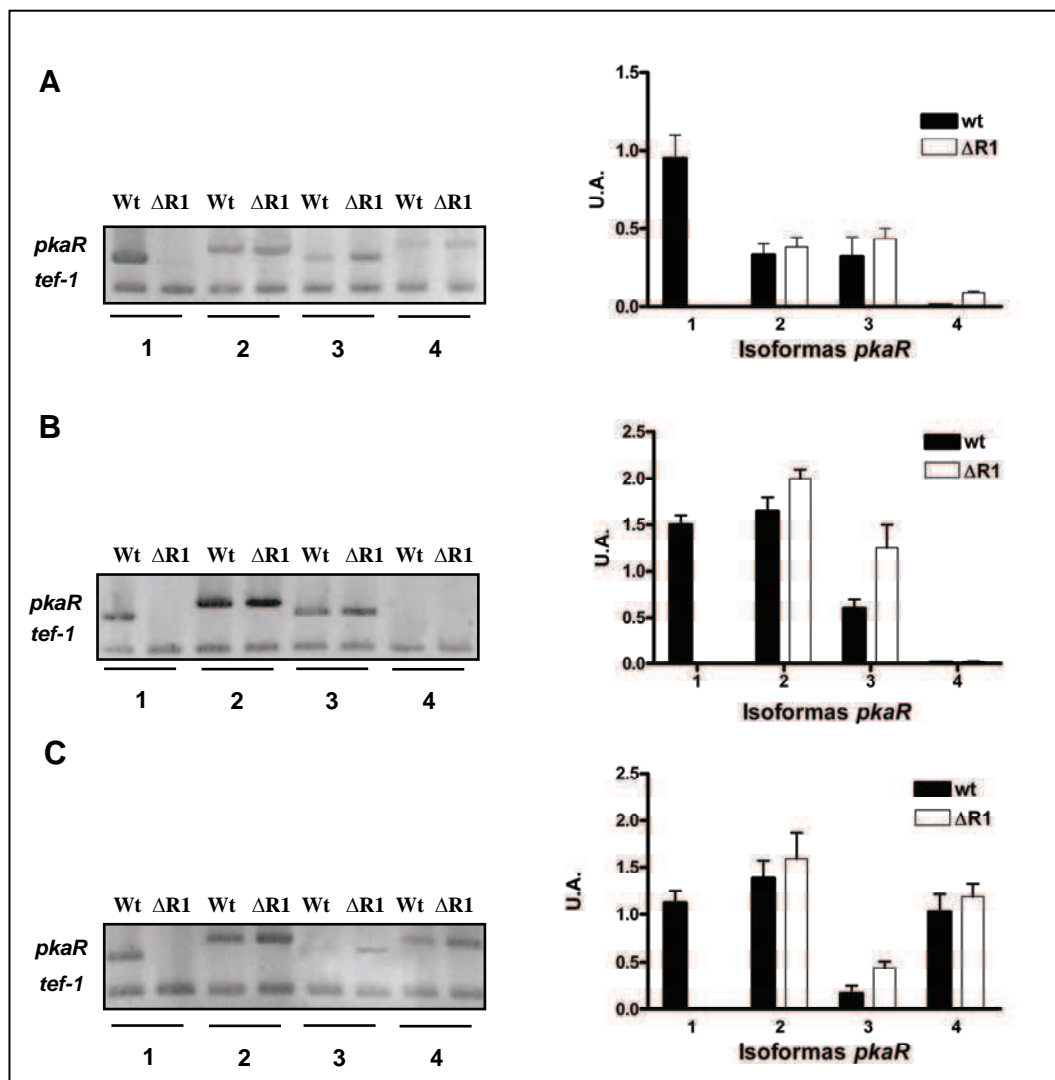


Figura 37- Expresión de los genes *pkaR* en las cepas wt y $\Delta R1$. Se midió la abundancia relativa de los mRNA de cada gen *pkaR* normalizado respecto al gen *tef-1* mediante RT-PCR semicuantitativa. El mRNA se extrajo de cultivos crecidos en (A) aerobiosis, (B) anaerobiosis o (C) transición anaerobiosis-aerobiosis. Los productos de PCR se analizaron y cuantificaron expresando la intensidad en unidades arbitrarias (u.a.) relativo a la intensidad de banda del gen *tef-1*. Cada valor representa la media +/- SD de seis experimentos independientes. Se muestra un gel de agarosa representativo de cada tiempo evaluado teñido con BrEt. Los números 1-4 indican los genes *pkaR1-4* respectivamente.

El patrón de expresión de los genes *pkaR* en la cepa $\Delta R1$ no presenta diferencias significativas respecto a la cepa wt en las distintas condiciones de crecimiento estudiadas.

II.2.6.b. Análisis de la expresión de las proteínas PKAR en distintas condiciones de crecimiento

Para analizar si existe relación entre los niveles de mRNA y las isoformas proteicas de los genes *pkaR* detectados en las distintas condiciones de crecimiento, se analizaron los niveles de las proteínas PKAR purificadas por cromatografía de afinidad cAMP-agarosa mediante *Western blot*. Las muestras analizadas provenían de esporas, cultivos crecidos en aerobiosis, anaerobiosis o transición anaerobiosis-aerobiosis. Como se puede observar en la Figura 38, las isoformas PKAR1-3 se observan en todas las condiciones analizadas, mientras que la isoforma PKAR4 se hace evidente luego de la transición anaerobiosis-aerobiosis (Figura 38D). La ausencia de proteína PKAR4 concuerda con los niveles muy bajos o indetectables de mRNA de esta isoforma tanto en esporas, como en cultivo aeróbico 4 hs o levaduras (Figura 36A). Los niveles de proteína detectados en la transición anaerobiosis-aerobiosis también concuerdan con el aumento de los niveles del mRNA del gen *pkaR4* en ese estadio (Figura 36B).

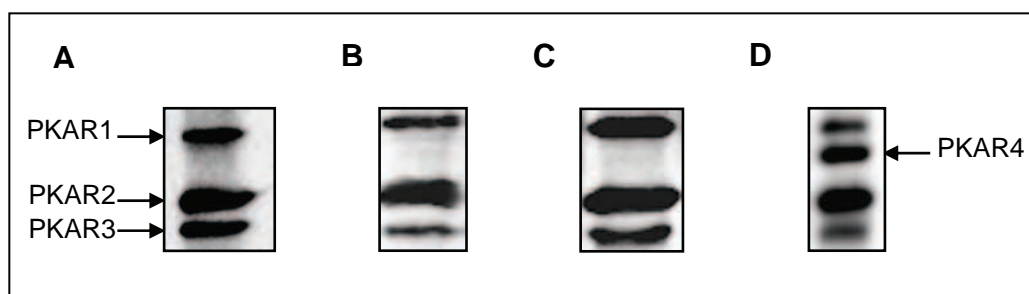


Figura 38- Detección de las proteínas PKAR en distintas condiciones de crecimiento. Proteínas purificadas por cAMP-agarosa analizadas mediante *Western blot*, revelado con anticuerpo anti-R de *Mucor rouxii*. (A) Esporas (B) cultivo aeróbico 4 hs, (C) levaduras, (D) transición anaerobiosis-aerobiosis.

No hay sin embargo una correlación estricta entre los niveles de mRNA y proteína para la isoforma PKAR2, siendo los niveles proteicos mayores que los de la isoforma PKAR1 en esporas, aerobiosis 4 hs y en la transición anaerobiosis-aerobiosis. Los niveles de mRNA para estas isoformas son parejos o mayores para PKAR1 en estos estadios.

Esas diferencias podrían explicarse por la posible existencia de una regulación a nivel traduccional para la isoforma PKAR2, o bien, si la misma presentara mayor afinidad por cAMP que las demás isoformas lo que determinaría una purificación preferencial de la misma. Otra posibilidad sería una mayor estabilidad de la proteína PKAR2.

II.2.7. Análisis de expresión de los genes *pkaC*

Tras la identificación de los nuevos genes *pkaR* y con los resultados que indican que en los Zygomycetes algunos genes han surgido por duplicaciones génicas a lo largo de la evolución (ver más adelante), se realizó una búsqueda por homología en la secuencia del genoma de *M. circinelloides* disponible, con el gen *pkaC* descrito, con el objetivo de encontrar posibles copias de este gen. Se encontraron cinco genes adicionales que se denominaron *pkaC1*, *pkaC2*, *pkaC3*, *pkaC4* y *pkaC5*.

Se analizaron los niveles de mRNA de estos genes en las cepas wt y $\Delta R1$ en condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y en la transición anaerobiosis-aerobiosis. La medición de los niveles de los transcritos se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa utilizando al gen *tef-1* como control.

No se observaron diferencias significativas en el patrón de expresión de los genes *pkaC* en la cepa $\Delta R1$ respecto a la cepa wt en las distintas condiciones de crecimiento estudiadas. La expresión de las distintas isoformas parece ser independiente de las condiciones de cultivo (Figura 39). Este resultado es diferente al descrito para los genes *pkaR* cuya expresión si varía con las condiciones de cultivo (Figura 36).

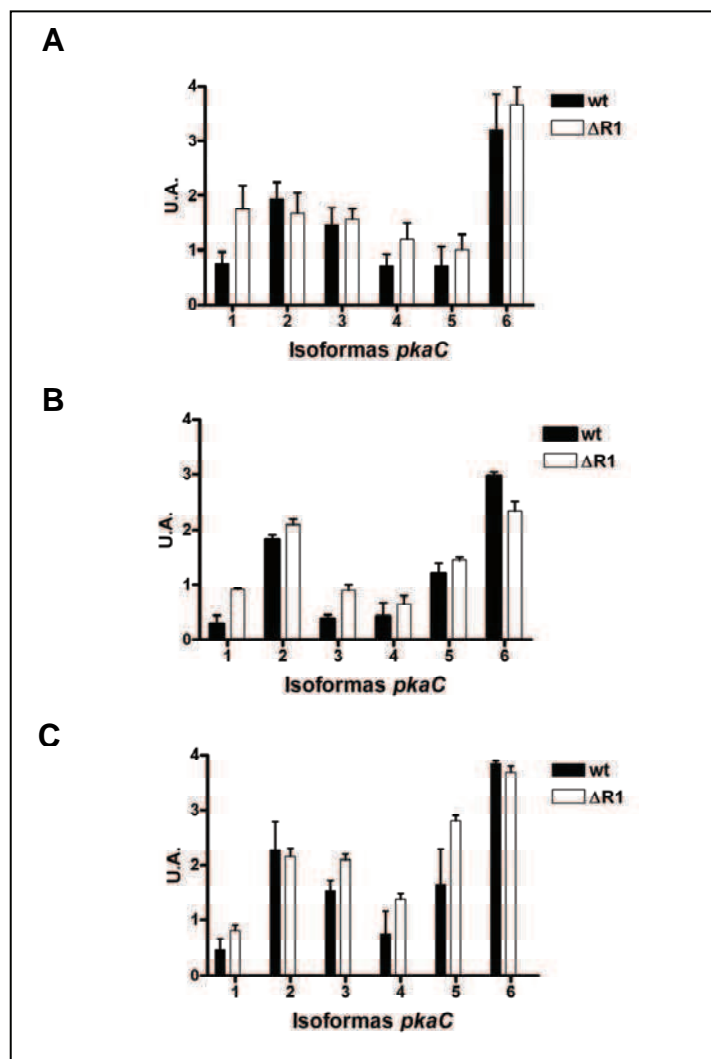


Figura 39- Expresión de los genes *pkaC* en las cepas wt y $\Delta R1$ Se midió la abundancia relativa de los mRNA de cada gen *pkaC* normalizado respecto al gen *tef-1* mediante RT-PCR semicuantitativa. El mRNA se extrajo de cultivos crecidos en (A) aerobiosis, (B) anaerobiosis o (C) transición anaerobiosis-aerobiosis. Las bandas de los productos de PCR se analizaron y cuantificaron expresando la intensidad en unidades arbitrarias (u.a.) relativo a la intensidad de banda del gen *tef-1*. Cada valor representa la media \pm SD de seis experimentos independientes. Los números 1-5 indican los genes *pkaC1* a *pkaC5* respectivamente y con 6 se indica al gen *pkaC*.

II.2.8. Construcción de la cepa *knockout* para el gen *pkaR2*

De acuerdo a los resultados de expresión diferencial de cada gen *pkaR* a lo largo de la germinación, las distintas isoformas cumplirían roles diferentes en el desarrollo y diferenciación en *M. circinelloides*. Para analizar la posibilidad de esta hipótesis, se procedió a construir cepas mutantes para cada una de las isoformas PKAR que restaban. En esta tesis se presenta la construcción y caracterización de la mutante nula para el gen *pkaR2*, se está trabajando en la construcción de las otras dos cepas mutantes para los genes *pkaR3* y *pkaR4*.

Para generar la mutante nula para el gen *pkaR2* se utilizó la misma estrategia empleada para generar $\Delta R1$. En este caso el reemplazo génico se realizó utilizando un vector *knockout* que contiene al gen *leuA* como marcador de selección, rodeado por secuencias del gen *pkaR2* y regiones adyacentes. Se utilizó como receptora la cepa R7B de *M. circinelloides*.

Se obtuvieron varias transformantes iniciales que fueron crecidas durante varios ciclos vegetativos hasta obtener finalmente una transformante homocariote que se denominó $\Delta R2$.

Se confirmó la disrupción del gen *pkaR2* mediante análisis por PCR utilizando diferentes pares de *primers* que hibridan o bien en la zona reemplazada en *pkaR2* (S1t), en la región utilizada para la recombinación homóloga (S1S y *pkaR2R*) o río arriba de esta (S1F) y dentro del marcador de selección *leuA* (*LeuA1r*) (Figura 40A).

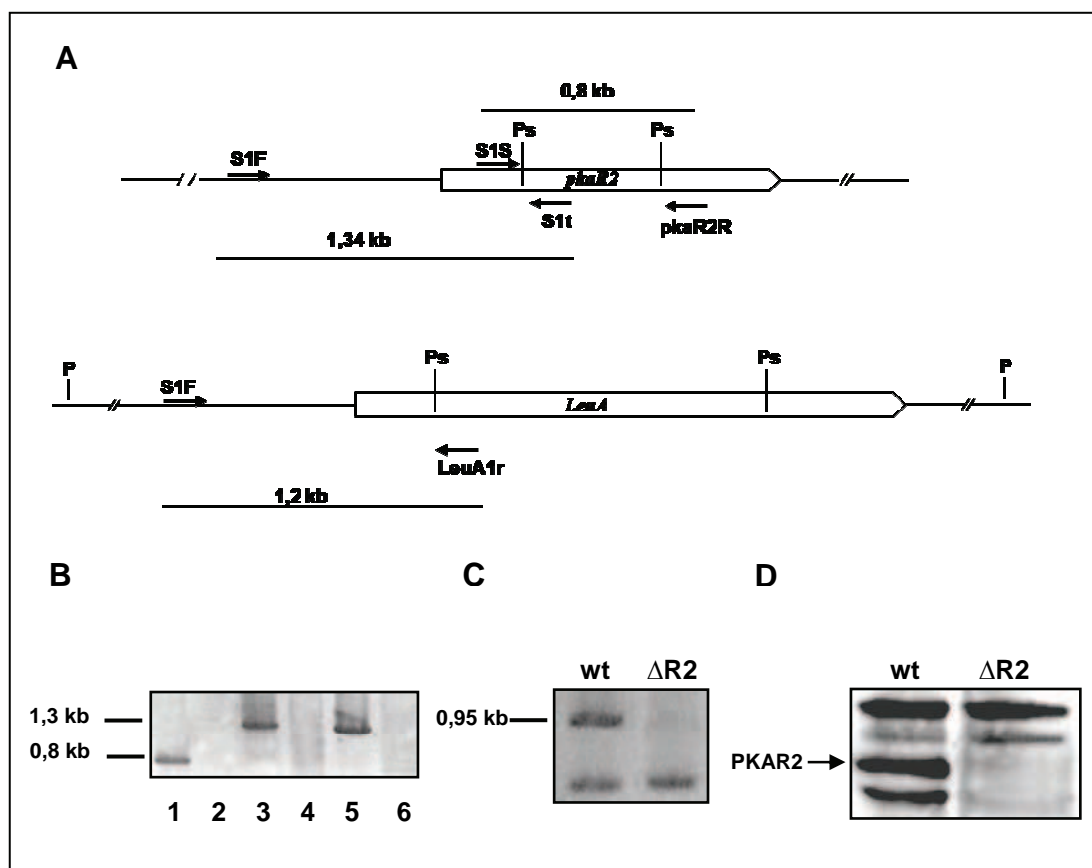


Figura 40- Disrupción del gen *pkaR2*. (A) Estructura genómica del locus wt de *pkaR2* y luego de la recombinación homóloga con el reemplazo de fragmento. Se indican los *primers* usados (P: *Pvu* II, Ps: *Pst* I). (B) La PCR se llevó a cabo con los *primers* S1S-*pkaR2R* (calles 1 y 4); S1F-*LeuA1r* (calles 2 y 5) y S1F-S1t (calles 3 y 6) con DNA de la cepa wt (calles 1-3) y de la cepa $\Delta R2$ (calles 4-6). (C) Producto de RT-PCR de 0,95 kb y producto del gen *tef-1*. (D) *Western blot* revelado con anticuerpo anti-R.

Los productos de PCR fueron únicos y se obtuvieron los fragmentos del tamaño esperado, para la cepa wt 0,8 kb (*primers* S1S-pkaR2R, figura 40B, calle 1) y 1,34 kb (*primers* S1F-S1t, figura 40B, calle 3), y para la cepa $\Delta R2$ el fragmento de 1,2 kb (*primers* S1F-LeuA1r, figura 40B, calle 5). De esta manera se corroboró la interrupción del gen *pkaR2* y la ausencia de núcleos wt en la mutante $\Delta R2$.

Para confirmar la interrupción del gen *pkaR2* se analizó mediante RT-PCR la expresión del mRNA en las cepas $\Delta R2$ y wt como control, con los *primers* pkaR2F-pkaR2R. Se obtuvo sólo el producto de 0,95 kb en la cepa wt verificando la interrupción del gen *pkaR2* en $\Delta R2$ (Figura 40C). Finalmente, se confirmó la interrupción del gen *pkaR2* en $\Delta R2$ mediante *Western blot* de fracciones purificadas mediante cAMP agarosa de las cepas wt y $\Delta R2$ (Figura 40D).

II.2.9. Caracterización Bioquímica de $\Delta R2$

Con el objetivo de caracterizar bioquímicamente a la cepa $\Delta R2$, se analizó la actividad de unión de cAMP y la actividad quinasa de PKA. En estos experimentos se utilizó la cepa KFA89 (*wilde type* para PKA) para comparar el comportamiento de la cepa mutante, ya que ésta posee el mismo fondo genético que la mutante $\Delta R2$ (no presenta auxotrofia) y permite asegurar que cualquier diferencia entre wt y mutante no sea debida a la presencia del marcador *leuA* sino a la ausencia de *pkaR2*.

II.2.9.a. Ensayo de unión a cAMP

Tras la anulación del gen *pkaR2*, la actividad quinasa en la célula quedaría regulada por los genes *pkaR1*, 3 y 4. Se ensayó la capacidad de unión a cAMP en las cepas wt, $\Delta R1$ y $\Delta R2$. El ensayo fue realizado a partir de cultivos aeróbicos crecidos durante 4 hs.

En la Figura 41 se puede observar que la cepa $\Delta R2$ al igual que la cepa $\Delta R1$ muestran una disminución de la actividad de unión de cAMP respecto a la cepa wt siendo aún más baja en la cepa $\Delta R2$. Esta mayor disminución de la actividad de unión a cAMP en $\Delta R2$ que en $\Delta R1$, podría deberse a que en esas condiciones de cultivo la expresión de PKAR2 parece ser mayor que la de PKAR1 (Figura 38B).

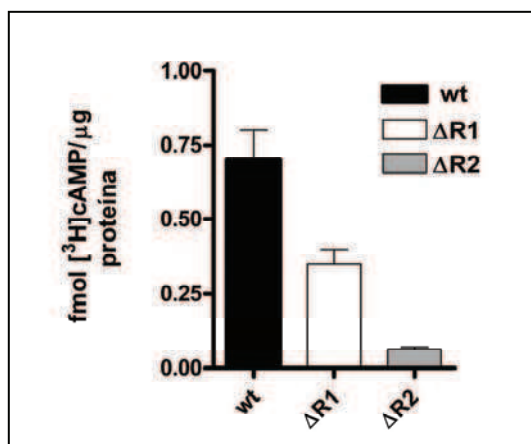


Figura 41- Ensayo de unión a cAMP. Se midió actividad de unión a [³H]cAMP en extracto crudo de las cepas wt, ΔR1 y ΔR2 crecidas en medio rico YPG en aerobiosis 4 hs. Los valores representados corresponden a cinco ensayos con preparaciones independientes y están presentados como la media +/-SD de cuatro replicas en cada ensayo.

II.2.9.b. Determinación de actividad quinasa de ΔR2

Para determinar la actividad quinasa usando kemptido como sustrato, se utilizaron muestras semipurificadas de la cepa wt y de la cepa ΔR2 crecidas en condiciones aeróbicas durante 4 hs. Se purificaron por cromatografía de intercambio iónico por resina de DEAE-celulosa. El ensayo se realizó en la fracción eluida con 0,35 M NaCl en presencia y ausencia de cAMP.

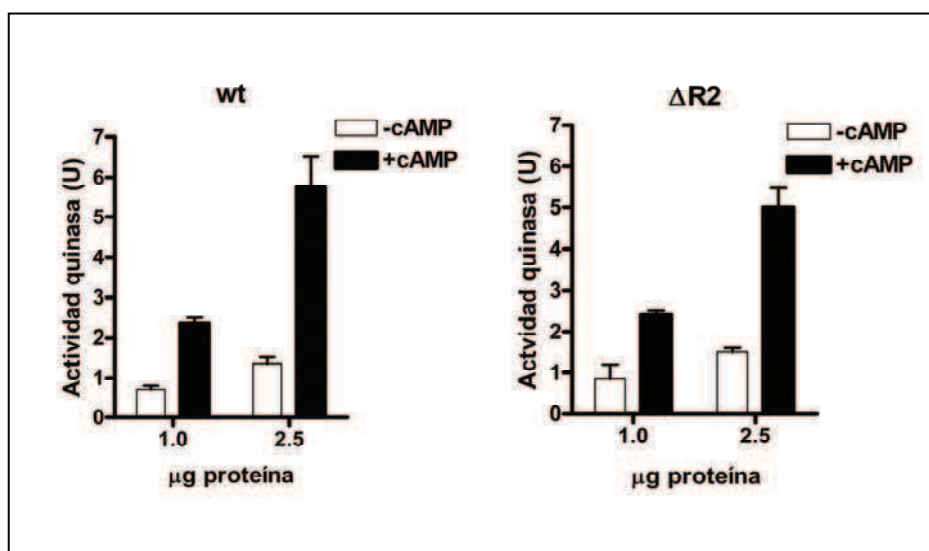


Figura 42- Determinación de actividad quinasa de ΔR2. Se midió actividad quinasa en muestras de fracciones semipurificadas provenientes de cultivo aeróbico crecido durante 4 hs de las cepas wt y ΔR2 en ausencia y presencia de cAMP. La actividad quinasa se expresa en unidades (U) según se define en materiales y métodos. Los valores representados corresponden a cinco ensayos con preparaciones independientes y están presentados como la media +/-SD de cuatro replicas en cada ensayo.

Tanto la cepa mutante como la cepa wt muestran dependencia de cAMP pero la relación de actividades \pm cAMP fue mayor en la mutante $\Delta R2$ (0,35) que en la cepa wt (0,23) (Figura 42) y a su vez menor que la presentada por la mutante $\Delta R1$ (Figura 30). $\Delta R2$ no parece presentar una disminución tan marcada en la actividad quinasa total.

II.2.10. Crecimiento y esporulación de la mutante nula de *pkaR2*

Para analizar el rol del gen *pkaR2* en la morfología de *M. circinelloides* se siguió el crecimiento en medio sólido y líquido en condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y transición anaerobiosis-aerobiosis. No se observaron diferencias en el tamaño de las esporas ni en el peso húmedo y peso seco del micelio después de 80 hs de crecimiento.

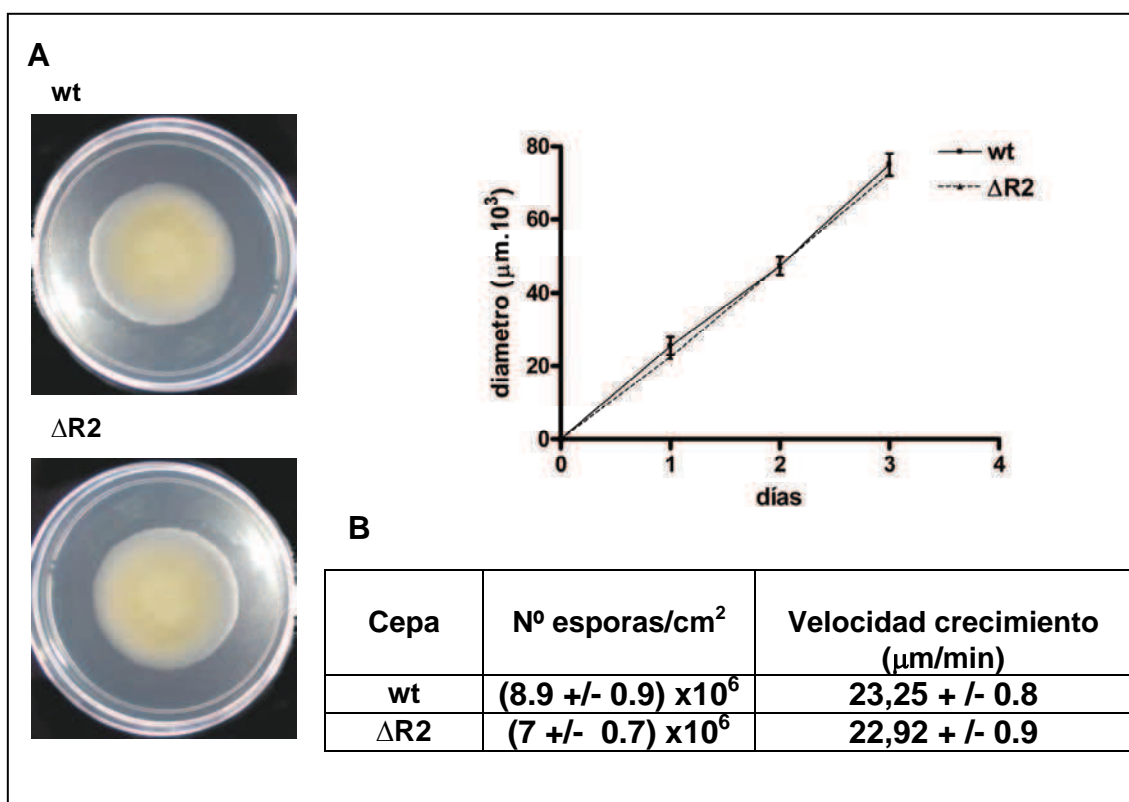


Figura 43- Crecimiento y esporulación de la mutante $\Delta R2$. (A) Se inocularon alícuotas de igual concentración de esporas de las cepas wt y $\Delta R2$ en medio mínimo YNB a pH 4,5 por triplicado y se monitorearon durante 3 días. Panel derecho, representación gráfica de velocidad de crecimiento radial calculado a partir de tres experimentos representativos mostrados en la figura A. (B) Se inocularon cien esporas de cada cepa en placas de medio YNB pH 4,5 por triplicado y se incubaron a 30°C durante 5 días. Se cortaron trozos de agar de 1cm² para calcular la producción de esporas.

A diferencia de lo observado en la mutante $\Delta R1$ (Figura 32) $\Delta R2$ no presenta diferencia en la velocidad de crecimiento radial en medio sólido ni en la producción de esporas respecto a la cepa wt (Figura 43A y B). Esta observación sugiere que el gen *pkaR2*, a diferencia de *pkaR1*, no cumple un rol importante en el crecimiento radial en medio sólido ni en la producción de esporas.

II.2.11. Morfología y germinación de la mutante nula de *pkaR2*

Se analizó también la morfología de cultivos crecidos en medio líquido en condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y transición anaerobiosis-aerobiosis.

Al analizar los cultivos crecidos en anaerobiosis se observó que el volumen de la célula madre de la cepa mutante $\Delta R2$ era menor que el de la cepa wt (Figura 44A). Este aspecto de la morfología está afectado en forma similar en $\Delta R2$ y $\Delta R1$ (Figura 33B).

Se analizaron muestras a las dos horas luego de la transición anaerobiosis-aerobiosis y se observó un mayor porcentaje de células que habían emitido el tubo germinativo en la cepa $\Delta R2$ respecto a la wt (Figura 44B). Se cuantificó el largo del tubo germinativo de las células brotadas a ese tiempo de cultivo y se observó que era mayor en la mutante que en la cepa wt. Esta alteración en la morfología es una diferencia con respecto a la cepa $\Delta R1$ (Figura 33C). En la transición de anaerobiosis-aerobiosis la cepa mutante $\Delta R2$ emitió mucho más rápido el tubo germinativo. A las 2 hs de crecimiento aeróbico el porcentaje de brotadas en la cepa wt fue de 5% mientras que para la cepa $\Delta R2$ fue de 30%. Estos experimentos de transición anaerobiosis-aerobiosis debieron repetirse una gran cantidad de veces ya que la cepa $\Delta R2$ en condiciones de microaerofilia presentaba una gran tendencia a brotar y morfología deformada, indicando que esta mutante era capaz de brotar aún en condiciones muy pobres de oxígeno.

Se analizó también la morfología durante el crecimiento aeróbico en medio rico YPG y se observó que en esta situación también se encontraba acelerada la germinación de la mutante $\Delta R2$ respecto a la wt (Figura 44C). En forma similar a lo observado para $\Delta R1$ (Figura 33A), aunque más notorio en $\Delta R2$, se observó un mayor porcentaje de células brotadas a las 3 y 3,5 hs de crecimiento aeróbico (Figura 44D). Pero a diferencia de $\Delta R1$, su crecimiento seguía acelerado respecto a

la wt luego de las 4 hs de crecimiento, además las hifas emitidas en la mutante $\Delta R2$ presentaban una morfología más irregular que las de la cepa wt

Estos resultados en conjunto, sugieren que mecanismos evolutivos deben haber retenido las múltiples isoformas PKAR por haber adquirido diferentes especificidades implicadas en el desarrollo y la morfología de *M. circinelloides*. En la tabla 8 se resumen las diferencias observadas tanto a nivel fenotípico como a nivel de la expresión de los genes *pkaR* en las mutantes $\Delta R1$ y $\Delta R2$ respecto a la cepa wt.

	Cambios respecto a wt	
	$\Delta R1$	$\Delta R2$
Actividad de unión a cAMP	Disminuida	Muy disminuida
Actividad quinasa total	Disminuida	No cambia
Relación +/- cAMP	Muy aumentada	Aumentada
Esporulación	Disminuida	No cambia
Velocidad crecimiento radial	Disminuida	No cambia
Crecimiento aeróbico 3 hs	Menor volumen celular % brotadas: 30 veces mayor en $\Delta R1$	Menor volumen celular % brotadas: 40 veces mayor en $\Delta R2$.
Crecimiento anaeróbico	Volumen celular 3,2 veces menor	Volumen celular 1,5 veces menor
Transición anaerobiosis-aerobiosis	Brota paralelo a la wt, hifas más cortas	Brota antes que la wt, hifas más largas
Niveles expresión de los genes <i>pkaR</i>	No cambian	Aumenta la expresión de <i>pkaR4</i> y disminuye la de <i>pkaR3</i>
Niveles expresión de proteínas PKAR	No cambian	Aumenta la expresión de PKAR4 y disminuye la de PKAR3

Tabla 8- Cambios observados en las mutantes $\Delta R1$ y $\Delta R2$ respecto a la cepa wt

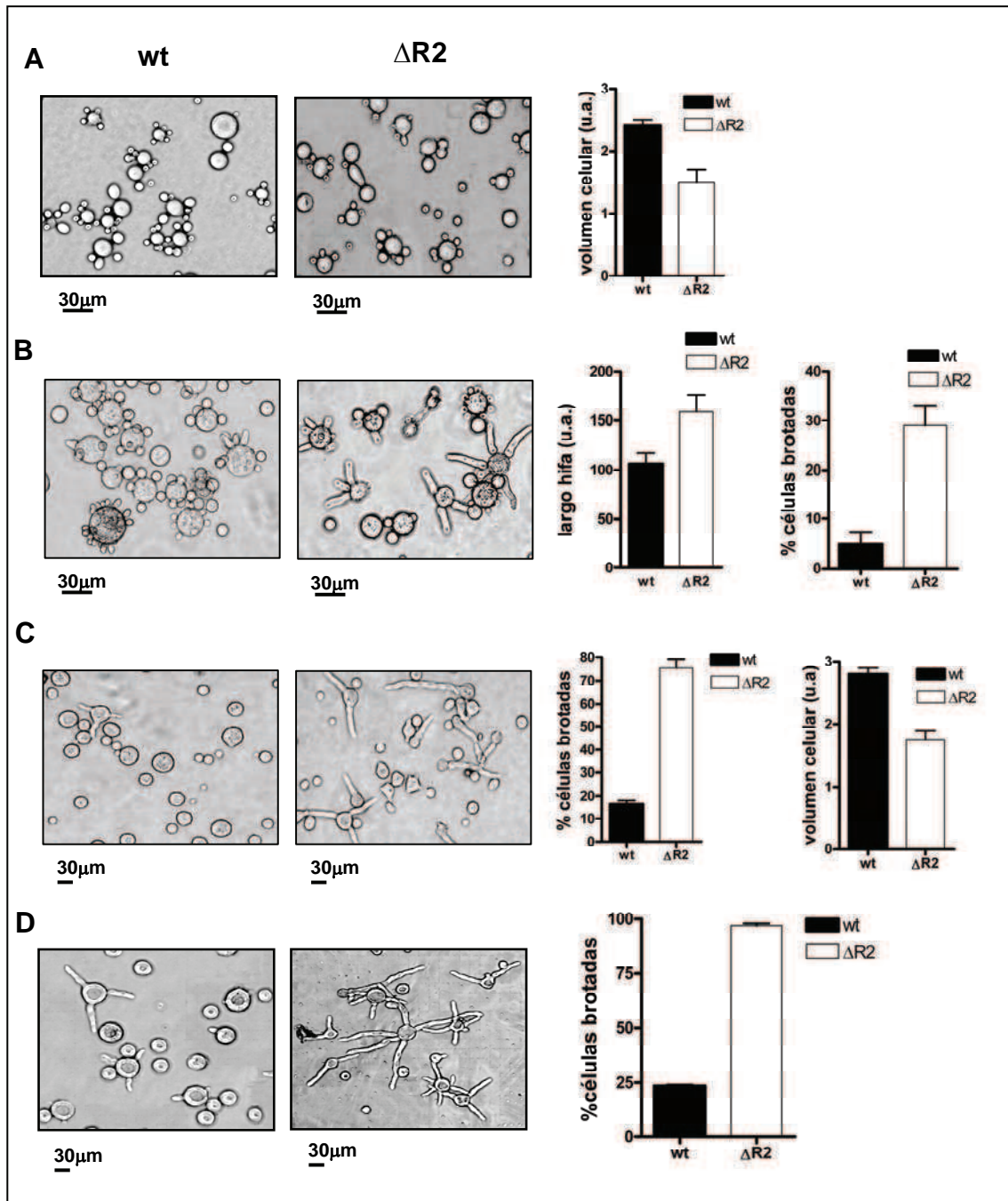


Figura 44- Morfología y germinación de la mutante nula de *pkaR2*. Examen microscópico de las cepas indicadas **(A)** crecidas durante una noche en condiciones anaeróbicas. Se muestran los volúmenes medios de las células madre. **(B)** Cultivos en condiciones de 2 hs de transición anaerobiosis-aerobiosis. En el gráfico de barras se representa el promedio del porcentaje de células brotadas y el del largo del tubo germinativo. Cultivos crecidos durante **(C)** 3 hs y **(D)** 3,5 hs en aerobiosis en medio YPG pH 4,5. Se calculó el número de células con tubo germinativo emitido y se expresó como porcentaje del total de células y se estimaron los volúmenes de las células madres. Los volúmenes se estimaron a partir de los diámetros medidos en unidades arbitrarias (u.a). Cada valor representa la media \pm SEM para tres experimentos independientes. Para el cálculo de estos parámetros se analizaron 300 células en cada experimento.

II.2.12. Expresión de los genes *pkaR* en la mutante $\Delta R2$

II.2.12.a. Análisis de los niveles de mRNA de los genes *pkaR* en $\Delta R2$

Se analizaron los niveles de mRNA de los genes *pkaR* en la cepa $\Delta R2$ crecida en medio líquido YPG pH 4,5 durante 4,30 hs en aerobiosis, de manera tal de analizar si la ausencia del gen *pkaR2*, afecta de alguna manera la expresión de los otros genes *pkaR*. Se analizaron mediante RT-PCR semicuantitativa los niveles de transcritos y se tomó como control interno el mRNA de *tef-1*.

Se pudo corroborar la ausencia de la expresión del gen *pkaR2* y a diferencia de lo que ocurría en $\Delta R1$, donde no se observaban diferencias de expresión respecto a la cepa wt en el resto de los genes *pkaR* (Figura 37), se observó un aumento en los niveles de mRNA del gen *pkaR4* respecto a la cepa wt y llamativamente no se observa expresión de *pkaR3* (Figura 45A). Aumentando el número de ciclos de la reacción, se detectó mRNA de *pkaR3* indicando que sus niveles se encuentran disminuidos respecto a la cepa wt (Figura 45B).

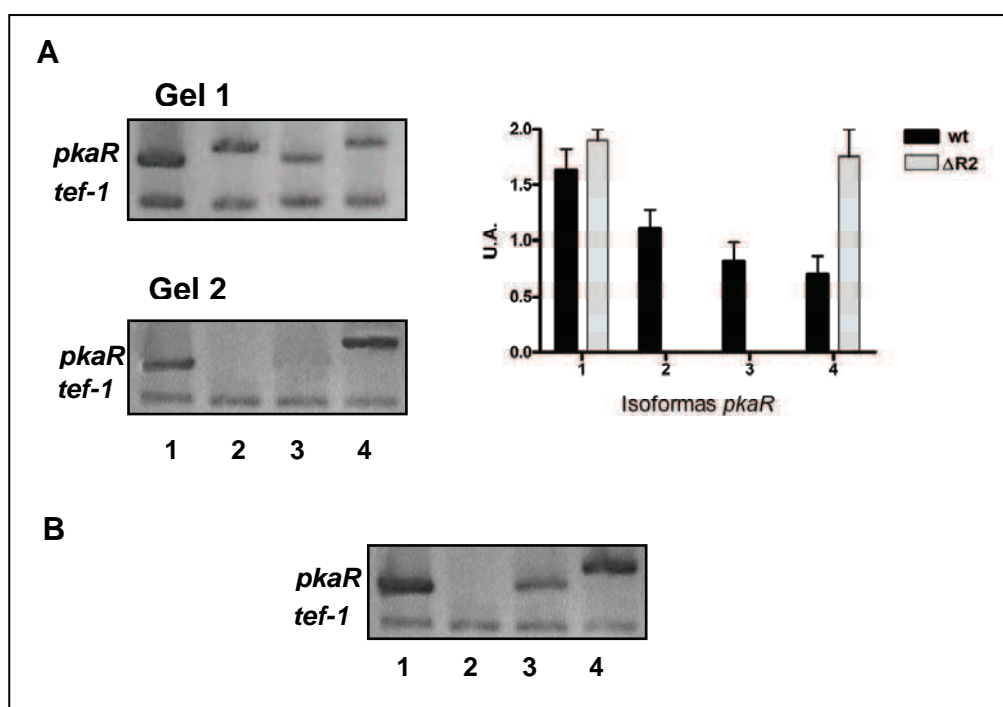


Figura 45- Niveles de mRNA de los genes *pkaR* en $\Delta R2$. Se analizaron mediante RT-PCR semicuantitativa los niveles de expresión de los genes *pkaR* en la cepa $\Delta R2$. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias respecto al mRNA del gen *tef-1*. **(A)** El gel 1 corresponde a los productos de PCR de la cepa wt y el gel 2 a la cepa $\Delta R2$. **(B)** Productos de PCR de la cepa $\Delta R2$ a mayor número de ciclos (45). Los números 1-4 indican los genes *pkaR1* a 4 respectivamente.

II.2.12.b. Análisis de la expresión de las proteínas PKAR

Se analizaron mediante *Western blot* los niveles de las proteínas PKAR luego del crecimiento aeróbico durante 4 hs en las cepas wt KFA 89 y en la cepa mutante $\Delta R2$ en fracciones purificadas por cAMP-agarosa.

Se pudo observar en la muestra proveniente de la cepa $\Delta R2$ ausencia de la banda de 60 kDa que fue identificada como PKAR2 y se observa muy tenue la banda correspondiente a PKAR3, concordante con los menores niveles de mRNA detectados (Figura 45A). También se observa un aumento de PKAR4 paralelo al aumento de su mRNA (Figura 46).

Los resultados del análisis de mRNA y proteínas podrían explicar la mayor disminución de la capacidad de unir cAMP de $\Delta R2$ respecto a $\Delta R1$ (Figura 41), dado que en las condiciones de ensayo en $\Delta R1$ estarían uniendo cAMP las proteínas PKAR2 y 3 (Figura 31) pero en $\Delta R2$ lo haría prácticamente sólo PKAR1 debido a los bajos niveles de expresión de PKAR3 y 4 (Figura 46).

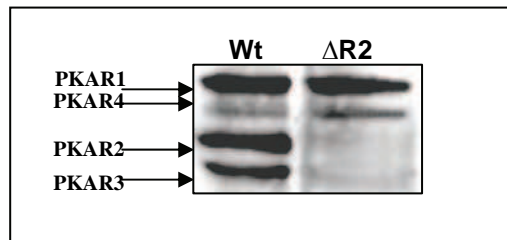


Figura 46- Análisis de la expresión de las proteínas PKAR en $\Delta R2$. Purificación por cAMP-agarosa de muestras provenientes de cultivos de 4,30 hs analizadas mediante *Western blot* revelado con anticuerpo policlonal anti-R de *M. rouxii*. Las cepas analizadas se indican en cada calle.

II.2.13. Análisis filogenético de los genes *pkaR*

Se analizaron las secuencias de nucleótidos de los genes *pkaR* y se encontró que los genes *pkaR1*, *pkaR2* y *pkaR4* tienen dos intrones en posiciones equivalentes, compartiendo los mismos sitios de *splicing*, mientras que *pkaR3* tiene un solo intrón en una posición conservada (Figura 47A). Además, *pkaR3* presenta la menor homología de secuencia en comparación con los otros genes *pkaR*. El hecho de que los genes *pkaR* conserven los límites entre exones e intrones sugiere que

los mismos provienen de eventos de duplicación, siendo el gen *pkaR3* el menos relacionado con los otros 3.

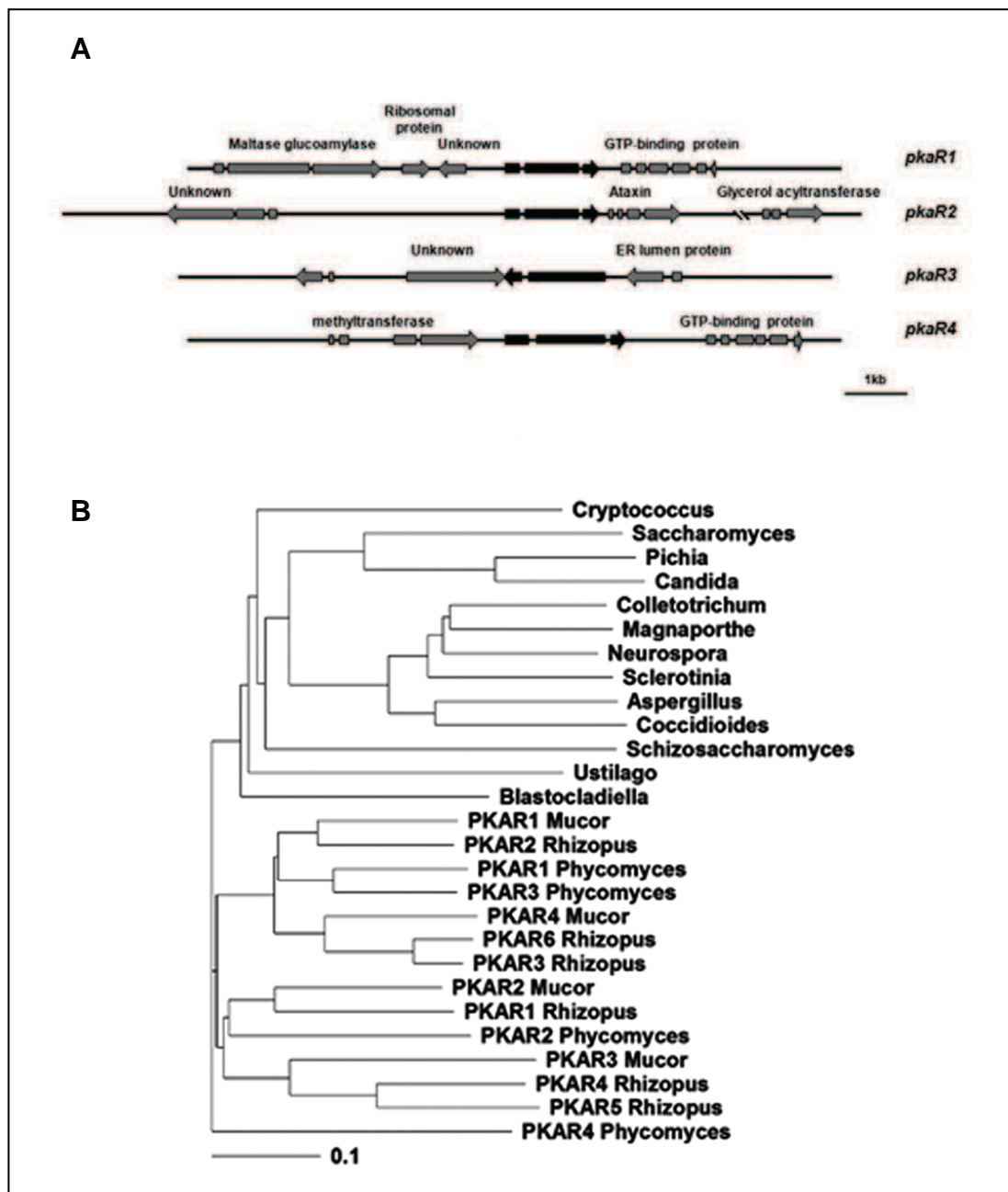


Figura 47- Genes *pkaR* (A) Estructura genómica de los genes *pkaR* y los genes flanqueantes. Están indicados los intrones y exones de cada gen. **(B)** Árbol filogenético de las proteínas PKAR. La barra representa el número de sustituciones por sitio.

La duplicación que dio lugar a los genes *pkaR1* y *pkaR4* incorporó un gen río abajo que presenta alta identidad y se le predice función de proteína que une GTP, además presenta los mismos dominios funcionales predichos. Los eventos de

duplicación no incorporaron otros genes flanqueantes, como se puede observar en los diferentes genes presentes río arriba y río abajo de los genes *pkaR* (figura 47A).

Estas duplicaciones ocurrieron sólo en el linaje de los Zygomycetes, porque al hacer una búsqueda mediante blast en las bases de datos de los genomas fúngicos públicos usando la secuencia de PKAR1 de *M. circinelloides* como blanco de búsqueda, se encontró solo en otros dos Zygomycetes la presencia de más de un gen PKAR (*Rhizopus. oryzae* y *Phycomyces blakesleeanus*), seis para el primero y cuatro para el segundo. Un análisis filogenético y de comparación de secuencias de Zygomycetes, Ascomycetes y Basidiomycetes sugirió que el evento de duplicación que dio lugar a los genes *pkaR* ocurrió en un ancestro de los Zygomycetes antes de la divergencia de especies porque cada proteína homóloga PKAR de *M. circinelloides* está más próxima a los ortólogos en *R. oryzae* y *P. blakesleeanus* que a sus parálogos (Figura 47B). Del análisis de otros genes como *crpA*, que codifica para una proteína que participa del control de la carotenogénesis en respuesta a la luz, también en *M. circinelloides*, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en este caso con los genes *pkaR* en cuanto a la duplicación previa a la divergencia de las especies (236).

II.2.14. Ubiquitinación de las isoformas PKAR

En estudios previos de nuestro laboratorio se encontró que el PM aparente, en geles de SDS, de las subunidades R de *M. circinelloides* es mucho mayor que el PM predicho por las secuencias de aminoácidos (127). Mientras que los genes *pkaR* codifican para proteínas de 47 kDa para los casos de PKAR1 y PKAR2, de 46 kDa para PKAR3 y de 49 kDa para PKAR4, aparecen especies entre 60 y 85 y hasta 120 kDa reveladas en *Western blot* con anticuerpo anti-R, según la etapa de crecimiento del hongo que se esté analizando (Figura 48). Estas bandas de tan alto PM molecular fueron las más llamativas sobre todo por la forma de la banda de aspecto difuso.

Se pensó entonces en la posibilidad de que estas proteínas se encuentren modificadas post-traduccionamente. Se han descrito más de cien tipos de modificaciones post-traduccionales, que tienen por objetivo contribuir al correcto plegamiento, localización, regulación de la actividad, interacciones moleculares, y recambio o degradación de las proteínas.

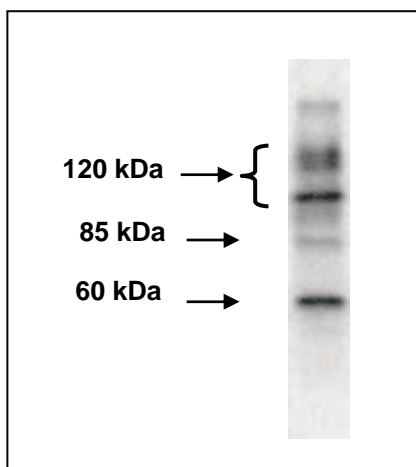


Figura 48- Western blot de extracto crudo. Western blot de extracto crudo de la cepa R7B crecida en aerobiosis en YPG pH 4,5 durante 4,30 hs revelado con anti-R.

Dentro de las modificaciones más frecuentes se encuentran la glicosilación, que suele facilitar la interacción entre moléculas, la fosforilación que comúnmente se encuentra implicada en mecanismos de activación y desactivación, y la ubiquitinación. Dado el alto PM de las bandas de 120 kDa, se pensó que podrían estar glicosilada, sin embargo, en nuestro laboratorio se probó que luego de una purificación a través de WGA, que es una resina de lectinas que interactúa con proteínas glicosiladas, no desaparecen ni las bandas de 120 kDa ni ninguna de las bandas reveladas con el anticuerpo anti-R. La posibilidad de fosforilación pareció la menos probable para la proteína de 120 kDa, dada la gran variación de tamaño molecular.

Otra modificación frecuente es la ubiquitinación, su nombre deriva precisamente de la distribución ubicua de la ubiquitina. Se decidió entonces analizar si esta era la modificación post-traducciona que podría estar generando la proteína de 120 kDa.

La ubiquitinación de las proteínas PKARs podría condicionar propiedades de las moléculas tales como afinidad por la subunidad C, afinidad por el cAMP, estabilidad, capacidad de interactuar con otras proteínas y su rol a lo largo de la diferenciación del hongo.

Con el objetivo de evaluar si podría estar ocurriendo dicha modificación se sembraron en gradientes de sacarosa no disociantes extractos proteicos de la cepa de *M. circinelloides* KFA89, provenientes de cultivos de 15 hs en condiciones aeróbicas. En cada fracción del gradiente se midió actividad quinasa, actividad de unión de cAMP y se analizó una alícuota de cada fracción por SDS-PAGE y *Western blot* revelando con los anticuerpos anti-R y anti-Ub. El objetivo de estos ensayos fue analizar si existía una correlación entre presencia de banda alta y ubiquitinación, y si además estas bandas correlacionaban con actividad quinasa y actividad de unión a cAMP (parte de estos abordajes se realizaron con la colaboración de Virginia González Polo).

Se observó la presencia de bandas de aproximadamente de 120 kDa reveladas por ambos anticuerpos en muestras correspondientes a las fracciones 7-10 del gradiente no disociante que coinciden con el pico de actividad quinasa y de actividad de unión a cAMP (Figura 49A). Como el anticuerpo anti-ubiquitina tiene menos sensibilidad que el anticuerpo anti R, una posibilidad es que esté revelando la proteína de mayor concentración, por eso se ve una sola banda con ese anticuerpo, mientras que el anti-R revela varias proteínas.

Por otra parte se observa una banda de 60 kDa revelada con ambos anticuerpos que también se asocia con el pico de actividad quinasa y de unión a cAMP. Con el anticuerpo anti-R se revela una banda adicional cuyo PM coincide con la banda que fue identificada como PKAR1 (figura 35A).

El mismo análisis a través de gradientes disociantes mostró que las bandas de 120 kDa aparecen desplazadas hacia fracciones de menor coeficiente de sedimentación pero que no coinciden con el pico de actividad quinasa (Figura 49B). Este desplazamiento indica que en ausencia de NaCl y cAMP las bandas de 120 kDa, reconocidas como R por el anticuerpo, estarían interactuando con la subunidad C, encontrándose por lo tanto, en fracciones que presentan actividad quinasa (Figura 49A) en cambio, en condiciones disociantes se separan de la subunidad C ya que no coinciden con el pico de actividad quinasa (Figura 49B).

Estos resultados sugieren que la modificación post-traducciona que le confiere a alguna isoforma de R un PM que ronda los 120 kDa no modifica su interacción con la subunidad C. Por otra parte, el hecho de que esa banda de alto PM no es detectada por *Western blot* en las purificaciones de R por cAMP-agarosa

como se vio anteriormente (Figura 35A), sugiere que esta modificación estaría impidiendo la capacidad de interactuar con cAMP.

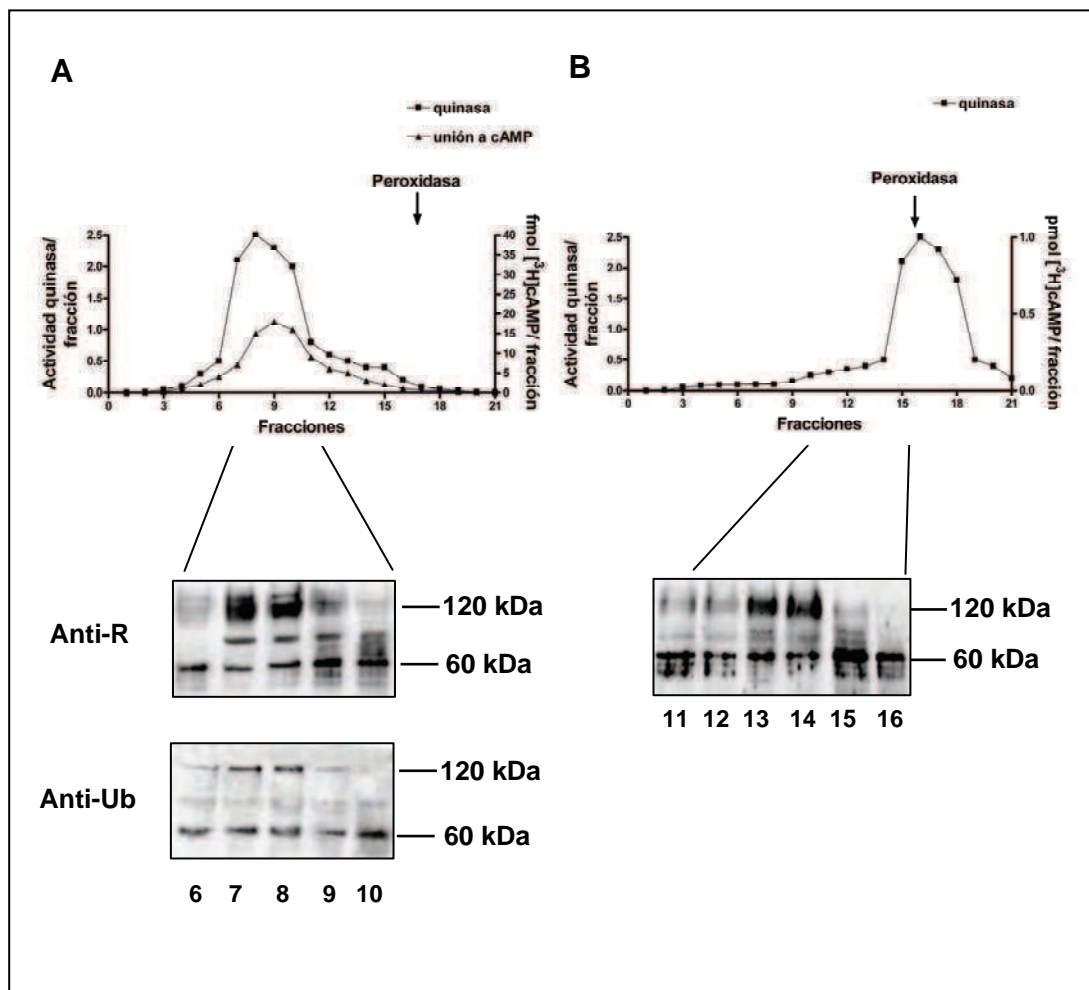


Figura 49- Gradientes de sacarosa. Extractos crudos (300µg de proteína) de la cepa KFA89 de *M. circinelloides* provenientes de cultivos aeróbicos de 15 hs sembrados en gradientes de sacarosa. Determinación de actividad quinasa y actividad de unión a [³H]cAMP de las fracciones del gradiente **(A)** no disociante y **(B)** disociante y *Western blot* revelado con anticuerpo anti-R o anti-Ub de las fracciones indicadas en cada calle. Se muestra un experimento representativo de cuatro ensayos.

Por el tamaño observado de las bandas reveladas con ambos anticuerpos se puede pensar que las bandas de 120 kDa corresponden a una poliubiquitinación o multiubiquitinación.

Fue llamativo encontrar una banda de 60 kDa reconocida por ambos anticuerpos. De acuerdo al PM debería ser la isoforma PKAR2 y dado que su PM no está tan aumentado con respecto al predicho podría considerarse que esta isoforma posee una monoubiquitinación. De ser así, sin embargo se esperaría haber revelado

al menos dos bandas correspondientes a la forma no ubiquitinada y monoubiquitinada de PKAR2 en la región cercana a 60 kDa. Consideramos que una alta proporción de la proteína debe contener la modificación y además no se deben llegar a resolver dichas bandas que quizás corren muy próximas una de la otra.

Estos resultados sugieren que las isoformas de R podrían estar algunas modificadas por multiubiquitinación o poliubiquitinación y por monoubiquitinación.

Para correlacionar nuevamente formas de 120 kDa con falta de actividad de unión a cAMP, se analizó el comportamiento de las mismas en DEAE-celulosa. Se sembraron extractos crudo crecidos en YPG pH 4,5 durante 15 hs y se analizaron las fracciones del percolado y del eluido con 0,35 M NaCl por *Western blot* y por actividad de unión a cAMP (Figura 50A).

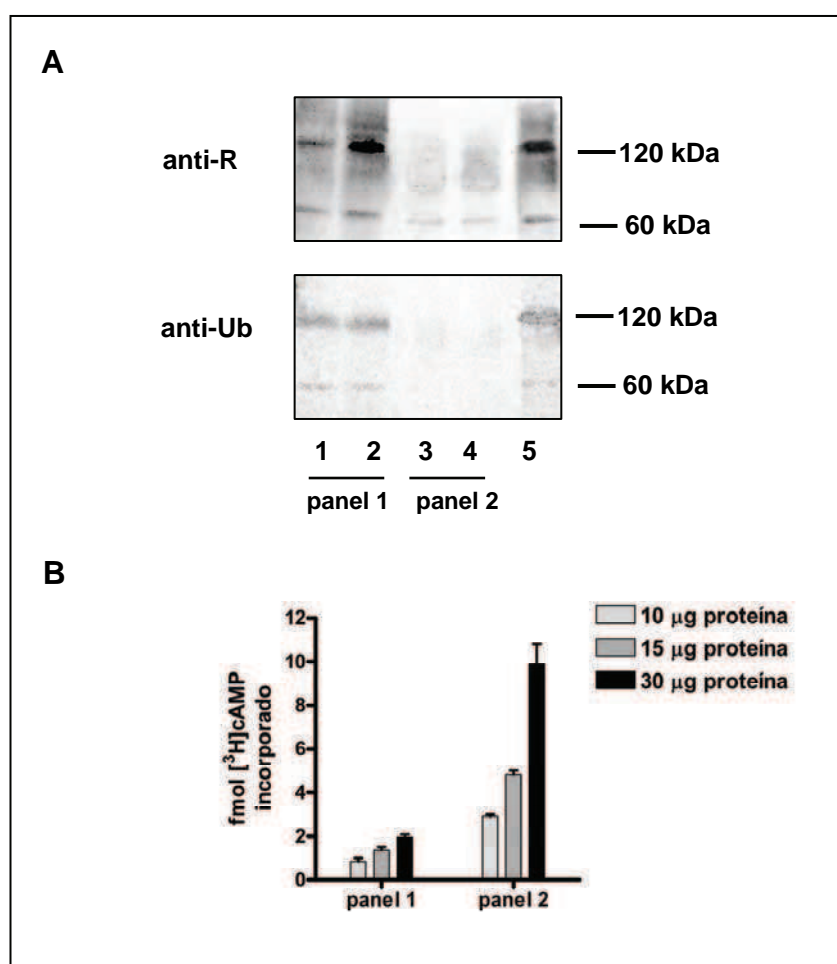


Figura 50- Capacidad de unir cAMP de la subunidad R ubiquitinada. Se fraccionó extracto crudo de la cepa KFA89 de *M. circinelloides* mediante cromatografía de intercambio iónico con resina de DEAE-celulosa. **(A)** Se sembraron en la calle 1: 20 µg, calle 2: 30 µg, calle 3: 3 µg, calle 4: 6 µg, calle 5: 30 µg de proteína de los paneles indicados y se analizaron por *Western blot* revelando con anti-R o anti-Ub. Calle 5: se muestra el extracto total. **(B)** Medida de actividad de unión a [³H]cAMP, panel 1: percolado, panel 2: 0,35 M NaCl. Los ensayos se realizaron por duplicado y se expresan como la media +/- SD. Se muestra un ensayo representativo de cuatro experimentos independientes.

Las bandas de 120 kDa fueron reveladas por ambos anticuerpos y sólo se detectaron en el percolado de la resina (panel 1), mientras que en el panel 2 (0,35 M NaCl) se detectaban las especies de R de menor PM (Figura 50A). En cuanto a la unión a cAMP, el percolado presenta muy baja actividad. Nuevamente la presencia de las formas de 120 kDa se correlaciona con ausencia de actividad de unión a cAMP.

Los resultados de los gradientes, la purificación por cAMP agarosa y la DEAE sugieren que la ubiquitinación estaría alterando la capacidad de interactuar con cAMP de la isoforma de R modificada por poliubiquitinación.

Con el objetivo de corroborar que esa banda de 120 kDa se correspondía con subunidad R ubiquitinada, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-R. La fracción inmunoprecipitada se analizó por SDS-PAGE y *Western blot* revelado con los anticuerpos anti-Ub y anti-R.

Entre las bandas de alto PM se distinguieron 4 bandas reveladas con ambos anticuerpos. La de menor PM tenía una movilidad electroforética de 120 kDa y las otras 3 se ubicaban por encima de esta. También se observó una banda revelada con anti-R pero no con a-Ub (Figura 51). No se pudo analizar lo que ocurre con la banda de 60 kDa porque su movilidad electroforética está muy próxima a la de las inmunoglobulinas y esto hacia dificultosa la identificación de la isoforma.

Con este experimento se pudo confirmar que formas de 120 kDa correspondían a R y estaban ubiquitinadas con probablemente distinto grado de poliubiquitinación o multubiquitinación.

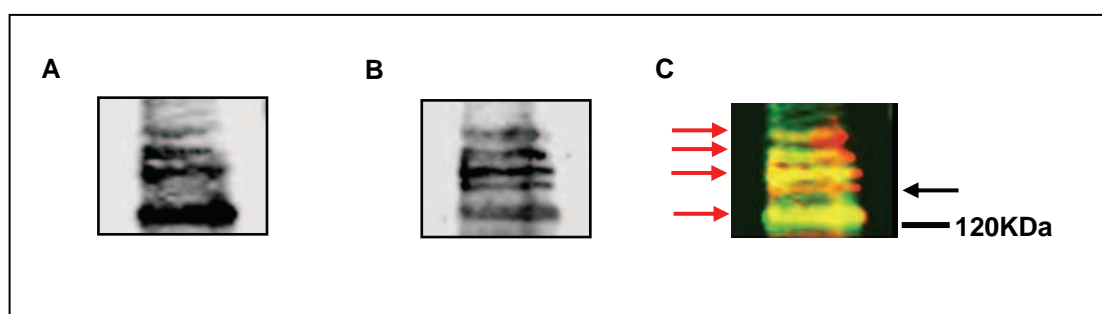


Figura 51- Inmunoprecipitación. Extracto proteico de la cepa R7B crecido 8 hs en aerobiosis en medio rico YPG pH 4,5 inmunoprecipitado con anticuerpo anti-R. La muestra se analizó por SDS-PAGE y *Western blot* revelado con (A) anti-Ub y (B) anti-R de *M. rouxi*. (C) Colocalización de las imágenes obtenidas con ambos anticuerpos, las flechas rojas indican las bandas reveladas por ambos anticuerpos y la flecha negra la revelada sólo por anti-R. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de tres ensayos.

Hay ejemplos de quinasas que suelen activar la vía de degradación vía proteosoma luego de su activación y en muchos casos suelen ubiquitinarse también sus proteínas regulatorias (192). Para analizar si esta modificación por aparente poliubiquitinación podría estar afectando la estabilidad de la proteína, se realizaron ensayos con el inhibidor de proteosoma MG132 esperando obtener aumento de dichas bandas en una muestra tratada respecto al control. Este inhibidor ya había sido usado en *M. circinelloides*, al menos en un trabajo (237) y mostró tener efecto, no obstante, en nuestro caso a pesar de haber repetido el ensayo 3 veces no se detectaron diferencias ni en la banda de 120 kDa, ni en las proteínas ubiquitinadas en general. Si bien, no necesariamente deberían aumentar las formas de 120 kDa (que es lo que se intentaba probar), debería haber aumentado la intensidad de las bandas reveladas con anti-ubiquitina, dado que al no haber degradación deberían haberse acumulado formas de proteínas polubiquitinadas.

Los gradientes de los ensayos descritos en la figura 49, fueron realizados con extractos provenientes de cultivos de 15 hs, con el objetivo de obtener más masa de micelio y por lo tanto extracto más concentrado. Dada la posibilidad de que la multiubiquitinación en las formas de 120 kDa esté asociada a la degradación y a la imposibilidad de corroborarlo con el ensayo del inhibidor de proteosoma, se realizaron gradientes de menos horas de cultivo para evaluar si variaba la intensidad de dichas bandas.

Comparando los perfiles obtenidos con ambos extractos analizados por *Western blot* (Figuras 49A y 52), se puede ver que en cultivos más jóvenes hay menos acumulación de las formas de 120 kDa.

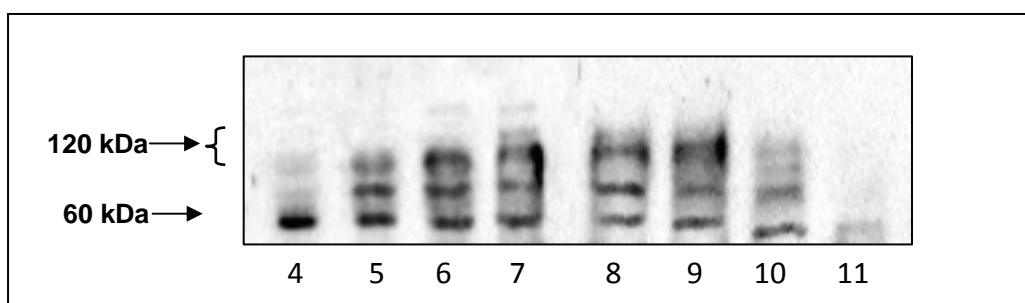


Figura 52- Gradiente de Sacarosa. Extracto crudo de la cepa KFA89 proveniente de cultivo aeróbico de 5,30 hs (300 μ g de proteína) sembrado en gradiente de sacarosa analizado por *Western blot* revelado con anti-R.

Este resultado es un dato más que permite pensar en la posible funcionalidad de la multiubiquitinación, ya que en cultivos en fase logarítmica tardía como los de 15 hs se encontraría en mayor proporción quizás como una manera de permitir la degradación de alguna /s isoformas de R no necesarias en esa etapa de crecimiento.

Para confirmar la identidad de la banda de 60 kDa revelada con anti-ubiquitina se analizaron mediante *Western blot* extractos crudos y fracciones purificadas por cAMP-agarosa de la cepa $\Delta R2$ y de la cepa R7B como control revelado con los anticuerpos anti-R y anti-Ub.

Se corroboró que la banda de 60 kDa revelada con anti-R desaparece en la mutante, al igual que lo observado en la figura 46, y también desaparece la banda de 60 kDa revelada por anti-Ub (Figura 53).

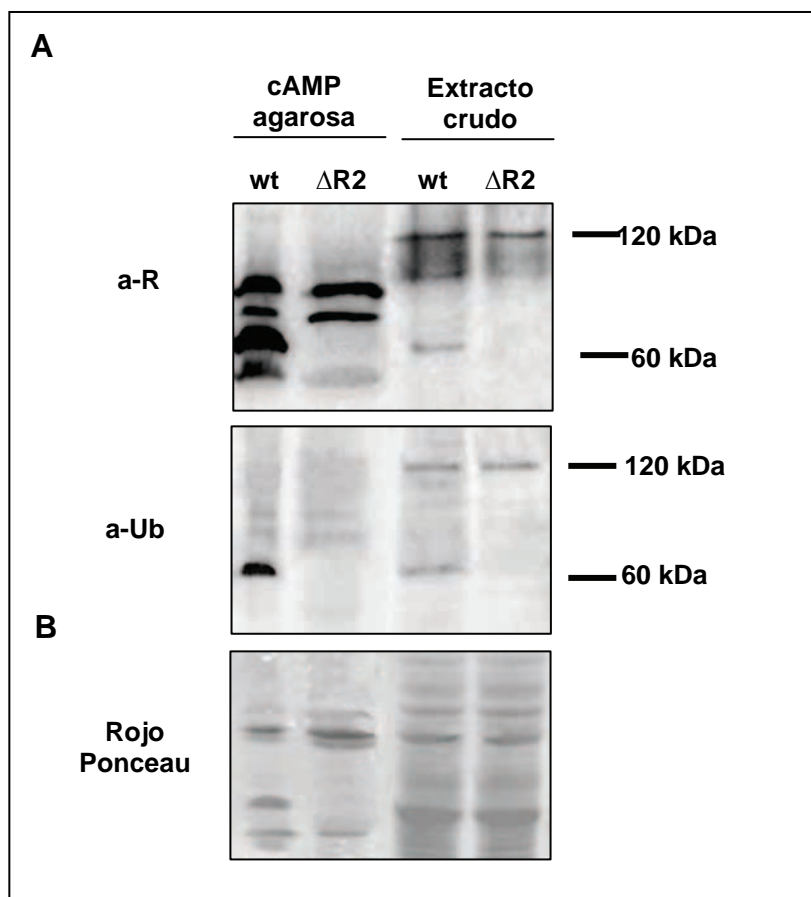


Figura 53- Ubiquitinación de PKAR2. (A) Extractos crudos y fracciones purificadas por cAMP-agarosa de las cepas R7B y $\Delta R2$ analizados mediante *Western blot* revelados con anti-Ub y con anti-R. En la figura se indican las muestras sembradas en cada calle y los anticuerpos utilizados. **(B)** Se muestra la membrana teñida con Rojo Ponceau como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Se intentó confirmar por espectrometría de masas la ubiquitinación de PKAR2, tratando de identificar en que residuo podría estar ocurriendo la unión de ubiquitina. Si bien se analizaron dos purificaciones diferentes no se detectaron péptidos ubiquitinados en los espectros. Este resultado negativo no es concluyente dado que la no detección de péptidos modificados puede deberse a que la unión de la ubiquitina es muy lábil y puede perderse durante el desarrollo de la técnica.

Finalmente, hay que destacar que las formas de 120 kDa están presentes en los extractos crudos de las mutantes $\Delta R1$ y $\Delta R2$ (Figuras 53 y 54). Por lo tanto no deben provenir de la modificación en las isoformas PKAR1 y PKAR2.

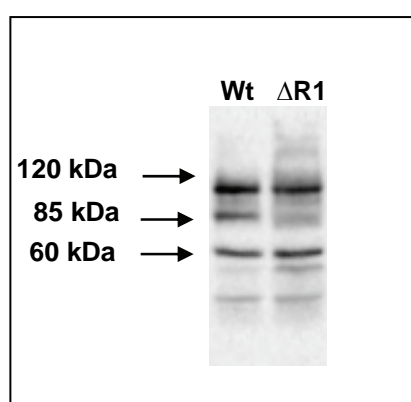


Figura 54- Western blot extractos crudos. *Western blot* de extractos crudos de las cepas R7B y $\Delta R1$ crecidas en aerobiosis 4,30 hs en YPG pH 4,5 revelados con anti-R.

III.2.15. Ubiquitinación a lo largo de la diferenciación de *M. circinelloides*

Con el fin de analizar si la ubiquitinación de la subunidad R presenta algún patrón diferencial en los distintos estadios de diferenciación celular de *M. circinelloides*, se analizó el patrón de modificaciones mediante *Western blot* a partir de extractos crudos y de fracciones purificadas por cAMP-agarosa provenientes de esporas o cultivos crecidos en aerobiosis, en anaerobiosis o después de la transición anaerobiosis-aerobiosis.

Se observaron reveladas con los anticuerpos anti-Ub y anti-R las formas de 120 kDa y de 60 kDa en los extractos crudos de esporas y de todas las condiciones de cultivo (Figura 55).

Por otra parte en las fracciones purificadas por cAMP-agarosa independientemente del origen de la muestra, en ninguna se observa la banda de

120 kDa, lo cual es consistente con lo observado las figuras 35A y 50. Por otra parte, en todas las condiciones se observa la banda de 60 kDa revelada por ambos anticuerpos sugiriendo que la ubiquitinación no estaría condicionada al menos por las condiciones de crecimiento analizadas.

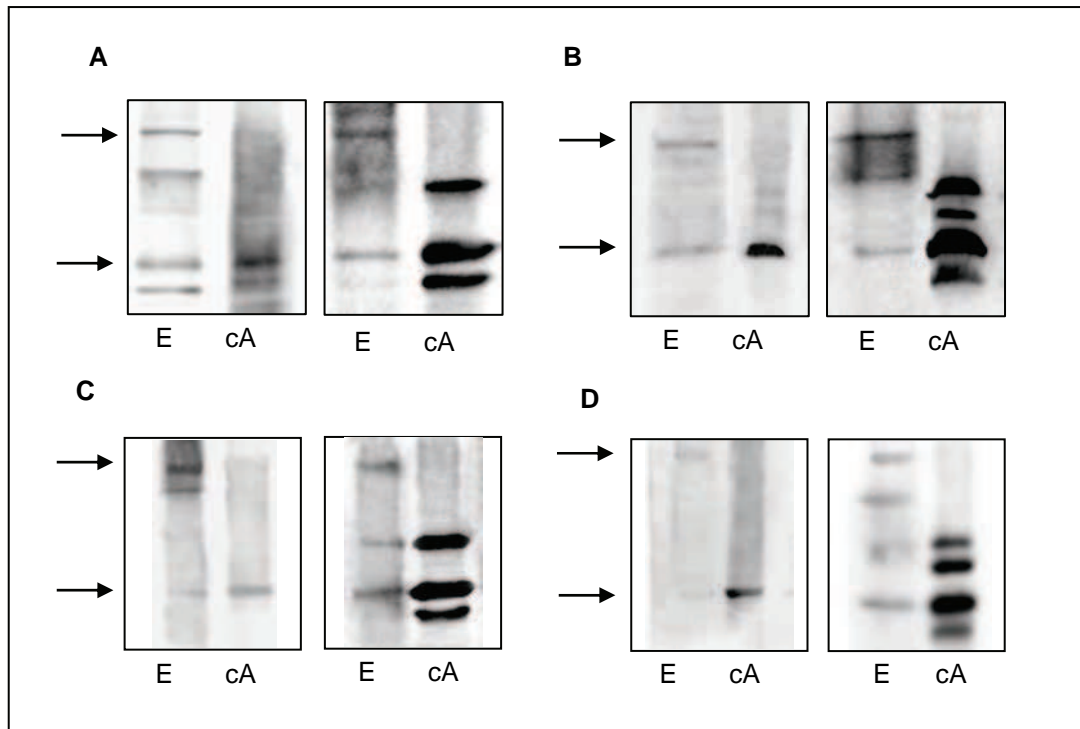


Figura 55- Ubiquitinación a lo largo de la diferenciación. *Western blots* revelados con anti-Ub (paneles izquierdos) y anti-R (paneles derechos) de extractos crudos (EC) y de fracciones purificadas por cAMP–agarosa (cA) de la cepa R7B **(A)** esporas, **(B)** cultivos aeróbicos 4,30 hs **(C)** levaduras **(D)** transición anaerobiosis-aerobiosis.

II.3. Discusión

El objetivo inicial de este capítulo de la tesis fue analizar el rol de la vía de PKA en la morfología del hongo *M. circinelloides*.

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la actividad de PKA, juega un rol importante en la inducción del crecimiento filamentoso en *Mucor*. La sobreexpresión de la subunidad PKAR1 en *M. circinelloides* produce el apagado de la actividad PKA dando como resultado un incremento en la ramificación y una disminución de la velocidad de extensión del brote resultando en un fenotipo de *hyperbranching* o con un alto grado de ramificación (127).

En este capítulo de la tesis se analizó el rol de la vía de PKA en el hongo dimórfico *M. circinelloides* mediante un abordaje genético que permitió estudiar *in vivo* las influencias de la enzima en la morfología y crecimiento fúngico. Inicialmente se analizó en forma directa la influencia de *pkaR* en la morfología y desarrollo del hongo, anulando el gen *pkaR* descrito como el único gen codificante para la subunidad R en *M. circinelloides*.

La caracterización bioquímica de la mutante $\Delta R1$ permitió observar que la ausencia del gen *pkaR1* resultó en una actividad de unión a cAMP muy disminuida pero no nula y en una actividad quinasa que no fue independiente del nucleótido y presentó una relación de actividades $-/+cAMP$ mayor que la cepa wt. En análisis por *Western blot* revelado con anticuerpo anti-R de proteínas con capacidad de unión a cAMP se detectaron dos bandas adicionales de PKAR en la cepa $\Delta R1$.

Los resultados de actividad quinasa, de actividad de unión a cAMP y los de *Western blot*, sugirieron la existencia de más de un gen codificante para la subunidad R de PKA. Se predijeron tres genes adicionales a los que se llamó *pkaR2*, 3 y 4. Se confirmó la existencia de los mismos por espectrometría de masas de proteínas purificadas por cAMP-agarosa, y mediante RT-PCR semicuantitativa que permitió la detección de los mRNA de cada gen.

Con el objetivo de estudiar si los distintos genes *pkaR* cumplen funciones diferenciales en la morfología y en la regulación de la actividad quinasa de PKA de *M. circinelloides*, se decidió anular los otros genes *pkaR* comenzando por *pkaR2* que presentaba altos niveles de expresión en la mayoría de las condiciones de crecimiento analizadas previamente.

Al comparar las mutantes entre sí se vio que $\Delta R2$ presenta una actividad de unión a cAMP menor que $\Delta R1$. Esto podría deberse a que la cantidad de proteína PKAR2 expresada en las condiciones de crecimiento en las que se realizó el ensayo era mayor que la de PKAR1 (Figura 38B), y/ o que PKAR2 presenta mayor afinidad por cAMP que PKAR1. También se pudo observar que $\Delta R1$ presentó menor actividad quinasa total y que la actividad quinasa era menos dependiente de cAMP que la de $\Delta R2$. Las proteínas identificadas en *M. circinelloides*, difieren entre sí en el extremo amino terminal y en la región *linker*. En el capítulo I se demostró que la afinidad de interacción entre R-C de *M. circinelloides* es mayor que en la holoenzima de eucariotas superiores, y que en parte esa alta afinidad de interacción observada en la PKA de *Mucor* se debe a la presencia de un grupo de residuos ácidos presentes en el *linker* I (238). PKAR1 y PKAR4 poseen un mayor número de residuos ácidos en la región *linker* I que PKAR2 y PKAR3, por lo que la interacción entre estas últimas isoformas y C debería ser menor que la interacción entre PKAR1 y PKAR4 con C. Como el mRNA de *pkaR4* está en muy bajos niveles a las 4 horas de germinación (Figura 36A), la actividad quinasa medida en esas condiciones (Figura 30 y 42) debería ser consecuencia principalmente de la expresión los genes de *pkaR 1, 2 y 3* en la cepa wt y de *pkaR2 y 3* en la mutante $\Delta R1$ (Figura 31A). El menor número de residuos ácidos en PKAR2 y 3, y consecuentemente su menor afinidad por C, podrían explicar la menor dependencia de cAMP de la actividad PKA en la mutante $\Delta R1$ respecto a $\Delta R2$ y a la cepa wt. En $\Delta R2$ *pkaR4* posee niveles de expresión aumentados y *pkaR3* disminuidos. Debido a la presencia de las dos isoformas ricas en residuos ácidos (PKAR1 y PKAR4) (Figura 46) esta mutante presenta actividad quinasa con mayor dependencia de cAMP.

Existen diferencias en los resultados publicados respecto a los efectos observados sobre la actividad PKA en mutantes de subunidad R. En una cepa mutante de *A. niger*, la actividad de PKA no mostró ningún cambio, sugiriendo la probable existencia de otro gen que lleve a cabo similares funciones (141). En otros hongos, sin embargo, la actividad de PKA en las cepas con la subunidad R anulada, fue mayor o menor que las cepas wt (96, 101, 137).

Las cepas $\Delta R1$ y $\Delta R2$ difieren también fenotípicamente de la cepa wt y entre sí. En medio sólido $\Delta R1$ mostró menor producción de esporas y una disminución de la velocidad de crecimiento radial respecto a la wt, no obstante ninguno de estos cambios fenotípicos se observaron en $\Delta R2$. La disminución de la velocidad de

crecimiento radial parece ser una característica común a las mutantes de subunidad R de los hongos filamentosos ya que también se observó para *A. niger*, *N. crassa* y *C. lagenarium* (94, 141, 239). El efecto sobre la esporulación varía en los distintos hongos desde incapacidad de producir conidias en *A. niger* a retardo en *A. fumigatus* o disminución en *C. lagenarium*. Todos estos resultados indican un probable rol de la PKA en la reproducción asexual de estos organismos (141, 142, 239).

Durante el crecimiento en cultivo líquido, las cepas wt, $\Delta R1$ y $\Delta R2$ presentaron distintas cinéticas de germinación. La emisión del tubo germinativo en condiciones aeróbicas en las cepas mutantes fue más temprano y el volumen de las células madres fue menor comparado con la cepa wt, pero se diferenciaron entre sí, ya que los tubos germinativos de la cepa $\Delta R1$ fueron más cortos que los de la wt mientras que en $\Delta R2$ fueron más largos e irregulares. En cultivos anaeróbicos, la levadura madre gemante de ambas cepas mutantes presentó un volumen menor que el de la cepa wt y esta diferencia de volumen se mantuvo luego de la transición anaerobiosis-aerobiosis.

Todos los efectos fenotípicos observados en las cepas mutantes son menos severos que los observados en algunos hongos filamentosos. Un ejemplo de ello es una cepa mutante de subunidad R de PKA de *N. crassa* que presenta una pérdida total del crecimiento polar (94). Otros hongos filamentosos, como *A. fumigatus*, muestran cambios morfológicos muy débiles luego de la disrupción de *pkaR*, tales como crecimiento reducido, defectos en la germinación y ensanchamiento de la hifa sin evidencias de pérdida de la polaridad durante el crecimiento en medio líquido como ocurre en nuestro caso (142). Por otro lado la anulación del gen que codifica para la subunidad R en *C. albicans* y *Y. lipolytica* es letal (137, 234).

Como vimos las cepas $\Delta R1$ y $\Delta R2$ presentaron distinta actividad quinasa y distintos fenotipos. Integrando estos resultados con resultados previos de nuestro laboratorio, podríamos proponer que en el caso de $\Delta R1$, al ser las células madres más pequeñas y tener una holoenzima mas fácilmente activable es probable que llegue más rápidamente a la concentración crítica umbral necesaria para la emisión del tubo germinativo (135).

Para $\Delta R2$ si bien las células son más chicas que las wt el grado de dependencia de la holoenzima con cAMP es mayor, sin embargo, las células brotan mucho antes que las células wt. En este proceso deben estar influyendo otros

factores además de alcanzar un nivel umbral crítico de actividad PKA, como la localización subcelular a través del anclaje de PKA mediado por las distintas isoformas de R, dando como consecuencia una compartimentalización muy especializada.

Así como se encontraron distintas isoformas de R, se describió también la existencia de isoformas de C. En mamíferos existen 4 genes codificantes para subunidad R ($R1\alpha$, $R1\beta$, $R2\alpha$, $R2\beta$) y tres genes que codifican para subunidad C ($C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$). En varios Ascomycetes (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. niger*, *A. nidullans* y *A. fumigatus*) y dos Basidiomycetes (*U. maydis* y *C. neoformans*) la subunidad C está codificada por dos o tres genes, aunque poseen o están descritos un solo gen para subunidad R. En nuestro caso se definieron en principio 5 genes que codifican para cada isoforma de C.

Al analizar los niveles de mRNA de R y C se observó que en la cepa wt los niveles de mRNA de los genes *pkaR* varían en las distintas etapas de crecimiento, indicando un rol diferencial para cada isoforma durante el desarrollo.

Del análisis de la expresión de los mRNA en las mutantes se pudo ver que la ausencia de *pkaR1* en la cepa mutante $\Delta R1$ no modifica el patrón de expresión de los otros tres genes. Esto hace pensar que la función de esta isoforma podría ser redundante con al menos una de las otras isoformas. Sin embargo, la ausencia de *pkaR2* en $\Delta R2$ genera un aumento de la expresión del mRNA de *pkaR4* y una disminución del mRNA de *pkaR3*.

Al analizar la expresión de los genes *pkaC* no se observaron variaciones con las condiciones de crecimiento ni en la cepa wt ni en la mutante $\Delta R1$, y tampoco parecen afectarse por la ausencia del gen *pkaR1*. La falta de alteración en los niveles de mRNA de *pkaC* en la mutante $\Delta R1$ se diferencia de resultados previos publicados que indican una mayor expresión de una de las isoformas PKAC al sobreexpresar PKAR1 (112).

La disminución de la actividad total de PKA en la mutante $\Delta R1$ entonces no parece deberse a una disminución de la expresión de las isoformas de C analizadas. Esta disminución podría deberse a una regulación post-transcripcional, a una mayor degradación de C por el mayor grado de activación de la holoenzima y/o a la existencia de otras múltiples isoformas de PKAC además de las descritas en este trabajo, cuya expresión si podría estar modificada en $\Delta R1$ (240).

Se analizó minuciosamente la distribución de exones e intrones en los cuatro genes *pkaR* y se encontró que *pkaR1*, 2 y 4 tienen dos intrones en posiciones equivalentes, mientras que *pkaR3* tiene un solo intrón. Esto sugiere que posiblemente la presencia de cuatro genes *pkaR* sea el resultado de múltiples rondas de duplicación que involucren duplicación del genoma entero (*whole genome duplication*, WGD), segmentos menores de DNA, o genes individuales. No existen, sin embargo, evidencias de eventos WGD en Zygomycetes. La duplicación génica es un tema recurrente en la biología de los Zygomycetes y se han publicado numerosos ejemplos (170-172). Además mediante un estudio comparativo de la secuencia de 34 genomas fúngicos completos representantes de una amplia diversidad de especies de Ascomycetes y Basidiomycetes y el Zygomycete *R. oryzae*, se observó que la multiplicidad de isoformas de una proteína varía ampliamente entre las especies fúngicas, pero el Zygomycete *R. oryzae* posee el mayor número de grupos de duplicación de todos los hongos analizados (241). Una comunicación reciente (242) indica que el orden y el arreglo genómico de los pares de genes duplicados y su origen filogenético común proveen evidencias de WGD en un ancestro de *R. oryzae*; pero un análisis preliminar del genoma de *Mucor* y de *Phycomyces* indica que no ocurrió WGD en ninguno de estos dos últimos (236). Nuestros resultados sugieren que los eventos de duplicación que dieron origen a las cuatro copias de los genes *pkaR*, tuvieron lugar muy tempranamente en la línea evolutiva de los Zygomycetes porque cada PKAR homóloga de *M. circinelloides*, se encuentra más relacionada a las ortólogas de *R. oryzae* y *P. blakesleeanus* que a sus otros parálogos (Figura 47B). Estas tres duplicaciones génicas no incorporaron genes flanqueantes, sugiriendo que los genes *pkaR* se originaron a partir de una duplicación limitada dentro del genoma.

La multiplicidad de genes en los Zygomycetes parece no estar relacionada solamente a la vía de señalización cAMP-PKA dado que se han encontrado múltiples isoformas de proteínas no relacionadas con esta vía como los genes de quitina sintasa (171), los genes *white collar* (172) y glicósido hidrolasa (*mce*). El caso de los genes *white collar* es de interés particular, porque un análisis funcional sugiere que adquirieron diferentes funciones luego de la duplicación (172, 226), aunque parece haber un menor grado de redundancia que en los genes *pkaR*. Un mecanismo evolutivo similar pudo haber retenido las distintas isoformas PKAR que pudieron haber adquirido distintas especificidades luego de un proceso de

subfuncionalización (243), lo que explica la existencia de patrones de expresión diferentes.

Finalmente, del análisis de modificaciones post-traduccionales se encontró una serie de bandas de 120 kDa que eran reconocidas por los anticuerpos anti-R y anti-Ub. Estos resultados indicarían que esas proteínas serían formas ubiquitinadas de R, lo que fue confirmado por inmunoprecipitación. En gradiente de sacarosa las formas de 120 kDa están asociadas a actividad quinasa y a actividad de unión a cAMP (Figura 49A). Mediante el análisis por DEAE-celulosa se pudo observar que la actividad de unión a cAMP estaba dada por las subunidades R de menor PM y que las fracciones que contienen a las proteínas de alto PM no presentan dicha actividad (Figura 50). Además en purificaciones de cAMP-agarosa esas proteínas no quedan retenida en la resina (Figura 35A), sugiriendo que la ubiquitinación estaría interrumpiendo su capacidad de interactuar con cAMP. Por otra parte, la modificación post-traducciona no alteraría su capacidad de interactuar con la subunidad C, como indica su comportamiento en gradientes de sacarosa disociantes y no disociantes (Figura 49A y B).

El hecho de que existan formas de R modificada sin capacidad de unir cAMP y que estas se observen mayormente en cultivos de fase logarítmica tardía, sugiere en que esta modificación post-traducciona podría estar relacionada con la regulación de la quinasa posterior a su activación, ya que una vez que una proteína quinasa es activada existen diversos mecanismos para apagar su actividad y en muchos casos su activación inicia su *down regulation* mediante la activación de la degradación vía ubiquitina/ proteosoma (192). La ubiquitinación puede acoplar la activación y el apagado de una vía de transducción de señales ya que esto permite un control preciso del tiempo de vida medio de los componentes activos. Ejemplo de esto son la proteína quinasa ribosomal S6 y la proteína quinasa C (195) que pertenecen a las AGC quinasas (196) y la quinasa SGK-1 (197).

Las formas de 120 kDa se observan tanto en las mutantes $\Delta R1$ como $\Delta R2$, lo cual sugiere que esa proteína no correspondería a formas modificadas provenientes ni de PKAR1 ni de PKAR2. Al menos la forma presente en mayor concentración que es la detectada por el anti-Ub en extractos crudos.

La proteína de 60 kDa que fue reconocida por los anticuerpos anti-R y anti-Ub, pareciera corresponderse a una monoubiquitinación de PKAR2 (Figura 53). Este tipo de modificación suele estar asociada a destinos diferentes al de degradación

vía proteosoma ya que se vio que pueden modificar la interacción con otras proteínas, la localización o modular la actividad proteica (175). Por lo tanto la ubiquitinación de PKAR2 podría estar asociada a modificar alguna propiedad de la proteína como su localización, su capacidad de unión a cAMP o su interacción con C.

Finalmente, la proteína de 120 kDa y la de 60 kDa se observan en todos los estadios de crecimiento estudiados, indicando que la modificación post-traducciona podría ser independiente del estadio de crecimiento (Figura 55).

Queda pendiente entonces definir las funciones de estas dos ubiquitinaciones, una en PKAR2 y la otra en PKAR3 y/o PKAR4.

Los resultados de este capítulo confirman que la PKA está involucrada en múltiples procesos en la fisiología de *M. circinelloides*. Está muy bien estudiado que en los sistemas de mamíferos hay multiplicidad de posibles holoenzimas de PKA debido a la existencia de cuatro subunidades R y tres subunidades C. El hallazgo de múltiples subunidades R y C de la PKA de Zygomycetes genera una situación que parece ser tan compleja como la de mamíferos y plantea el desafío de estudiar como participa cada tipo holoenzima en las distintas etapas del desarrollo, sus especificidades en la fosforilación de sustratos y sus diferentes roles en la diferenciación.

CAPITULO III

PKAC, una isoforma con características de pseudoquinasa?

III.1. Introducción y objetivos específicos

Las proteínas que pertenecen a la familia de las proteínas quinasas poseen un dominio conservado que es conocido como dominio quinasa o dominio catalítico. Este dominio está compuesto por 250-300 residuos de aminoácidos que se pueden subdividir en doce subdominios (I-XII) que tienen la característica de estar formados por residuos altamente conservados y nunca son interrumpidos por grandes inserciones de aminoácidos. Como se detalla en la introducción de la tesis, los motivos requeridos para la actividad quinasa han sido extensamente caracterizados (13, 244, 245).

Dentro de la gran familia de las proteínas quinasas (PKs) se encontró un subgrupo de quinasas que fueron llamadas pseudoquinasas. Este subgrupo de proteínas se denominó de esta manera por carecer de uno o más de los residuos conservados esenciales para la actividad catalítica.

Una quinasa es definida como posible pseudoquinasa a partir de su secuencia cuando carece de al menos uno de los cuatro motivos del dominio catalítico que son esenciales para la catálisis. Esos cuatro motivos son:

1. el motivo VAIK del subdominio II, que en PKA es YAMK
2. el motivo HRD del subdominio VIB, en PKA YRD
3. el motivo DFG del subdominio VII
4. y más reciente se propuso que alteraciones en el *loop* G de unión a ATP servirían también como marcador de pseudoquinasas (202). Estos dominios están marcados con líneas de color verde en la figura 56.

PKAC de *M. circinelloides* conserva intacto el motivo YAMK del subdominio II, el motivo DFG del subdominio VII y la secuencia GxGxxG del subdominio I que constituye el sitio de unión a ATP. Sin embargo tiene sustituidos el aspártico del motivo HRD del subdominio VIB (112).

Si bien en principio se definía a una pseudoquinasa en función de su análisis de secuencia. Se han empezado a encontrar ejemplos que muestran que no todos los dominios quinasas que carecen de residuos esenciales son inactivos. Por ejemplo, cuatro isoformas de la quinasa Wnk fueron clasificadas inicialmente como pseudoquinasas por carecer de la lisina del motivo VAIK (246). Sin embargo, Wnk1 es catalíticamente activa y estudios estructurales del dominio catalítico demostraron que un residuo lisina en el subdominio I sustituye al residuo de lisina perdido en el subdominio II (203). Varios otros ejemplos de quinasas pensadas inicialmente

inactivas cuya actividad luego se demostró han sido publicados, como el caso de las quinasas CASK, Titin, Haspin o Ryk (204, 205, 247-249). El caso de CASK es muy particular, ya que presenta una actividad catalítica inusual, dado que es capaz de fosforilar en ausencia de Mg^{2+} y la presencia de este ión actúa como inhibidor (204, 205). Por otro lado hay ejemplos de proteínas quinasas que presentan alterados algunos de los motivos mencionados que no se les ha podido medir actividad, como ILK que presenta alteraciones en el motivo HRD y DFG (250), o KRS1 y KRS2 con alteraciones en el HRD (251). Estas últimas al igual que PKA, pertenecen al grupo de las proteínas quinasas denominadas AGC.

Las pseudoquinasas ``verdaderas`` son consideradas inactivas y serían vestigios remanentes de quinasas activas que cumplirían una función de *scaffold* o andamiaje y están tomando importancia por su rol regulatorio en varias vías de transducción de señales (199).

Dado que hay ejemplos de quinasas con alteraciones en su secuencia que pueden presentar actividad, es importante determinar si una quinasa definida como putativa pseudoquinasa a partir del análisis de su secuencia, es verdaderamente inactiva y definirla como una ``verdadera`` pseudoquinasa.

Análisis bioquímicos permiten verificar si la quinasa posee o no actividad y el análisis de su estructura permite justificar la falta o no de actividad. Una quinasa que presenta alteraciones en su secuencia puede mantener la actividad catalítica si esas alteraciones resultan compensadas en su estructura (203).

Junto con el primer gen clonado y secuenciado para la subunidad R en *M. circinelloides*, se clonó y secuenció un gen codificante para una subunidad C (112). Como se vio en el capítulo anterior, estos genes codifican sólo para una de las múltiples isoformas de R y C presentes en el hongo.

Si bien, el gen *pkaC* codifica para una proteína que contiene un dominio quinasa que posee alta homología con las proteínas quinasas serina / treonina, llamó la atención la falta de ciertos residuos esenciales para la actividad catalítica. Sabiendo de la existencia de múltiples genes *pkaC*, se planteó la posibilidad de que este gen sea una pseudoquinasa. Esta hipótesis se abordó haciendo un análisis de la secuencia de aminoácidos de PKAC y haciendo ensayos para probar si esta quinasa inusual posee o no actividad catalítica.

III.2. Resultados

III.2.1. Análisis de la secuencia de PKAC

Se realizó una comparación de secuencias, haciendo un alineamiento entre las secuencias de aminoácidos correspondientes a PKAC de *M. circinelloides* con las secuencias de la isoforma de la C α bovina (*Bos taurus*) y la isoforma C α de ratón (*Mus musculus*) para analizar las características del dominio catalítico de PKAC (Figura 56).

Del análisis de secuencias se observa en primera instancia que PKAC posee un extremo amino terminal diferente mucho más largo que las otras dos subunidades C. Otra característica es la inserción en el subdominio I del *core* catalítico de un residuo de valina. Esto es llamativo ya que no se esperan inserciones ni deleciones dentro de los subdominios del *core* catalítico (13). Por fuera y río arriba del subdominio I, PKAC presenta otra inserción de 10 residuos. Hacia el carboxilo terminal por fuera de la zona correspondiente al dominio catalítico también se observa otra inserción de varios residuos. Esto resulta llamativo ya que PKA pertenece al grupo de las proteínas quinasas denominadas AGC y una característica de este grupo es tener conservado el extremo C-terminal (252). También se observa una inserción de 5 residuos en el subdominio VIII. Las modificaciones indicadas hasta acá están marcadas en la figura 56 con círculos de color violeta.

A pesar de estas diferencias, presenta un 34% de identidad con C α bovina y C α de ratón. Dentro de los IX subdominios del dominio catalítico, se observó que residuos conservados y algunos claves para la actividad quinasa están ausentes en PKAC:

- 1) Ácido aspártico 166 del subdominio VIB, encargado de orientar al grupo hidroxilo del sustrato (28) con un rol clave en la fosfotransferencia. Este residuo pertenece al motivo HRD, es uno de los que frecuentemente se altera en las pseudoquinasas.
- 2) Asparagina 171, también del subdominio VIB, que participa en la coordinación del Mg²⁺ secundario. Ambos residuos se encuentran ubicados en el llamado *loop* catalítico.
- 3) Treonina 197, reemplazada por leucina. Como se mencionó en la introducción de la tesis, la autofosforilación de este residuo convierte a la enzima de un estado

inactivo a uno activo (20). Esta es una característica de las quinasas en general. Si bien no todas se fosforilan, la mayoría sufre una fosforilación en el segmento de activación en este residuo o en otros de función semejante (253). Si bien este residuo está ausente en PKAC, el residuo equivalente a la T197 posee en posición adyacente un residuo de ácido aspártico, que podría suplir la función de T197 fosforilada. La ausencia de fosforilación en la T197 es crítica para la C de mamíferos, sin embargo, no es tan importante para *S. cerevisiae*. TPK1, posee una treonina análoga a ese residuo en posición 241 y una mutación T241A, no le hace perder la actividad catalítica a esta isoforma, pero afecta su afinidad por la subunidad regulatoria BCY1 (81). Sin embargo, no parece ser una regla para las PKAs de hongos, ya que la activación *in vivo* de la PKA de *Schizosaccharomyces pombe* requiere la fosforilación de T356 presente en el *loop* de activación, que se corresponde con T197 de mamíferos (254).

- 4) Histidina 87 y treonina 195. La T197 coordina el sitio activo estableciendo puentes con la H87, R165, T189 y T195, de los cuales H87 y T195 se encuentran ausentes en PKAC (Figura 56). Se ha definido que la R194 es necesaria para permitir la fosforilación de la T197. En PKAC ese residuo también se encuentra ausente (255).
- 5) Treonina 201, está reemplazada por valina. Este residuo junto con D166 y K168 participan en la liberación del ADP.
- 6) Las fenilalaninas 54 y 187 que ayudan a mantener el sitio activo libre de agua en su conformación cerrada (27), están reemplazadas por valina y leucina. Siendo ambas hidrofóbicas podrían cumplir la misma función.
- 7) Para poder llevar a cabo una actividad catalítica finamente regulada, las regiones distales de una quinasa deben comunicarse alostéricamente entre ellas. (256, 257).

Los residuos V57, M120, L173 y T327 se reordenan durante la unión al nucleótido (79) La PKAC de *M. circinelloides* conserva los residuos mencionados, salvo la T327.

- 8) En el C terminal se definieron también residuos importantes que participan de la unión del sustrato entre ellos la Y330. Estos residuos actúan como mediadores de la unión del Mg^{2+} y el anclaje del ADP. Siendo muy diferente el C-terminal de PKAC, se hace muy difícil el análisis de la presencia de residuos análogos a los descritos en la C de superiores en esta zona.

Si bien, como se mencionó en la introducción, sustituciones en la secuencia de una proteína pueden ser suplidas en función por algún residuo distante en la secuencia lineal pero que logra posicionarse al adoptar la estructura correcta, siendo varias las diferencias encontradas en PKAC respecto a las secuencias de C de mamíferos, esta isoforma de PKA en *M. circinelloides* podría ser una pseudoquinasa.

Ca_Bos_Taurus	0
Ca_Mus_musculus	0
PKAC	MADFTDSLIIKNIGVHSSSPVMTSVNMGQLGEKLRQARTTT	40
Consensus		
Ca_Bos_Taurus	0
Ca_Mus_musculus	0
PKAC	LASLSQALSKKPEAAAAAATAPNAVNESTTTPTTMQLPAS	80
Consensus		
Ca_Bos_Taurus	0
Ca_Mus_musculus	0
PKAC	EKATSQLEINVVEARNLTIADARKADTYCIVHYEGNTTST	120
Consensus		
Ca_Bos_Taurus	0
Ca_Mus_musculus	0
PKAC	LDKVDDGILPSTPLVIKSVASGAFKAFEIMMSASSPKWM	160
Consensus		
Ca_Bos_TaurusM...GN	3
Ca_Mus_musculusM...GN	3
PKAC	HRVNFVDVTAGNKEITVFVYDRGNKLPNGEDRFLGMSSIVP	200
Consensus		m
Ca_Bos_Taurus	AAAAKKGSEQESVKEFLAKAKEDFLKKWENPAQNTAHLDDQ	43
Ca_Mus_musculus	AAAAKKGSEQESVKEFLAKAKEDFLKKWETPSQNTAQLDDQ	43
PKAC	NLVNKK..TVELIFPLHGRPDDDDQEVTDGVRLLQVTF.IDP	237
Consensus	kk e d q t d	
Ca_Bos_TaurusFERI.KTLGTGSFGRVMLVKHMETGNHYAMKI	74
Ca_Mus_musculusFDRI.KTLGTGSFGRVMLVKHKESGNHYAMKI	74
PKAC	KKANLKPEDFRIVFMIGQGSVGVKVEVIKRDSSGRTYAMKV	277
Consensus	ri g gs g v v g yamk	
Ca_Bos_Taurus	LDKQKVVKLKQIEHTLNEKRIL.QAVNFPFLVKLEFSFKD	113
Ca_Mus_musculus	LDKQKVVKLKQIEHTLNEKRIL.QAVNFPFLVKLEFSFKD	113
PKAC	LSKRLLLAENEVDTFMERNVWLVQSLSSPFIANLKYSFQT	317
Consensus	l k ne l q pf l sf	
Ca_Bos_Taurus	NSNLYMVMEYVPGGEMFSLRRIGRFSEPHARFYAAQIVL	153
Ca_Mus_musculus	NSNLYMVMEYVAGGEMFSLRRIGRFSEPHARFYAAQIVL	153
PKAC	TNHLFLVMDYFPGGELFDFLERERCLSEKRCQFFAAEIVC	357
Consensus	l vm y gge f l r se f aa iv	

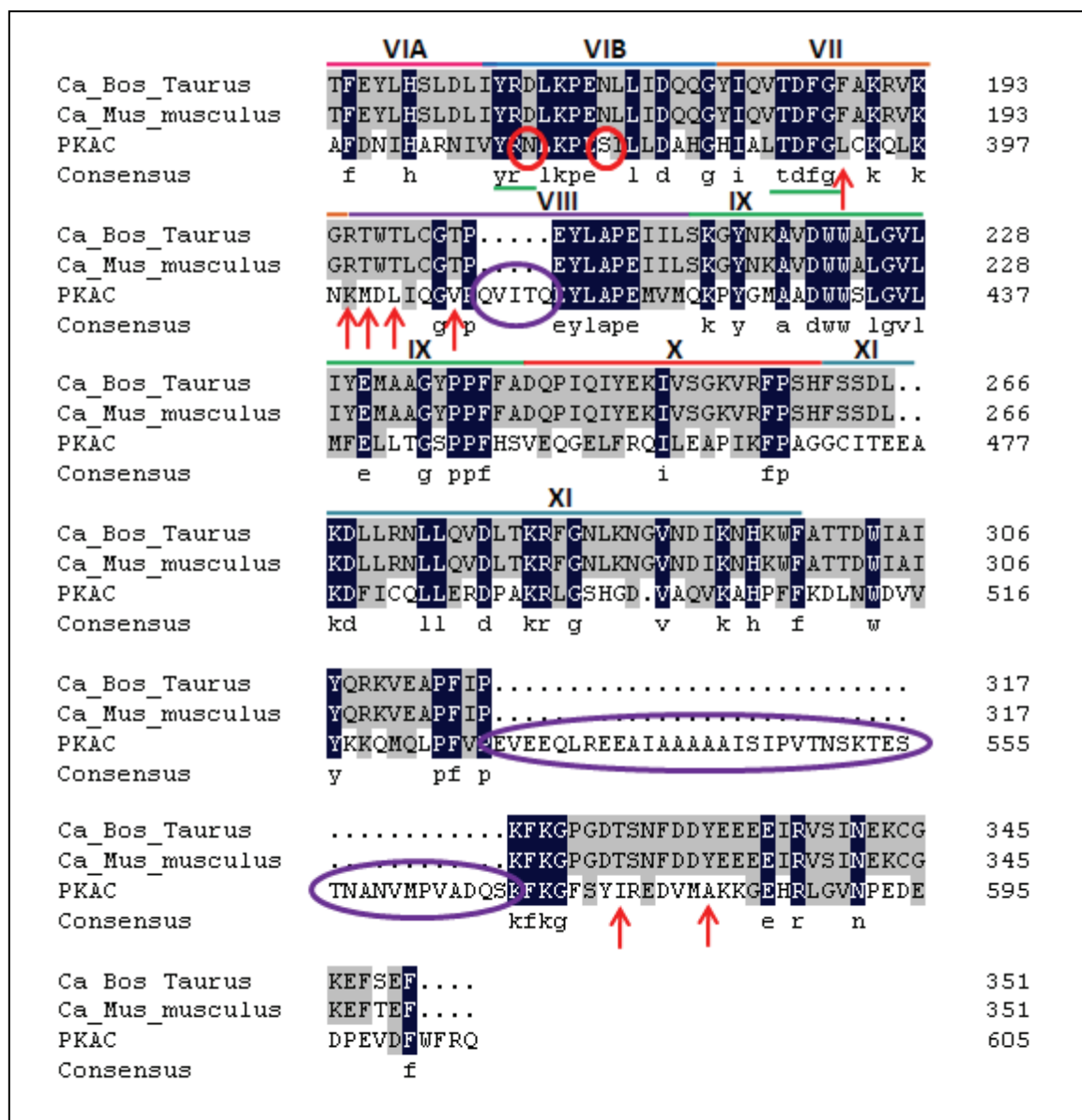


Figura 56- Comparación de las secuencias PKAC-*Ca Bos taurus*-*Ca Mus musculus*. Se realizó un alineamiento con las secuencias proteicas de PKA- α bovina, PKA- α de ratón y PKAC de *M. circinelloides*. Sobre las secuencias se indican con líneas de colores y números romanos los subdominios definidos dentro del core conservado para todas las PKs. Los residuos invariantes para los miembros de la familia de las PKs se indican con líneas verdes y los que están sustituidos en PKAC con círculos rojos. Con flechas rojas se indican otros residuos importantes ausentes en PKAC y en violeta se indican las inserciones y deleciones.

III.2.2. Medición de actividad quinasas

Con el objetivo de poder hacer ensayos bioquímicos para determinar la falta o no de actividad catalítica de PKAC, se subclonó su cDNA de 1820 pb en el vector de

expresión pESC-ura bajo la regulación del promotor Gal1 y se expresó en distintas cepas de levaduras como proteína de fusión con epítopo c-Myc.

Los tres genes de subunidad C de *S. cerevisiae* *tpk1*, *tpk2* y *tpk3*, no pueden ser anulados juntos, ya que ese tipo de mutación es letal para la levadura. Sin embargo se ha logrado una mutante *tpk1^w*, que tiene anulados los genes *tpk2* y *tpk3*, y además posee una mutación en *tpk1* de manera que codifica para una proteína funcionalmente atenuada (fenotipo “*weak*”).

Se emplearon dos cepas con distintos fondos genéticos, ambas poseen deleciones de los genes *tpk2* y *tpk3*, y además presentan la forma atenuada de *tpk1* (*tpk^{w1}*). La diferencia entre ambas cepas es que la primera, *tpk^{w1}* (*tw*), posee una versión normal del gen *bcy1* y la segunda, *tpk^{w1} bcy1Δ* (*twbΔ*), presenta una deleción de este gen (ver Materiales y Métodos). Estas cepas poseen niveles de actividad PKA casi indetectables.

III.2.2.a. Expresión de PKAC en levaduras

Se verificó primero la expresión del gen *pkaC* en las levaduras transformadas analizando los niveles de mRNA y proteína mediante RT-PCR y *Western blot* revelado con anticuerpo anti-cMyc (Figura 57).

Los resultados indicaron que PKAC se expresaba correctamente en ambas cepas a partir de la construcción realizada.

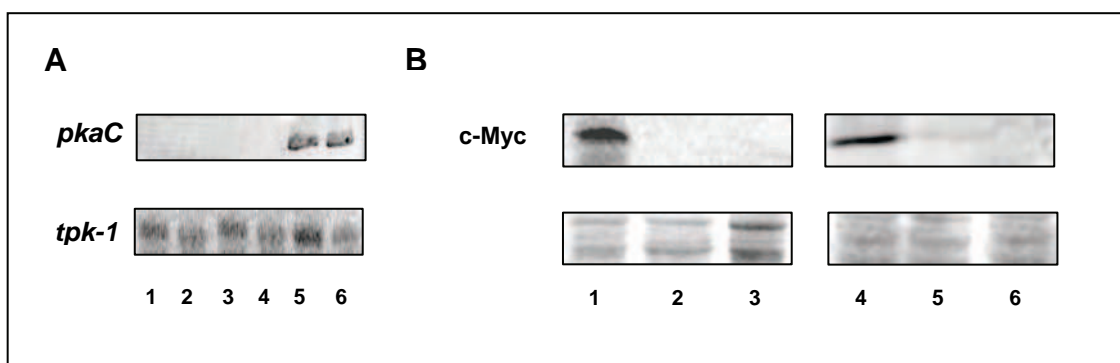


Figura 57- Expresión en levaduras del gen *pkaC*. (A) RT-PCR de las cepas calle 1: *tw*, calle 2: *tw* transformada con el vector vacío (*tw/V*), calle 3: *twbΔ*, calle 4: *twbΔ* transformada con el vector vacío (*twbΔ/V*), calle 5: *tw* transformada con el vector con C (*tw/C*) y calle 6: *twbΔ* transformada con el vector con C (*twbΔ/C*). El gel de abajo muestra un control con primers del promotor de *tpk1*. (B) *Western blot* revelado con anti-cMyc de extractos crudos de las cepas calle 1: *tw/C*, calle 2: *tw/V*, calle 3: *tw*, calle 4: *twbΔ /C*, calle 5: *twbΔ/V* y calle 6: *twbΔ*. Debajo del *Western blot* se muestra el control de carga teñido con rojo Ponceau. Las cepas vacías fueron crecidas en medio YPGal y las transformadas en YNB *ura⁻* gal.

III.2.2.b. Medición de actividad quinasa de PKAC

Con el objetivo de analizar si PKAC posee actividad quinasa a pesar de las sustituciones en residuos claves para la actividad catalítica, se realizaron ensayos de actividad quinasa a partir de fracciones enriquecidas en holoenzima por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% de las cepas *tw* o *twb* Δ transformadas con vector vacío o con el cDNA de *pkaC*, y se evaluó la capacidad de las fracciones de fosforilar kemptido. En la cepa *tw* los ensayos se realizaron en presencia o en ausencia de cAMP para evaluar la dependencia con el nucleótido cíclico y la interacción con la subunidad BCY1.

No se detectó actividad quinasa de PKAC en ninguna de las cepas analizadas (Figura 58).

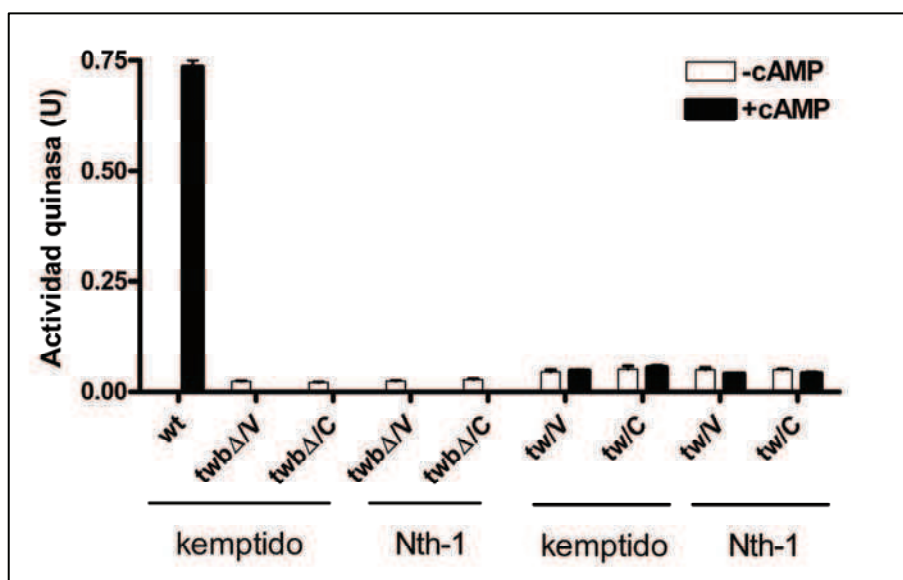


Figura 58- . Medición de actividad quinasa de PKAC. Se determinó actividad fosforilante de kemptido y de Nth-1 en fracciones enriquecidas en PKAC por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% en las cepas *twb* Δ /V, *twb* Δ /C, *tw*/V y *tw*/C en presencia y ausencia de cAMP según se indica. Las cepas se crecieron en medio selectivo en presencia de galactosa. Las unidades de actividad quinasa se definen como pmol de ^{32}P incorporado en el sustrato por min por μg de proteína a 30°C. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de cinco ensayos realizados con preparaciones independientes.

También se ensayó actividad quinasa utilizando otro sustrato en lugar de kemptido. El sustrato empleado fue Nth-1 derivado de la secuencia de trealasa neutra de *S. cerevisiae*. Este péptido fue descrito como sustrato de la $\text{C}\alpha$ bovina y de las isoformas TPK1 y TPK2 de *S. cerevisiae* (258). Se ensayó actividad quinasa con este sustrato porque está demostrado que es mejor sustrato de PKA en levaduras,

dado que posee una mayor K_e (constante de especificidad). Posee una K_m menor que la del kemptido y una V_{max} que es cinco veces mayor.

Si bien, que sea mejor sustrato para quinasas de otros organismos no asegura que también lo sea para PKAC, se quiso descartar la posibilidad de que el kemptido sea pobremente reconocido por esta isoforma de quinasa.

Con este sustrato tampoco se pudo detectar actividad quinasa con Nth-1 en ninguna de las cepas ensayadas (Figura 58).

III.2.2.c. Requerimiento de magnesio

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, recientemente se describió una proteína que fue pensada inicialmente como pseudoquinasa pero que presenta la propiedad inusual de fosforilar en ausencia de Mg^{2+} . Es el caso de la CASK, una quinasa que por carecer del motivo DFG se la pensó inicialmente inactiva, pero al cristalizar su estructura y compararla con la de otras quinasas, se encontró que adoptaba una estructura constitutivamente activa capaz de unir ATP diferenciándose de las quinasas convencionales que para adoptar esta conformación requieren de la unión de Mg^{2+} . En las quinasas la unión del fosfato del ATP está coordinada por la presencia de los iones Mg^{2+} que establecen interacciones con el residuo de ácido aspártico del DFG. En CASK estas interacciones con los fosfatos α y β del ATP se establecen a través de residuos de histidina y lisina presentes en la propia molécula. Se describió incluso inhibición de la actividad catalítica en presencia de este ión en ensayos *in vitro* aunque no se conoce el mecanismo preciso por el cual se da la inhibición (204).

Teniendo en cuenta este antecedente se realizó el ensayo de actividad quinasa en presencia y en ausencia de Mg^{2+} .

En estos experimentos tampoco se detectó actividad quinasa significativa en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 59).

Si bien estos resultados se deberían complementar con la cristalización de la proteína para obtener su estructura y analizar los cambios que pudiera presentar que justifiquen la falta de actividad, en conjunto sugieren que la isoforma PKAC podría ser una pseudoquinasa.

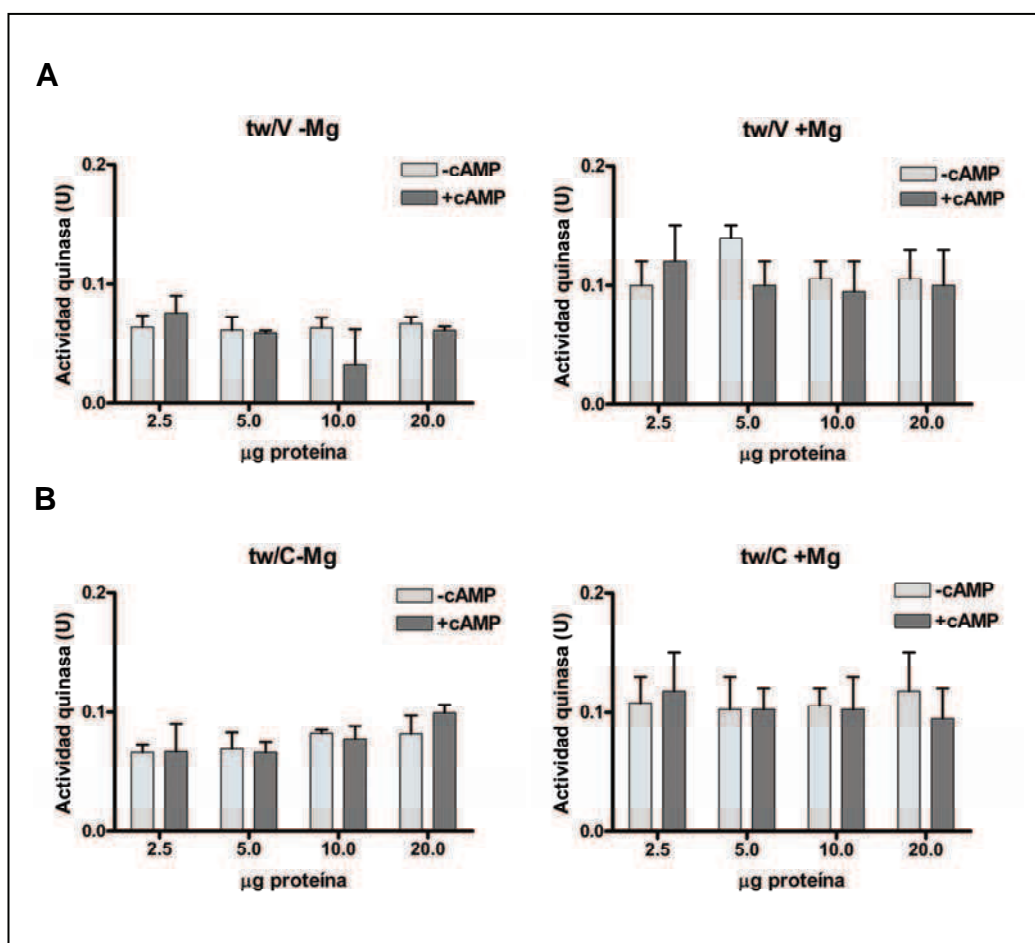


Figura 59- Requerimiento de magnesio. Determinación de actividad PKA en fracciones enriquecidas en holoenzima por precipitación con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 60% de las cepas **(A)** tw/V y **(B)** tw/C en presencia o ausencia de cAMP y de iones Mg^{2+} según se indica. Las cepas se crecieron en medio selectivo en presencia de galactosa. Los datos mostrados corresponden a un ensayo representativo de cinco realizados con preparaciones independientes. La actividad quinasa se expresa en unidades (U) según se define en materiales y métodos.

III.2.3. Acumulación de glucógeno en levaduras

Como no se pudo medir actividad quinasa de PKAC en ensayos *in vitro*, se utilizó otro abordaje para evaluar la posibilidad de que la proteína PKAC expresada en levaduras tuviera actividad catalítica. Para ello se analizó si la sobreexpresión de PKAC modificaba uno de los fenotipos asociados a la vía cAMP-PKA en cepas transformadas con el plásmido que contiene el cDNA para dicha proteína.

Existen en levaduras, según se explicó en la introducción, fenotipos indicativos de alta o baja actividad quinasa A. Si se anula el gen *bcy1*, el resultado es una cepa que posee una actividad de PKA constitutiva e independiente de cAMP,

ya que no se inhibe la actividad catalítica, por lo tanto una cepa con esta característica presenta fenotipos indicativos de alta actividad quinasa, como por ejemplo baja acumulación de glucógeno.

El otro extremo es una cepa con fenotipo *weak*, tpk^{1w} , la cual presenta una mutación y por lo tanto actividad quinasa no medible. Esta cepa presenta, por lo tanto, fenotipos indicativos de baja actividad quinasa. En el caso del glucógeno la acumulación es alta.

Se analizó este fenotipo para evaluar si las cepas que expresan PKAC poseían o no una vía más activa de cAMP-PKA que las cepas sin transformar. Se utilizó como control a la cepa $TPK1bcy1\Delta$ que presenta un fenotipo que se correlaciona con alta actividad quinasa. La acumulación de glucógeno se analizó mediante tinción con yodo de las colonias transformadas con los distintos vectores. Como se ve en la figura 60, las cepas se tiñeron con yodo con igual intensidad, lo que indica una acumulación de glucógeno similar y por lo tanto una baja actividad quinasa. La cepa control que posee anulado el gen *bcy1* presenta la tinción más baja indicativa de alta actividad quinasa A.

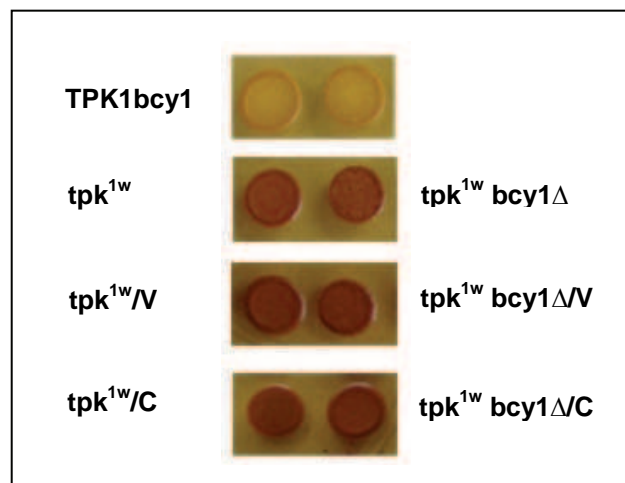


Figura 60- Acumulación de glucógeno. Se crecieron las cepas $TPK1bcy1\Delta$, tpk^{1w} , tpk^{1w}/V , tpk^{1w}/C , $tpk^{1w} bcy1\Delta$, $tpk^{1w} bcy1\Delta/V$ y $tpk^{1w} bcy1\Delta/C$ en medio YP gal 48 hs a 30°C y se tiñeron por exposición a vapores de yodo (1). Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos.

De este análisis se concluye, al igual que las mediciones *in vitro* de actividad quinasa, que PKAC no tendría actividad.

Se podrían haber evaluado otros fenotipos asociados a PKA sin embargo, este resultado sumado a los ensayos *in vitro* de medición de actividad, nos parecieron suficientes para concluir que PKAC no tendría actividad quinasa al menos en el sistema de levaduras.

III.2.4. Interrupción del gen *pkaC*

Asumiendo que PKAC no posee actividad catalítica en *M. circinelloides*, surgió el interrogante de si el gen *pkaC* tendría alguna actividad esencial no redundante con los genes que codifican las otras isoformas PKAC, o si sería sólo un vestigio evolutivo sin función, presente como un resabio de un gen ancestral que habría dado origen a los otros genes *pkaC* funcionales.

Para analizar si el gen *pkaC* cumple alguna función importante en la célula, se trató de construir una cepa *knockout* para este gen. La interrupción se realizó con la misma estrategia utilizada para la interrupción de los genes *pkaR1* y *2*. Se anuló el gen mediante reemplazo génico usando un vector *knockout* con el marcador de selección *pyrG*. Se transformó la cepa de *M. circinelloides* con un fragmento del vector *knockout* que contiene al gen *pyrG* rodeado de las regiones de los extremos 5' y 3' del gen *pkaC* suficientes para permitir la recombinación homóloga (259, 260). Se realizaron varias transformaciones sin éxito hasta que se obtuvieron en una de ellas 43 transformantes iniciales que se crecieron durante varios ciclos vegetativos hasta obtener 15 clones con un porcentaje considerable de crecimiento en medio selectivo respecto al medio sin selección. Se analizaron esos clones por PCR y se encontró que 4 de ellos presentaban la interrupción para el gen *pkaC*.

Para corroborar la interrupción del gen *pkaC* y la homogeneidad de núcleos, se realizó un análisis por PCR de los cuatro clones candidatos. Se utilizaron dos pares de *primers* Sec2F-p2 que debían dar un producto de 0,8 kb si el alelo está interrumpido y el par Caf-Car, que deberían dar un producto de 1,1 kb a partir del gen sin interrumpir (Figura 61B).

Se comprobó con este análisis que a partir de los cuatro clones se obtenían ambos productos y por lo tanto eran heterocariontes ya que presentaban tanto copias del alelo wt como del interrumpido (Figura 61A). A estos clones se los denominó ΔC .

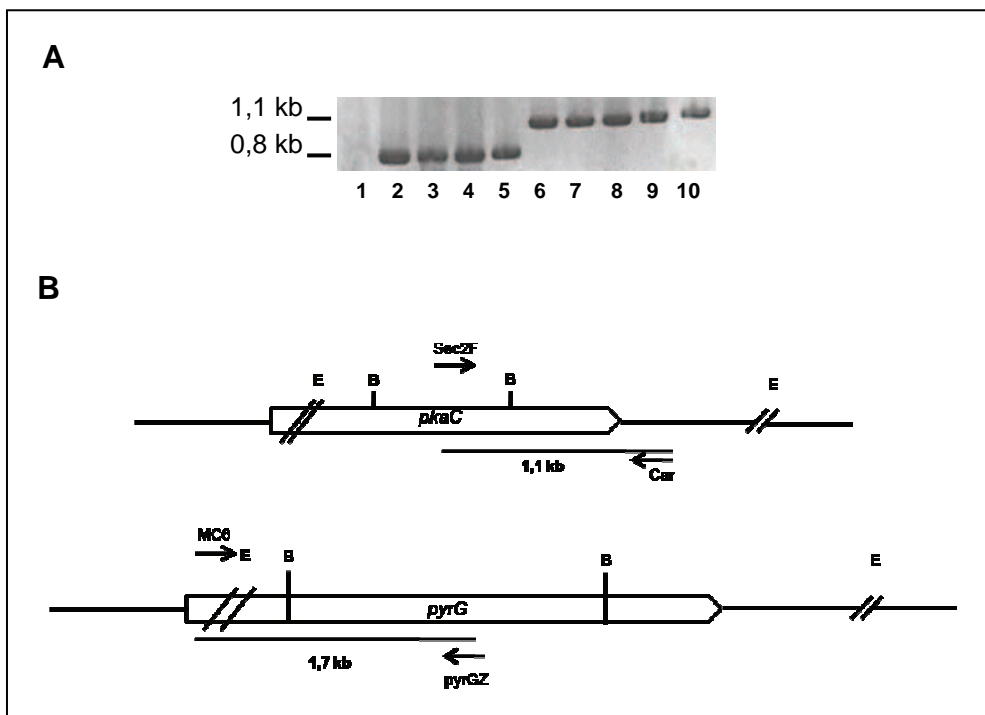


Figura 61- Interrupción del gen *pkaC*. Análisis de los alelos wt y mutante mediante PCR con los pares de *primers* Sec2F/p2 y Caf/Car. **(A)** Gel de agarosa 1% teñido con Bret con los productos de PCR analizados con el par de *primers* Sec2F/p2 calles 1-5 y con el par de *primers* Caf/Car calles 6-10. Calles 1 y 6: cepa wt, calles 2 y 7: clon 4, calles 3 y 8: clon 10, calles 4 y 9: clon 19, calles 5 y 10: clon 25. **(B)** Esquema del locus *pkaC* wt e interrumpido y de los *primers* utilizados. E: *EcoR* I, B: *Bgl* II en la cepa wt y *Bgl* II / *Bam*HI en la cepa mutante.

Cuando se interrumpe un gen los núcleos wt suelen perderse luego de dos o tres pasajes en medio selectivo. Dado que tras 15 pasajes se seguía detectando la presencia de núcleos wt y el porcentaje de crecimiento en medio selectivo respecto al medio sin selección disminuía o se mantenía igual en lugar de aumentar, las opciones más probables eran:

- 1) que hayan quedado restos de vector sin digerir en el DNA utilizado para la transformación
- 2) que se tratara de una mutación letal
- 3) que se tratara de inserciones múltiples.

Cuando ocurren inserciones ectópicas mediante recombinaciones homólogas lo más probable es que ocurran a través del locus del marcador de selección, ya que la auxotrofia de la cepa está dada por una mutación puntual en dicho gen. Por otra parte, para el caso puntual del gen *pkaC*, si bien se conoce hoy la existencia de

otros genes que presentan zonas de alta homología con este gen, *pkaC* difiere de estos principalmente en las regiones amino y carboxilo terminal que son las utilizadas para permitir la recombinación homóloga. Si bien podría haberse dado una inserción ectópica en múltiples lugares anulando otros genes esenciales para la célula, es muy baja la probabilidad de que hubiera ocurrido en varios individuos. Por lo tanto, consideramos esta última opción poco probable.

La posible presencia de vector sin digerir en los clones transformantes se analizó por PCR de cada clon positivo utilizando un *primer* que hibrida sobre la secuencia del vector (pv) y un *primer* que hibrida sobre la secuencia de *pyrG* (p2).

Sólo se obtuvo un producto de 1,5 kb para el control positivo. Ninguno de los clones analizados dio el producto de PCR esperado. Esto indica ausencia de vector *knockout* sin digerir en los clones estudiados (Figura 62B).

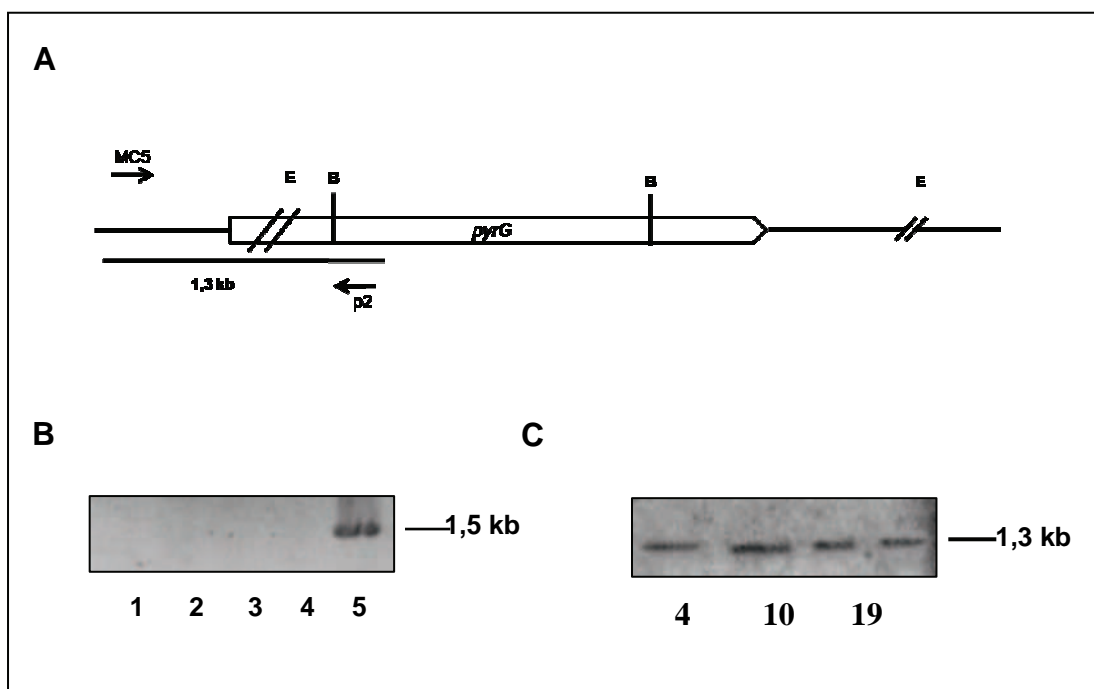


Figura 62- Interrupción del gen *pkaC*. (A) Esquema del locus *pkaC* interrumpido. Están indicados los *primers* MC5 y p2. (B) gel de agarosa 1% teñido con BrEt, mostrando los productos de PCR de los cuatro clones candidatos (C) gel de agarosa 1 % teñido con BrEt con los productos de PCR. Calle 1: clon 4. calle 2: clon 10, calle 3: clon 19, calle 4 clon 25, calle 5: control positivo

La presencia de alelo interrumpido en el genoma se analizó utilizando el par de *primers* MC5-p2. El *primer* MC5 hibrida con el gen wt río arriba de la región clonada en el vector *knockout*, sólo daría producto si la construcción hubiera interrumpido el genoma de *M. circinelloides* (Figura 62A).

Como resultado se obtuvo el producto de PCR esperado de 1,3 kb para los cuatro clones candidatos indicando que el alelo *pkaC* se encontraba interrumpido en el genoma de *M. circinelloides* (Figura 62C).

III.2.5. Análisis de la posible letalidad de la anulación del gen *pkaC*

Para evaluar la posibilidad de letalidad de la mutación debida a la ausencia del producto del gen *pkaC*, se comparó la capacidad de formar colonias a igual inoculo inicial de esporas de los 4 clones ΔC respecto a la cepa wt. Como cepa wt se utilizó la cepa R7B (*leu⁻*) que tiene el mismo fondo genético que los clones ΔC .

Dado que cada espora tiene más de un núcleo, en las etapas iniciales luego de la transformación pueden contener núcleos wt y núcleos interrumpidos. Tras sucesivos pasos en medio selectivo los núcleos wt se pierden por la presión de selección. Si el gen wt fuera indispensable para la vida de la célula al perderse las copias del alelo wt de una espora, esta sería inviable y consecuentemente incapaz de generar colonia. Si se compara entonces la capacidad de formar colonias de las esporas provenientes de individuos heterocariontes (núcleos con alelo wt y núcleos con la mutación letal), con la cepa wt, se observaría que en los sucesivos pasajes en medio selectivo los individuos heterocariontes deberían presentar una capacidad reducida de formar colonias. Esto sería la consecuencia de ir perdiendo los núcleos wt bajo la presión de selección y que sólo crezcan los heterocariontes que mantuvieron una copia del alelo wt. La cepa wt en cambio podría crecer sin problema porque se utiliza la cepa R7B que no presenta auxotrofia por uridina, no sufriría presión de selección.

En la Tabla 9 se puede observar que a igual inoculo inicial de esporas para los cuatro clones heterocariontes disminuyó la capacidad de formar colonias respecto a la cepa wt. Esta disminución sugirió que anular el gen *pkaC* podría ser letal.

Cepa	colonias
Wt	100
Clon 4	4.5 +/- 2
Clon 10	27 +/- 5
Clon 19	4.5 +/- 2
Clon 25	2 +/- 1

Tabla 9- Análisis de la letalidad de la anulación del gen *pkaC*. Se plaquearon 100 esporas por placa de la cepa wt (R7B) y de los cuatro clones candidatos de ΔC en medio MMC pH 3 y se evaluó el número de colonias formadas por cada clon respecto a la cepa wt luego de 48 hs de incubación a 30°C. Los datos se expresaron como porcentaje tomando como 100% al número de colonias obtenidas en la cepa wt. El ensayo se realizó por triplicado.

III.3. Discusión

Las proteínas quinasas comprenden una de las familias de genes más grandes y son responsables de regular numerosos procesos celulares. Estas proteínas comparten un *core* conservado que contiene varios aminoácidos invariantes que contribuyen a su actividad (13). De esta familia de proteínas, PKA es la mejor caracterizada. El prototipo de proteína quinasa A es la PKA de mamíferos, de la cual se dispone de mucha información bioquímica y estructural, sin embargo, poco se sabe de esta enzima en otros organismos.

En este capítulo de la tesis se caracterizó el gen *pkaC* que codifica para una de las múltiples isoformas de subunidad C de PKA de *M. circinelloides* (112).

Del análisis de la secuencia de PKAC se pudo observar el reemplazo de residuos altamente conservados y claves para la actividad catalítica de las quinasas. El cambio más llamativo que presenta PKAC, es la ausencia del residuo D166 y fue el primer indicio de que PKAC no tuviera actividad y pudiera ser definida como una pseudoquinasa.

Algunas quinasas descritas como pseudoquinasas retienen actividad pese a la pérdida de residuos claves para la funcionalidad como Wnk (203) y Titin (247). Al resolverse sus estructuras cristalográficas se revelaron cambios compensatorios que permiten mantener la función catalítica. Otro ejemplo es CASK, que había sido clasificada también como una pseudoquinasa por la pérdida de el motivo DFG, clave para la actividad quinasa (198), pero fue redefinida recientemente ya que se demostró que logra unir ATP en forma constitutiva y tiene actividad enzimática (204). En base a estos antecedentes se pensó inicialmente que PKAC, a pesar de los cambios descritos en su secuencia, podría tener actividad quinasa. Sin embargo, la alteración que presenta PKAC en el motivo HRD del dominio catalítico, la sustitución del D166, ninguna de las quinasas con actividad poco usual la presenta, ya que sus alteraciones corresponden a otros dominios. Si bien PKAC podría tener actividad quinasa en condiciones no convencionales en las que sea capaz de unir ATP independientemente de la pérdida del D166, no hay antecedentes de que alteraciones en el motivo HRD hayan sido compensados con otra mutación, por el contrario, quinasas con alteraciones en este dominio se asocian con “verdaderas” pseudoquinasas (202). Algunos ejemplos son Ryk, KRS1,

KRS2 y CCK4 que presentan alteraciones en ese dominio y no se les pudo detectar actividad quinasa experimentalmente.

Así como *M. circinelloides* que presenta muchas isoformas de PKAC, se ha demostrado multiplicidad de genes C en otros hongos, algunos ejemplos son *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans*, *Ustilago maydis*, *S. cerevisiae*, *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* (94-101) entre otros. En *A. fumigatus* existen dos copias de gen *pkaC1* y 2. El gen *pkaC2* que codifica para subunidad C, se clasificó como un pseudogen por carecer de la secuencia necesaria para unir ATP. Sin embargo no se ha demostrado bioquímicamente si esta variante posee o no actividad (39(101)).

En el caso de *M. circinelloides* la isoforma PKAC, presenta varios cambios en su secuencia además de la sustitución de D166. Al analizar la secuencia se observaron inserciones y deleciones de residuos presentes en los subdominios del *core* catalítico, como así también el reemplazo de ciertos residuos por otros que en algunos casos son sustituciones conservadas y en otros casos no. No obstante, no podemos asegurar que los reemplazos por residuos similares puedan cumplir la misma función. Este análisis debería completarse con la cristalización de PKAC.

Si bien se logró expresar PKAC en el sistema de levaduras, no se pudo medir actividad quinasa con ninguno de los sustratos ensayados, ni tampoco en ausencia de Mg^{2+} , condición de actividad descrita para la pseudoquinasa CASK. Tampoco se pudo detectar actividad quinasa por análisis de fenotipo asociado a PKA en cepas de levadura que expresan PKAC.

Los intentos de construir la cepa *knockout* para *pkaC* fueron también infructuosos y dieron solo como resultado la obtención de cepas heterocariontes para la mutación.

En base a los resultados obtenidos en las cepas de levaduras y en el mismo *Mucor*, proponemos que PKAC sería una pseudoquinasa que podría estar cumpliendo algún rol importante para la célula como los descritos para las “verdaderas” pseudoquinasas. Estos roles podrían ser regulatorios de la actividad de otras quinasas o de andamiaje en la formación de complejos multiproteicos. La existencia de múltiples isoformas de subunidad C le da más fuerza a la posibilidad de que PKAC sea una pseudoquinasa. Finalmente, por la imposibilidad de anular el gen, pareciera no ser redundante en función con las otras isoformas PKAC.

Proponemos entonces que PKAC podría ser una verdadera pseudoquinasa con alguna función importante para la célula no redundante con las otras isoformas de subunidad C.

CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar bioquímicamente la interacción entre las subunidades R y C de la PKA de hongo *Mucor circinelloides* y determinar su rol en el desarrollo y diferenciación del hongo para avanzar en el entendimiento del mecanismo de activación de la PKA. Este estudio aporta al conocimiento del funcionamiento de la quinasa A, elemento clave de la vía de transducción de señales por cAMP en un modelo diferente al de mamíferos. Es muy importante contar con modelos alternativos, dado que el conocimiento que se posee de la PKA deriva principalmente de datos obtenidos de RI, RII y C α de corazón bovino y de ratón. El estudio de otros modelos permite construir conceptos más generales y universales. El modelo fúngico de *M. circinelloides* en particular, permite conocer más sobre la PKA en el reino hongos y es importante por sus características distintivas en relación con las PKAs de otros organismos.

El estudio de la interacción entre las subunidades R y C a través del análisis de la participación de la región *linker I*, realizado en el capítulo I, constituye el primer estudio en profundidad de la participación de esta región en la interacción entre las subunidades de PKA. Este análisis, reveló la importancia de los residuos ácidos presentes en la región como así también la participación en establecer la mayor fuerza de interacción R-C en la holoenzima de *M. circinelloides*.

Con el objetivo de evaluar en forma directa la participación de la PKA en la morfología y desarrollo de *M. circinelloides*, se construyó una cepa mutante que carece del gen *pkaR1* ($\Delta R1$). En el capítulo II se presentan los resultados derivados del análisis de las características bioquímicas y fenotípicas de esta cepa. En función de ellos surgió la hipótesis de la posible existencia de otros genes que codifiquen para la subunidad R. Paralelamente en el instituto Joint Genome, se estaba realizando la secuenciación del genoma de *M. circinelloides*. Analizando la secuencia del genoma se pudieron identificar tres nuevos genes *pkaR* que presentaban homología con *pkaR1*, a los que se denominó *pkaR2*, *pkaR3* y *pkaR4*. Este resultado es importante ya que es la primera vez que se describe la existencia de más de un gen codificante para subunidad R de PKA en el reino hongos.

La expresión de los genes *pkaR* a nivel de mRNA y proteína a distintos tiempos del desarrollo presenta un patrón de expresión característico, indicando que cada isoforma PKAR podría cumplir un rol particular durante el crecimiento y la diferenciación de *M. circinelloides*. El análisis de las características bioquímicas y

fenotípicas de una segunda mutante *knockout* correspondiente al gen *pkaR2* ($\Delta R2$), confirmó el rol diferencial de cada isoforma en el desarrollo del hongo.

Las mutantes $\Delta R1$ y $\Delta R2$ presentan diferencias tanto bioquímicas como morfológicas respecto a la cepa wt y entre sí. Mientras que $\Delta R1$ presenta disminución de la actividad quinasa total y un aumento de la relación de actividad $-/+$ cAMP, $\Delta R2$ presenta una disminución de la capacidad de unir cAMP mayor que $\Delta R1$. A nivel morfológico las diferencias más llamativas son que $\Delta R1$ presenta disminución en la velocidad de crecimiento en medio sólido y en la producción de esporas. Estos aspectos de la morfología no están afectados en $\Delta R2$. Por el contrario en $\Delta R2$ son más llamativas las alteraciones durante el crecimiento en medio líquido, ya que esta cepa emite el tubo germinativo en forma adelantada con respecto a la cepa wt. El patrón de expresión de los otros genes *pkaR* es diferente en cada mutante. Mientras que en $\Delta R1$ no se altera la expresión de los otros tres genes *pkaR*, en $\Delta R2$ disminuye la expresión de *pkaR3* y aumenta la expresión de *pkaR4*, tanto a nivel de mRNA como de proteína.

Se describió además que *M. circinelloides* presenta multiplicidad de genes *pkaC* (240). El análisis de los niveles de mRNA de estos genes en las cepas $\Delta R1$ y wt permitió agruparlos en genes de alto y bajo nivel de expresión, pero no se encontraron diferencias significativas de expresión ni a lo largo del crecimiento ni por ausencia del gen *pkaR1* en la cepa mutante $\Delta R1$.

Del análisis de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las isoformas PKAR, se infirió por la conservación de la posición y secuencias de los sitios de *splicing*, que los distintos genes podrían provenir de duplicación génica. Del análisis de los genomas fúngicos accesibles públicamente se demostró que estas duplicaciones ocurrieron solo en los Zygomycetes (*Rhizopus* y *Phicomycetes*). El análisis filogenético de las secuencias proteicas sugirió que el evento de duplicación que dio lugar a los genes *pkaR* ocurrió en un ancestro Zygomycete antes de la divergencia de especies porque cada proteína homóloga PKAR de *M. circinelloides* está más relacionada a los ortólogos presentes en *R. oryzae* y *P. blakesleeanus* que a los propios parálogos.

Los análisis de proteína por *Western blot* demostraron la existencia de subunidad R con un PM aparente mucho mayor que el predicho de la secuencia de aminoácidos. Se analizaron posibles modificaciones post-traduccionales y se encontró que las formas de 120 kDa resultan de la poliubiquitinación de alguna de

las isoformas PKAR. Además al hacer este análisis se encontró que la isoforma de 60 kDa que corresponde a PKAR2 se encuentra monoubiquitinada.

Finalmente, en el capítulo III se presentan resultados que permiten postular que la isoforma PKAC presenta características de pseudoquinasa. Mediante el análisis de su secuencia aminoacídica se encontró que posee cambios en residuos claves para la actividad catalítica. PKAC expresada en un sistema de levaduras no presentó actividad quinasa medible ni empleando distintos sustratos, ni tampoco en ausencia de Mg^{2+} . La imposibilidad de lograr una cepa *knockout* para PKAC, sumado a la existencia de múltiples genes codificantes para subunidad C, sugiere que *pkaC* cumple alguna función no redundante con el resto de los genes *pkaC* que es vital para la célula.

La multiplicidad de isoformas de R y C plantea la posibilidad de una gran variedad de combinaciones para dar múltiples isoformas de PKA. Las distintas PKA formadas podrían presentar distinta localización subcelular, a través de los distintos dominios N-terminales de las subunidades R, distinta especificidad de sustrato, distinto grado de activación y consecuentemente, distinta función biológica.

PERSPECTIVAS

A partir del trabajo realizado en esta tesis quedaron planteadas situaciones y sugirieron preguntas que podrían guiar la continuación de este trabajo. Planteamos como tareas a realizar:

- 1) Continuar con la construcción de las mutantes de los genes *pkaR3* y *pkaR4*, y estudiar sus implicancias en la morfología y su participación en las distintas etapas del desarrollo celular de *M. circinelloides*.
- 2) Profundizar el estudio de los distintos genes *pkaC*:
 - a. Analizar las secuencias y predecir intrones.
 - b. Analizar la expresión de los genes *pkaC* recientemente hallados.
 - c. Analizar si la expresión de los genes *pkaC* modula la expresión diferencial de los genes *pkaR*.
- 3) Continuar con los análisis de ubiquitinación:
 - a. Identificar cual o cuales subunidades R se encuentran poliubiquitinadas y en que residuo ocurre la monoubiquitinación de PKAR2.
 - b. Analizar la función que cumplen las distintas formas de ubiquitinación: poliubiquitinación y estabilidad de la isoforma modificada, monoubiquitinación y modulación de la actividad PKA.
- 4) Continuar con la caracterización de PKAC:
 - a. Cristalizar y modelar la estructura de PKAC para analizar si la ausencia de residuos conservados en las quinasas altera o no la estructura.
 - b. Analizar si es capaz de unir ATP y de interactuar con la subunidad R.
 - c. Buscar proteínas que presenten interacción con C para analizar su rol como andamio de complejo con otras moléculas.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

1. Chester VE 1968 Heritable glycogen-storage deficiency in yeast and its induction by ultra-violet light. *J Gen Microbiol* 51:49-56
2. Sutherland EW 1972 Studies on the mechanism of hormone action. *Science* 177:401-408
3. Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG 1968 An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 243:3763-3765
4. Zubay G, Schwartz D, Beckwith J 1970 Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66:104-110
5. Klein PS, Sun TJ, Saxe CL, 3rd, Kimmel AR, Johnson RL, Devreotes PN 1988 A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*. *Science* 241:1467-1472
6. Goulding EH, Ngai J, Kramer RH, Colicos S, Axel R, Siegelbaum SA, Chess A 1992 Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons. *Neuron* 8:45-58
7. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL 1998 Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396:474-477
8. Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM 1998 A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282:2275-2279
9. Kopperud R, Krakstad C, Selheim F, Doskeland SO 2003 cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett* 546:121-126
10. Doskeland SO, Ogreid D 1984 Characterization of the interchain and intrachain interactions between the binding sites of the free regulatory moiety of protein kinase I. *J Biol Chem* 259:2291-2301
11. Ogreid D, Doskeland SO 1982 Activation of protein kinase isoenzymes under near physiological conditions. Evidence that both types (A and B) of cAMP binding sites are involved in the activation of protein kinase by cAMP and 8-N3-cAMP. *FEBS Lett* 150:161-166
12. Rannels SR, Corbin JD 1981 Studies on the function of the two intrachain cAMP binding sites of protein kinase. *J Biol Chem* 256:7871-7876
13. Hanks SK, Hunter T 1995 Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9:576-596
14. Johnson DA, Akamine P, Radzio-Andzelm E, Madhusudan M, Taylor SS 2001 Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* 101:2243-2270
15. Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM 1991 Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253:407-414
16. Taylor SS, Yang J, Wu J, Haste NM, Radzio-Andzelm E, Anand G 2004 PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1697:259-269
17. Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM 1991 Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253:414-420
18. Bossemeyer D, Engh RA, Kinzel V, Ponstingl H, Huber R 1993 Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å

- structure of the complex with Mn^{2+} adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24). *EMBO J* 12:849-859
19. Zheng J, Knighton DR, ten Eyck LF, Karlsson R, Xuong N, Taylor SS, Sowadski JM 1993 Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry* 32:2154-2161
 20. Steinberg RA, Cauthron RD, Symcox MM, Shuntoh H 1993 Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *Mol Cell Biol* 13:2332-2341
 21. Beebe SJ, Oyen O, Sandberg M, Froyso A, Hansson V, Jahnsen T 1990 Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol* 4:465-475
 22. Narayana N, Cox S, Nguyen-huu X, Ten Eyck LF, Taylor SS 1997 A binary complex of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase and adenosine further defines conformational flexibility. *Structure* 5:921-935
 23. Madhusudan, Trafny EA, Xuong NH, Adams JA, Ten Eyck LF, Taylor SS, Sowadski JM 1994 cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer. *Protein Sci* 3:176-187
 24. Granot J, Mildvan AS, Kaiser ET 1980 Studies of the mechanism of action and regulation of cAMP-dependent protein kinase. *Arch Biochem Biophys* 205:1-17
 25. Zhou J, Adams JA 1997 Participation of ADP dissociation in the rate-determining step in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* 36:15733-15738
 26. Grant BD, Adams JA 1996 Pre-steady-state kinetic analysis of cAMP-dependent protein kinase using rapid quench flow techniques. *Biochemistry* 35:2022-2029
 27. Khavrutskii IV, Grant B, Taylor SS, McCammon JA 2009 A transition path ensemble study reveals a linchpin role for $Mg(2+)$ during rate-limiting ADP release from protein kinase A. *Biochemistry* 48:11532-11545
 28. Madhusudan, Akamine P, Xuong NH, Taylor SS 2002 Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Nat Struct Biol* 9:273-277
 29. Herberg FW, Doyle ML, Cox S, Taylor SS 1999 Dissection of the nucleotide and metal-phosphate binding sites in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* 38:6352-6360
 30. Shabb JB 2001 Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* 101:2381-2411
 31. Kemp BE, Graves DJ, Benjamini E, Krebs EG 1977 Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 252:4888-4894
 32. Dell'Acqua ML, Scott JD 1997 Protein kinase A anchoring. *J Biol Chem* 272:12881-12884
 33. Fantozzi DA, Harootunian AT, Wen W, Taylor SS, Feramisco JR, Tsien RY, Meinkoth JL 1994 Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J Biol Chem* 269:2676-2686
 34. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W 1990 cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 59:971-1005
 35. Banky P, Newlon MG, Roy M, Garrod S, Taylor SS, Jennings PA 2000 Isoform-specific differences between the type Ialpha and IIalpha cyclic AMP-dependent

- protein kinase anchoring domains revealed by solution NMR. *J Biol Chem* 275:35146-35152
36. Kinderman FS, Kim C, von Daake S, Ma Y, Pham BQ, Spraggon G, Xuong NH, Jennings PA, Taylor SS 2006 A dynamic mechanism for AKAP binding to RII isoforms of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell* 24:397-408
 37. Newlon MG, Roy M, Morikis D, Hausken ZE, Coghlan V, Scott JD, Jennings PA 1999 The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR. *Nat Struct Biol* 6:222-227
 38. Berman HM, Ten Eyck LF, Goodsell DS, Haste NM, Kornev A, Taylor SS 2005 The cAMP binding domain: an ancient signaling module. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:45-50
 39. Diller TC, Madhusudan, Xuong NH, Taylor SS 2001 Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit. *Structure* 9:73-82
 40. Su Y, Dostmann WR, Herberg FW, Durick K, Xuong NH, Ten Eyck L, Taylor SS, Varughese KI 1995 Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains. *Science* 269:807-813
 41. Li F, Gangal M, Jones JM, Deich J, Lovett KE, Taylor SS, Johnson DA 2000 Consequences of cAMP and catalytic-subunit binding on the flexibility of the A-kinase regulatory subunit. *Biochemistry* 39:15626-15632
 42. Brown SH, Wu J, Kim C, Alberto K, Taylor SS 2009 Novel isoform-specific interfaces revealed by PKA RIIbeta holoenzyme structures. *J Mol Biol* 393:1070-1082
 43. Reimann EM, Walsh DA, Krebs EG 1971 Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 246:1986-1995
 44. Lee DC, Carmichael DF, Krebs EG, McKnight GS 1983 Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:3608-3612
 45. Scott JD, Glaccum MB, Zoller MJ, Uhler MD, Helfman DM, McKnight GS, Krebs EG 1987 The molecular cloning of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5192-5196
 46. Clegg CH, Cadd GG, McKnight GS 1988 Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3703-3707
 47. Jahnsen T, Hedin L, Kidd VJ, Beattie WG, Lohmann SM, Walter U, Durica J, Schulz TZ, Schiltz E, Browner M, et al. 1986 Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 261:12352-12361
 48. Banky P, Roy M, Newlon MG, Morikis D, Haste NM, Taylor SS, Jennings PA 2003 Related protein-protein interaction modules present drastically different surface topographies despite a conserved helical platform. *J Mol Biol* 330:1117-1129
 49. Hausken ZE, Coghlan VM, Hastings CA, Reimann EM, Scott JD 1994 Type II regulatory subunit (RII) of the cAMP-dependent protein kinase interaction with A-kinase anchor proteins requires isoleucines 3 and 5. *J Biol Chem* 269:24245-24251
 50. Li Y, Rubin CS 1995 Mutagenesis of the regulatory subunit (RII beta) of cAMP-dependent protein kinase II beta reveals hydrophobic amino acids that are

- essential for RII beta dimerization and/or anchoring RII beta to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 270:1935-1944
51. Banky P, Huang LJ, Taylor SS 1998 Dimerization/docking domain of the type Ialpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. Requirements for dimerization and docking are distinct but overlapping. *J Biol Chem* 273:35048-35055
 52. Tasken K, Skalhegg BS, Tasken KA, Solberg R, Knutsen HK, Levy FO, Sandberg M, Orstavik S, Larsen T, Johansen AK, Vang T, Schrader HP, Reinton NT, Torgersen KM, Hansson V, Jahnsen T 1997 Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31:191-204
 53. Amieux PS, McKnight GS 2002 The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. *Ann N Y Acad Sci* 968:75-95
 54. Cummings DE, Brandon EP, Planas JV, Motamed K, Idzerda RL, McKnight GS 1996 Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII beta subunit of protein kinase A. *Nature* 382:622-626
 55. Canaves JM, Taylor SS 2002 Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. *J Mol Evol* 54:17-29
 56. Zick SK, Taylor SS 1982 Interchain disulfide bonding in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem* 257:2287-2293
 57. Scott JD, Stofko RE, McDonald JR, Comer JD, Vitalis EA, Mangili JA 1990 Type II regulatory subunit dimerization determines the subcellular localization of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 265:21561-21566
 58. Pawson T, Scott JD 1997 Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278:2075-2080
 59. Vigil D, Blumenthal DK, Heller WT, Brown S, Canaves JM, Taylor SS, Trehwella J 2004 Conformational differences among solution structures of the type Ialpha, Ialpha and Ibeta protein kinase A regulatory subunit homodimers: role of the linker regions. *J Mol Biol* 337:1183-1194
 60. Dunker AK, Garner E, Guillot S, Romero P, Albrecht K, Hart J, Obradovic Z, Kissinger C, Villafranca JE 1998 Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. *Pac Symp Biocomput*:473-484
 61. Wright PE, Dyson HJ 1999 Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 293:321-331
 62. Vigil D, Blumenthal DK, Taylor SS, Trehwella J 2006 Solution scattering reveals large differences in the global structures of type II protein kinase A isoforms. *J Mol Biol* 357:880-889
 63. Dostmann WR, Taylor SS 1991 Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I. *Biochemistry* 30:8710-8716
 64. Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Cone RD, Scott JD 1992 Localization of the cAMP-dependent protein kinase to the postsynaptic densities by A-kinase anchoring proteins. Characterization of AKAP 79. *J Biol Chem* 267:16816-16823
 65. Li H, Degenhardt B, Tobin D, Yao ZX, Tasken K, Papadopoulos V 2001 Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RIalpha)-associated protein. *Mol Endocrinol* 15:2211-2228
 66. Herberg FW, Maleszka A, Eide T, Vossebein L, Tasken K 2000 Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA)

- regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. *J Mol Biol* 298:329-339
67. Anand GS, Hotchko M, Brown SH, Ten Eyck LF, Komives EA, Taylor SS 2007 R-subunit isoform specificity in protein kinase A: distinct features of protein interfaces in PKA types I and II by amide H/2H exchange mass spectrometry. *J Mol Biol* 374:487-499
 68. Herberg FW, Taylor SS 1993 Physiological inhibitors of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: effect of MgATP on protein-protein interactions. *Biochemistry* 32:14015-14022
 69. Vigil D, Blumenthal DK, Brown S, Taylor SS, Trewella J 2004 Differential effects of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation. *Biochemistry* 43:5629-5636
 70. Wu J, Brown SH, von Daake S, Taylor SS 2007 PKA type IIalpha holoenzyme reveals a combinatorial strategy for isoform diversity. *Science* 318:274-279
 71. Herberg FW, Dostmann WR, Zorn M, Davis SJ, Taylor SS 1994 Crosstalk between domains in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase: influence of amino terminus on cAMP binding and holoenzyme formation. *Biochemistry* 33:7485-7494
 72. Poteet-Smith CE, Shabb JB, Francis SH, Corbin JD 1997 Identification of critical determinants for autoinhibition in the pseudosubstrate region of type I alpha cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 272:379-388
 73. Kim C, Xuong NH, Taylor SS 2005 Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science* 307:690-696
 74. Kim C, Cheng CY, Saldanha SA, Taylor SS 2007 PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell* 130:1032-1043
 75. Cheng X, Phelps C, Taylor SS 2001 Differential binding of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit isoforms Ialpha and IIbeta to the catalytic subunit. *J Biol Chem* 276:4102-4108
 76. Paveto C, Passeron S, Corbin JD, Moreno S 1989 Two different intrachain cAMP sites in the cAMP-dependent protein kinase of the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *Eur J Biochem* 179:429-434
 77. Yang S, Fletcher WH, Johnson DA 1995 Regulation of cAMP-dependent protein kinase: enzyme activation without dissociation. *Biochemistry* 34:6267-6271
 78. Johnson DA, Leathers VL, Martinez AM, Walsh DA, Fletcher WH 1993 Fluorescence resonance energy transfer within a heterochromatic cAMP-dependent protein kinase holoenzyme under equilibrium conditions: new insights into the conformational changes that result in cAMP-dependent activation. *Biochemistry* 32:6402-6410
 79. Akamine P, Madhusudan, Wu J, Xuong NH, Ten Eyck LF, Taylor SS 2003 Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure. *J Mol Biol* 327:159-171
 80. Shoji S, Titani K, Demaille JG, Fischer EH 1979 Sequence of two phosphorylated sites in the catalytic subunit of bovine cardiac muscle adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 254:6211-6214
 81. Levin LR, Zoller MJ 1990 Association of catalytic and regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase requires a negatively charged side group at a conserved threonine. *Mol Cell Biol* 10:1066-1075
 82. Jarnaess E, Tasken K 2007 Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochem Soc Trans* 35:931-937

83. Zaccolo M, Magalhaes P, Pozzan T 2002 Compartmentalisation of cAMP and Ca(2+) signals. *Curr Opin Cell Biol* 14:160-166
84. Baillie GS, Scott JD, Houslay MD 2005 Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: opposites attract. *FEBS Lett* 579:3264-3270
85. Jarnaess E, Ruppelt A, Stokka AJ, Lygren B, Scott JD, Tasken K 2008 Dual specificity A-kinase anchoring proteins (AKAPs) contain an additional binding region that enhances targeting of protein kinase A type I. *J Biol Chem* 283:33708-33718
86. Huang LJ, Durick K, Weiner JA, Chun J, Taylor SS 1997 D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11184-11189
87. Huang LJ, Durick K, Weiner JA, Chun J, Taylor SS 1997 Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits. *J Biol Chem* 272:8057-8064
88. Angelo R, Rubin CS 1998 Molecular characterization of an anchor protein (AKAPCE) that binds the RI subunit (RCE) of type I protein kinase A from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 273:14633-14643
89. Griffioen G, Branduardi P, Ballarini A, Anghileri P, Norbeck J, Baroni MD, Ruis H 2001 Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. *Mol Cell Biol* 21:511-523
90. Gonzalez GA, Montminy MR 1989 Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59:675-680
91. Baillie GS 2009 Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *FEBS J* 276:1790-1799
92. Borges-Walmsley MI, Walmsley AR 2000 cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol* 8:133-141
93. Harris SD 2006 Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *Int Rev Cytol* 251:41-77
94. Banno S, Ochiai N, Noguchi R, Kimura M, Yamaguchi I, Kanzaki S, Murayama T, Fujimura M 2005 A catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase, PKAC-1, regulates asexual differentiation in *Neurospora crassa*. *Genes Genet Syst* 80:25-34
95. Hicks JK, D'Souza CA, Cox GM, Heitman J 2004 Cyclic AMP-dependent protein kinase catalytic subunits have divergent roles in virulence factor production in two varieties of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 3:14-26
96. D'Souza CA, Alspaugh JA, Yue C, Harashima T, Cox GM, Perfect JR, Heitman J 2001 Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol* 21:3179-3191
97. Durrenberger F, Wong K, Kronstad JW 1998 Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5684-5689
98. Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Wigler M 1987 Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50:277-287
99. Sonneborn A, Bockmuhl DP, Gerads M, Kurpanek K, Sanglard D, Ernst JF 2000 Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 35:386-396

100. Bockmuhl DP, Krishnamurthy S, Gerads M, Sonneborn A, Ernst JF 2001 Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 42:1243-1257
101. Liebmann B, Muller M, Braun A, Brakhage AA 2004 The cyclic AMP-dependent protein kinase a network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 72:5193-5203
102. Rinaldi J, Director Asistente: Rossi S, Director: Moreno S 2009 Estudio bioinformático, bioquímico y estructural de la subunidad Regulatoria de la proteína quinasa dependiente de cAMP en modelos fúngicos.
103. Mazon MJ, Behrens MM, Morgado E, Portillo F 1993 Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to the poor expression of the TPK3 gene. *Eur J Biochem* 213:501-506
104. Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Scott JD, McMullen B, Hurwitz M, Krebs EG, Wigler M 1987 Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7:1371-1377
105. Pan X, Heitman J 1999 Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19:4874-4887
106. Johnson KE, Cameron S, Toda T, Wigler M, Zoller MJ 1987 Expression in *Escherichia coli* of BCY1, the regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. *J Biol Chem* 262:8636-8642
107. Griffioen G, Anghileri P, Imre E, Baroni MD, Ruis H 2000 Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275:1449-1456
108. Santangelo GM 2006 Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:253-282
109. Tamaki H 2007 Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 104:245-250
110. Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM 2001 Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 26:310-317
111. Rossi S, Guthmann M, Moreno S 1992 Autophosphorylation of *Mucor rouxii* cAMP-dependent protein kinase and its role in holoenzyme activation. *Cell Signal* 4:443-451
112. Wolff AM, Appel KF, Petersen JB, Poulsen U, Arnau J 2002 Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*). *FEMS Yeast Res* 2:203-213
113. Zarembek V, Donella-Deana A, Moreno S 2000 Mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinase: in *Mucor rouxii* the apparent specific activity of the cAMP-activated holoenzyme is different than that of its free catalytic subunit. *Arch Biochem Biophys* 381:74-82
114. Sorol MR, Pastori RL, Muro A, Moreno S, Rossi S 2000 Structural and functional analysis of the cAMP binding domain from the regulatory subunit of *Mucor rouxii* protein kinase A. *Arch Biochem Biophys* 382:173-181
115. Pastori R, Moreno S, Passeron S 1985 Polymeric structure of the cyclic AMP-dependent protein kinase from the dimorphic fungus *Mucor rouxii* and purification of its catalytic subunit. *Mol Cell Biochem* 69:55-66

116. Moreno S, Pastori R, Passeron S 1983 Protein kinase from *Mucor rouxii*. Unshielding of new cyclic AMP binding sites upon dissociation of the ternary complex holoenzyme-cyclic AMP. *Mol Cell Biochem* 52:13-16
117. Rosen OM, Erlichman J 1975 Reversible autophosphorylation of a cyclic 3':5'-AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem* 250:7788-7794
118. Zelada A, Castilla R, Passeron S, Giasson L, Cantore ML 2002 Interactions between regulatory and catalytic subunits of the *Candida albicans* cAMP-dependent protein kinase are modulated by autophosphorylation of the regulatory subunit. *Biochim Biophys Acta* 1542:73-81
119. Orłowski M 1991 *Mucor* dimorphism. *Microbiol Rev* 55:234-258
120. Phillips GJ, Borgia PT 1985 Effect of oxygen on morphogenesis and polypeptide expression by *Mucor racemosus*. *J Bacteriol* 164:1039-1048
121. Barrera CR 1983 Formation and ultrastructure of *Mucor rouxii* arthrospores. *J Bacteriol* 155:886-895
122. Lubbehusen TL, Nielsen J, McIntyre M 2003 Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *J Appl Microbiol* 95:1152-1160
123. McIntyre M, Breum J, Arnau J, Nielsen J 2002 Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) during submerged batch cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:495-502
124. Tansey MR 1984 The number of nuclei in sporangiospores of *Rhizoucor* species: taxonomic and biological significance. *Micología* 1089-1094
125. D'Souza CA, Heitman J 2001 Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiol Rev* 25:349-364
126. Bartnicki-Garcia S 1968 Electron microscopy of spore germination and cell wall formation in *Mucor rouxii*. *Arch Microbiol* 63:243-255
127. Lubbehusen T, Gonzalez Polo V, Rossi S, Nielsen J, Moreno S, McIntyre M, Arnau J 2004 Protein kinase A is involved in the control of morphology and branching during aerobic growth of *Mucor circinelloides*. *Microbiology* 150:143-150
128. Sietsma JHW, J.H.G. 1994 Apical wall biogenesis. *The Mycota* 1:126-141
129. Heath IB 1994 The cytoskeleton in hiphal growth, organelle movements and mitosis. *The Mycota*:45-65
130. Bartnicki-Garcia S 1996 The hypha: Unifying thread of the fungal kingdom. *A Century of Mycology*
131. Bartnicki-Garcia S, Nickerson WJ 1962 Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide. *J Bacteriol* 84:829-840
132. Sypherd PS, Borgia PT, Paznokas JL 1978 Biochemistry of dimorphism in the fungus *Mucor*. *Adv Microb Physiol* 18:67-104
133. Bartnicki-Garcia S, Nickerson WJ 1962 Nutrition, growth, and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *J Bacteriol* 84:841-858
134. Pereyra E, V. Zaremberg, and S. Moreno 1992 Effect of dibutyryl cAMP on growth and morphology of germinating *Mucor rouxii* sporangiospores. *Exp Mycol* 16:93-101
135. Pereyra E, Mizyrycki C, Moreno S 2000 Threshold level of protein kinase A activity and polarized growth in *Mucor rouxii*. *Microbiology* 146 (Pt 8):1949-1958
136. Robertson LS, Fink GR 1998 The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13783-13787

137. Cassola A, Parrot M, Silberstein S, Magee BB, Passeron S, Giasson L, Cantore ML 2004 *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase A displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. *Eukaryot Cell* 3:190-199
138. Gold S, Duncan G, Barrett K, Kronstad J 1994 cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* 8:2805-2816
139. Bencina M, Panneman H, Ruijter GJ, Legisa M, Visser J 1997 Characterization and overexpression of the *Aspergillus niger* gene encoding the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit. *Microbiology* 143 (Pt 4):1211-1220
140. Ni M, Rierson S, Seo JA, Yu JH 2005 The *pkaB* gene encoding the secondary protein kinase A catalytic subunit has a synthetic lethal interaction with *pkaA* and plays overlapping and opposite roles in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 4:1465-1476
141. Saudohar M, Bencina M, van de Vondervoort PJ, Panneman H, Legisa M, Visser J, Ruijter GJ 2002 Cyclic AMP-dependent protein kinase is involved in morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Microbiology* 148:2635-2645
142. Zhao W, Panepinto JC, Fortwendel JR, Fox L, Oliver BG, Askew DS, Rhodes JC 2006 Deletion of the regulatory subunit of protein kinase A in *Aspergillus fumigatus* alters morphology, sensitivity to oxidative damage, and virulence. *Infect Immun* 74:4865-4874
143. Rossi S, Moreno S 1994 Regulation of protein kinase A subunits during germination of *Mucor rouxii* sporangiospores. *Eur J Biochem* 222:501-506
144. Wagner A 2005 Distributed robustness versus redundancy as causes of mutational robustness. *Bioessays* 27:176-188
145. Van de Peer Y, Maere S, Meyer A 2009 The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat Rev Genet* 10:725-732
146. Thomas JH 1993 Thinking about genetic redundancy. *Trends Genet* 9:395-399
147. Gu Z, Steinmetz LM, Gu X, Scharfe C, Davis RW, Li WH 2003 Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* 421:63-66
148. Wagner A 2008 Gene duplications, robustness and evolutionary innovations. *Bioessays* 30:367-373
149. Prince VE, Pickett FB 2002 Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat Rev Genet* 3:827-837
150. Lynch M, Conery JS 2000 The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290:1151-1155
151. Wolfe KH, Shields DC 1997 Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387:708-713
152. Thomas JW, Schueler MG, Summers TJ, Blakesley RW, McDowell JC, Thomas PJ, Idol JR, Maduro VV, Lee-Lin SQ, Touchman JW, Bouffard GG, Beckstrom-Sternberg SM, Green ED 2003 Pericentromeric duplications in the laboratory mouse. *Genome Res* 13:55-63
153. Llorente B, Malpertuy A, Neugeglise C, de Montigny J, Aigle M, Artiguenave F, Blandin G, Bolotin-Fukuhara M, Bon E, Brottier P, Casaregola S, Durrens P, Gaillardin C, Lepingle A, Ozier-Kalogeropoulos O, Potier S, Saurin W, Tekaiia F, Toffano-Nioche C, Wesolowski-Louvel M, Wincker P, Weissenbach J, Souciet J, Dujon B 2000 Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 18. Comparative analysis of chromosome maps and synteny with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 487:101-112
154. Llorente B, Durrens P, Malpertuy A, Aigle M, Artiguenave F, Blandin G, Bolotin-Fukuhara M, Bon E, Brottier P, Casaregola S, Dujon B, de Montigny J, Lepingle

- A, Neuveglise C, Ozier-Kalogeropoulos O, Potier S, Saurin W, Tekaia F, Toffano-Nioche C, Wesolowski-Louvel M, Wincker P, Weissenbach J, Souciet J, Gaillardin C 2000 Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 20. Evolution of gene redundancy compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 487:122-133
155. Holland LZ, Albalat R, Azumi K, Benito-Gutierrez E, Blow MJ, Bronner-Fraser M, Brunet F, Butts T, Candiani S, Dishaw LJ, Ferrier DE, Garcia-Fernandez J, Gibson-Brown JJ, Gissi C, Godzik A, Hallbook F, Hirose D, Hosomichi K, Ikuta T, Inoko H, Kasahara M, Kasamatsu J, Kawashima T, Kimura A, Kobayashi M, Kozmik Z, Kubokawa K, Laudet V, Litman GW, McHardy AC, Meulemans D, Nonaka M, Olinski RP, Pancer Z, Pennacchio LA, Pestarino M, Rast JP, Rigoutsos I, Robinson-Rechavi M, Roch G, Saiga H, Sasakura Y, Satake M, Satou Y, Schubert M, Sherwood N, Shiina T, Takatori N, Tello J, Vopalensky P, Wada S, Xu A, Ye Y, Yoshida K, Yoshizaki F, Yu JK, Zhang Q, Zmasek CM, de Jong PJ, Osoegawa K, Putnam NH, Rokhsar DS, Satoh N, Holland PW 2008 The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res* 18:1100-1111
156. Conant GC, Wolfe KH 2008 Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet* 9:938-950
157. Gould SJ, Lewontin RC 1979 The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 205:581-598
158. Lynch M, Force A 2000 The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154:459-473
159. Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, Dejardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjarvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leple JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouze P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D 2006 The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313:1596-1604
160. Duarte JM, Cui L, Wall PK, Zhang Q, Zhang X, Leebens-Mack J, Ma H, Altman N, dePamphilis CW 2006 Expression pattern shifts following duplication indicative of subfunctionalization and neofunctionalization in regulatory genes of *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol* 23:469-478
161. Chapman BA, Bowers JE, Feltus FA, Paterson AH 2006 Buffering of crucial functions by paleologous duplicated genes may contribute cyclicity to angiosperm genome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2730-2735

162. Semon M, Wolfe KH 2007 Consequences of genome duplication. *Curr Opin Genet Dev* 17:505-512
163. Sole RV, Fernandez P, Kauffman SA 2003 Adaptive walks in a gene network model of morphogenesis: insights into the Cambrian explosion. *Int J Dev Biol* 47:685-693
164. Lynch M, O'Hely M, Walsh B, Force A 2001 The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate. *Genetics* 159:1789-1804
165. Gibson TJ, Spring J 1998 Genetic redundancy in vertebrates: polyploidy and persistence of genes encoding multidomain proteins. *Trends Genet* 14:46-49; discussion 49-50
166. Paterson AH, Chapman BA, Kissinger JC, Bowers JE, Feltus FA, Estill JC 2006 Many gene and domain families have convergent fates following independent whole-genome duplication events in *Arabidopsis*, *Oryza*, *Saccharomyces* and *Tetraodon*. *Trends Genet* 22:597-602
167. Galagan JE, Henn MR, Ma LJ, Cuomo CA, Birren B 2005 Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. *Genome Res* 15:1620-1631
168. Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H, Read ND, Lee YH, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, Rehmeier C, Li W, Harding M, Kim S, Lebrun MH, Bohnert H, Coughlan S, Butler J, Calvo S, Ma LJ, Nicol R, Purcell S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW 2005 The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434:980-986
169. Koszul R, Caburet S, Dujon B, Fischer G 2004 Eucaryotic genome evolution through the spontaneous duplication of large chromosomal segments. *EMBO J* 23:234-243
170. Idnurm A, Rodriguez-Romero J, Corrochano LM, Sanz C, Iturriaga EA, Eslava AP, Heitman J 2006 The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4546-4551
171. Lopez-Matas MA, Eslava AP, Diaz-Minguez JM 2000 *Mchs1*, a member of a chitin synthase gene family in *Mucor circinelloides*, is differentially expressed during dimorphism. *Curr Microbiol* 40:169-175
172. Silva F, Torres-Martinez S, Garre V 2006 Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol* 61:1023-1037
173. Darwin C 1859 *The Origin of Species by Means of Natural Selection*.
174. Hershko A, Ciechanover A 1992 The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61:761-807
175. Ye Y, Rape M 2009 Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:755-764
176. Hershko A, Ciechanover A 1998 The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479
177. Hicke L 2001 A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106:527-530
178. Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M 2006 Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:159-180
179. Mukhopadhyay D, Riezman H 2007 Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315:201-205

180. Hoeller D, Crosetto N, Blagoev B, Raiborg C, Tikkanen R, Wagner S, Kowanetz K, Breitling R, Mann M, Stenmark H, Dikic I 2006 Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat Cell Biol* 8:163-169
181. Polo S, Sigismund S, Faretta M, Guidi M, Capua MR, Bossi G, Chen H, De Camilli P, Di Fiore PP 2002 A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416:451-455
182. Pickart CM, Eddins MJ 2004 Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695:55-72
183. Flick K, Ouni I, Wohlschlegel JA, Capati C, McDonald WH, Yates JR, Kaiser P 2004 Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nat Cell Biol* 6:634-641
184. D'Andrea A, Pellman D 1998 Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33:337-352
185. Wilkinson KD 1998 Cellular Regulation by Ubiquitin Dependent Processes. *AdvMolCell Biol* 27:71-104
186. Pickart CM, Fushman D 2004 Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8:610-616
187. Yoshida Y, Chiba T, Tokunaga F, Kawasaki H, Iwai K, Suzuki T, Ito Y, Matsuoka K, Yoshida M, Tanaka K, Tai T 2002 E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* 418:438-442
188. Deshaies RJ, Ferrell JE, Jr. 2001 Multisite phosphorylation and the countdown to S phase. *Cell* 107:819-822
189. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. 2001 HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292:464-468
190. Hoang T, Fenne IS, Cook C, Borud B, Bakke M, Lien EA, Mellgren G 2004 cAMP-dependent protein kinase regulates ubiquitin-proteasome-mediated degradation and subcellular localization of the nuclear receptor coactivator GRIP1. *J Biol Chem* 279:49120-49130
191. Lu Z, Hunter T 2009 Degradation of Activated Protein Kinases by Ubiquitination. *Annual Review* 78:435-475
192. Zhimin L, Tony H 2009 Degradation of activated protein kinases by ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 78:435-475
193. Laub M, Steppuhn JA, Bluggel M, Immler D, Meyer HE, Jennissen HP 1998 Modulation of calmodulin function by ubiquitin-calmodulin ligase and identification of the responsible ubiquitylation site in vertebrate calmodulin. *Eur J Biochem* 255:422-431
194. Kang BS, French OG, Sando JJ, Hahn CS 2000 Activation-dependent degradation of protein kinase C ϵ . *Oncogene* 19:4263-4272
195. Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster DA 1998 Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 18:839-845
196. Wang ML, Panasyuk G, Gwalter J, Nemazanyy I, Fenton T, Filonenko V, Gout I 2008 Regulation of ribosomal protein S6 kinases by ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* 369:382-387
197. Bogusz AM, Brickley DR, Pew T, Conzen SD 2006 A novel N-terminal hydrophobic motif mediates constitutive degradation of serum- and glucocorticoid-induced kinase-1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *FEBS J* 273:2913-2928

198. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S 2002 The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934
199. Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR 2006 Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol* 16:443-452
200. Kannan N, Taylor SS 2008 Rethinking pseudokinases. *Cell* 133:204-205
201. Labesse G, Gelin M, Bessin Y, Lebrun M, Papoin J, Cerdan R, Arold ST, Dubremetz JF 2009 ROP2 from *Toxoplasma gondii*: a virulence factor with a protein-kinase fold and no enzymatic activity. *Structure* 17:139-146
202. Scheeff ED, Eswaran J, Bunkoczi G, Knapp S, Manning G 2009 Structure of the pseudokinase VRK3 reveals a degraded catalytic site, a highly conserved kinase fold, and a putative regulatory binding site. *Structure* 17:128-138
203. Min X, Lee BH, Cobb MH, Goldsmith EJ 2004 Crystal structure of the kinase domain of WNK1, a kinase that causes a hereditary form of hypertension. *Structure* 12:1303-1311
204. Mukherjee K, Sharma M, Urlaub H, Bourenkov GP, Jahn R, Sudhof TC, Wahl MC 2008 CASK Functions as a Mg²⁺-independent neurexin kinase. *Cell* 133:328-339
205. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, Saitoh T, Kawai T, Takeuchi O, Akira S 2008 Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* 9:684-691
206. Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, 3rd, Hynes NE 2003 The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8933-8938
207. Berger MB, Mendrola JM, Lemmon MA 2004 ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett* 569:332-336
208. Luo H, Yu G, Tremblay J, Wu J 2004 EphB6-null mutation results in compromised T cell function. *J Clin Invest* 114:1762-1773
209. Luo H, Rose P, Barber D, Hanratty WP, Lee S, Roberts TM, D'Andrea AD, Dearolf CR 1997 Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates *Drosophila* and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol* 17:1562-1571
210. Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O 2003 Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Biol Cell* 14:1448-1459
211. Qiu H, Garcia-Barrio MT, Hinnebusch AG 1998 Dimerization by translation initiation factor 2 kinase GCN2 is mediated by interactions in the C-terminal ribosome-binding region and the protein kinase domain. *Mol Cell Biol* 18:2697-2711
212. Boudeau J, Scott JW, Resta N, Deak M, Kieloch A, Komander D, Hardie DG, Prescott AR, van Aalten DM, Alessi DR 2004 Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. *J Cell Sci* 117:6365-6375
213. Kolch W 2005 Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:827-837
214. Morrison DK 2001 KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci* 114:1609-1612
215. Kornev AP, Taylor SS 2009 Pseudokinases: functional insights gleaned from structure. *Structure* 17:5-7

216. Nicolas FE, de Haro JP, Torres-Martinez S, Ruiz-Vazquez RM 2007 Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genet Biol* 44:504-516
217. Roncero MI, Zabala C, Cerda-Olmedo E 1984 Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on *Phycomyces* spores. *Mutat Res* 125:195-204
218. Ocampo J, Fernandez Nunez L, Silva F, Pereyra E, Moreno S, Garre V, Rossi S 2009 A subunit of protein kinase a regulates growth and differentiation in the fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryot Cell* 8:933-944
219. Cameron S, Levin L, Zoller M, Wigler M 1988 cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *S. cerevisiae*. *Cell* 53:555-566
220. Nikawa J, Cameron S, Toda T, Ferguson KM, Wigler M 1987 Rigorous feedback control of cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 1:931-937
221. Zaremborg V, Moreno S 1996 Analysis of the mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinase through the study of mutants of the yeast regulatory subunit. *Eur J Biochem* 237:136-142
222. Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A 1983 Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153:163-168
223. Gilman A 1970 Presentation of the Academy Medal to Harry Eagle, M. D. *Bull N Y Acad Med* 46:666-669
224. Roskoski R, Jr. 1983 Assays of protein kinase. *Methods Enzymol* 99:3-6
225. Benito EP, Campuzano V, Lopez-Matas MA, De Vicente JI, Eslava AP 1995 Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of *Mucor circinelloides* OMPdecase-deficient mutants. *Mol Gen Genet* 248:126-135
226. Schipper MA 1976 Induced azygospore formation in *Mucor* (*Rhizomucor*) *pusillus* by *Absidia corymbifera*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 42:141-144
227. Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
228. Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
229. Kuret J, Johnson KE, Nicolette C, Zoller MJ 1988 Mutagenesis of the regulatory subunit of yeast cAMP-dependent protein kinase. Isolation of site-directed mutants with altered binding affinity for catalytic subunit. *J Biol Chem* 263:9149-9154
230. Moreno S, Passeron S 1980 Further studies on cyclic adenosine 3':5'-monophosphate protein kinase from dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *Arch Biochem Biophys* 199:321-330
231. Guthmann M, Pastori R, Moreno S 1990 Polyamines and basic proteins stimulate activation by cAMP and catalytic activity of *Mucor rouxii* cAMP-dependent protein kinase. *Cell Signal* 2:395-402
232. Rannels SR, Beasley A, Corbin JD 1983 Regulatory subunits of bovine heart and rabbit skeletal muscle cAMP-dependent protein kinase isozymes. *Methods Enzymol* 99:55-62
233. Rinaldi J, Ocampo J, Rossi S, Moreno S 2008 A novel activating effect of the regulatory subunit of protein kinase A on catalytic subunit activity. *Arch Biochem Biophys* 480:95-103

234. Cervantes-Chavez JA, Ruiz-Herrera J 2007 The regulatory subunit of protein kinase A promotes hyphal growth and plays an essential role in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 7:929-940
235. Sypherd P, and E. J. Linzt. 1897 Expression of three gene elongation factor I during morphogenesis of *Mucor racemosus*. *Mol Cell Biol* 7:1925–1932.
236. Garre VyC, LM Comunicación personal. In:
237. Silva F, Navarro E, Penaranda A, Murcia-Flores L, Torres-Martinez S, Garre V 2008 A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a white collar-1-like activator. *Mol Microbiol* 70:1026-1036
238. Ocampo J, Moreno S, Rossi S 2007 PKA from *Mucor circinelloides*: model to study the role of linker I in the interaction between R and C subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 362:721-726
239. Takano Y, Komeda K, Kojima K, Okuno T 2001 Proper regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase is required for growth, conidiation, and appressorium function in the anthracnose fungus *Colletotrichum lagenarium*. *Mol Plant Microbe Interact* 14:1149-1157
240. Núñez LF Comunicación personal.
241. Cornell MJ, Alam I, Soanes DM, Wong HM, Hedeler C, Paton NW, Rattray M, Hubbard SJ, Talbot NJ, Oliver SG 2007 Comparative genome analysis across a kingdom of eukaryotic organisms: specialization and diversification in the fungi. *Genome Res* 17:1809-1822
242. Ma L-J 2009 Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication *Fungal Genetics Reports*. In. 25th Fungal Genetics Conference ed
243. He X, Zhang J 2006 Higher duplicability of less important genes in yeast genomes. *Mol Biol Evol* 23:144-151
244. Kannan N, Wu J, Anand GS, Yooseph S, Neuwald AF, Venter JC, Taylor SS 2007 Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module. *Genome Biol* 8:R264
245. Scheeff ED, Bourne PE 2005 Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. *PLoS Comput Biol* 1:e49
246. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH 2000 WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem* 275:16795-16801
247. Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Furst DO, Wilmanns M, Gautel M 1998 Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 395:863-869
248. Katso RM, Russell RB, Ganesan TS 1999 Functional analysis of H-Ryk, an atypical member of the receptor tyrosine kinase family. *Mol Cell Biol* 19:6427-6440
249. Higgins JM 2001 Haspin-like proteins: a new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases. *Protein Sci* 10:1677-1684
250. Legate KR, Montanez E, Kudlacek O, Fassler R 2006 ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:20-31
251. Muller J, Ory S, Copeland T, Piwnica-Worms H, Morrison DK 2001 C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol Cell* 8:983-993

-
252. Kannan N, Haste N, Taylor SS, Neuwald AF 2007 The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a cis-acting regulatory module. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1272-1277
 253. Johnson LN, Noble ME, Owen DJ 1996 Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85:149-158
 254. Tang Y, McLeod M 2004 In vivo activation of protein kinase A in *Schizosaccharomyces pombe* requires threonine phosphorylation at its activation loop and is dependent on PDK1. *Genetics* 168:1843-1853
 255. Steichen JM, Iyer GH, Li S, Saldanha AS, Deal MS, Woods VL, Jr., Taylor SS 2009 Global consequences of activation loop phosphorylation of protein kinase A. *J Biol Chem*
 256. Ten Eyck LF, Taylor SS, Kornev AP 2008 Conserved spatial patterns across the protein kinase family. *Biochim Biophys Acta* 1784:238-243
 257. Masterson LR, Mascioni A, Traaseth NJ, Taylor SS, Veglia G 2008 Allosteric cooperativity in protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:506-511
 258. Galello F Comunicación Personal.
 259. Navarro E, Lorca-Pascual JM, Quiles-Rosillo MD, Nicolas FE, Garre V, Torres-Martinez S, Ruiz-Vazquez RM 2001 A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Mol Genet Genomics* 266:463-470
 260. Quiles-Rosillo MD, Ruiz-Vazquez RM, Torres-Martinez S, Garre V 2003 Cloning, characterization and heterologous expression of the *Blakeslea trispora* gene encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase. *FEMS Microbiol Lett* 222:229-236