



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Localización subcelular de la subunidad
regulatoria de la PKA de *C. albicans* mediante una
técnica de fusión genómica. Estudio de la
capacidad germinativa de una mutante carente de
un alelo de la subunidad regulatoria de la PKA**

Nº 176

Romina Giacometti

Tutoras: Susana Passeron - Susana Silberstein

Departamento de Investigación
Noviembre 2005

Instituto de Investigaciones Bioquímicas y Fisiológicas IByF-CONICET
Cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía, UBA.

A mi abuelo

Agradecimientos

A la Dra. Susana Passeron, a quien admiro profundamente, le agradezco por la confianza depositada en mí, por su apoyo durante todo el proyecto y por las gratas charlas compartidas.

También quiero agradecer a las Dras. Susy Silberstein y María Leonor Cantore por la ayuda brindada, la cual siempre resultó más que oportuna.

A Guada, por transformar nuestra relación de trabajo en cariño y amistad incondicional.

A Ale, por haberme cedido sus conocimientos, por su colaboración y camaradería.

A quienes me rodearon con su presencia en el transcurso de estos años, mis amigos del laboratorio y a quienes colaboran día a día con el mantenimiento del Instituto. GRACIAS a cada uno de ustedes.

A la Dra. Cristina Maggese por abrirme las puertas de su laboratorio para la realización de ciertos experimentos.

A las Dras. Fabiana LoNostro y Rocío Castilla quienes me brindaron gentilmente todos sus conocimientos de microscopía.

A la Dra. Cheryl Gale, de la Universidad de Minnesota (EE.UU.), por habernos facilitado el plásmido pGFP-URA3, utilizado en este trabajo.

A la gente del INGEBI y especialmente a Guille Lobo por sus consejos científicos y su amistad.

A Andre, Mary y Jesi, mis amigas del alma, por haber sido mi soporte en la carrera y en la vida. Todas para Una y Una para Todas!!!

A Ignacio, por alentarme con todo el amor del mundo a cumplir mis objetivos, nuestros objetivos.

Finalmente a Papá, Mamá, Gaby y la Abu, quienes me brindaron la seguridad y confianza suficiente como para que siempre fuera fiel a mis convicciones.

Mi querida Familia, este logro también es de ustedes.

Índice

Resumen	9
Introducción	9
1. <i>Candida albicans</i> , generalidades	9
2. Dimorfismo en <i>C. albicans</i>	11
3. Transducción de señales	12
3.1. Vía de las MAP quinasas	12
3.2. Vía del AMPc	12
4. Quinasas de proteínas	13
4.1. Quinasa de proteínas dependiente de AMPc	13
5. Transducción de señales y dimorfismo en <i>C. albicans</i>	14
5.1. Vía de señalización por MAP quinasas	14
5.2. Vía de señalización por AMPc-PKA	15
5.3. Vía de señalización por pH	16
6. Represión de la filamentación en <i>C. albicans</i>	16
7. Localización subcelular de la PKA en eucariotas superiores	17
8. Localización subcelular de la PKA en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
9. PKA de <i>C. albicans</i>	19
10. Mutantes de <i>C. albicans</i>	19
11. Objetivos de este trabajo	20
Materiales y Métodos	20
1. Organismos y condiciones de cultivo	20
1.1. <i>C. albicans</i>	20
1.1.1. Cepas	20
1.1.2. Cultivos	21
1.2. <i>Escherichia coli</i>	21
1.2.1. Cepas	21
1.2.2. Cultivos	21
2. Condiciones de formación de tubos germinativos	21
3. Manipulación del plásmido GFP-URA3	22
3.1. Características del plásmido GFP-URA3	22
3.2. Preparación de bacterias electrocompetentes	22
3.3. Transformación de bacterias electrocompetentes	22
3.4. Mini preparación de ADN plasmídico	22
4. Fusión de GFP a BCY1 en <i>C. albicans</i>	22
5. Transformación de levaduras	23
6. Verificación de la correcta integración del módulo en el genoma	23
6.1. Purificación de ADN genómico	23
6.2. PCR de célula entera	23
7. Preparación de extractos celulares	23
8. Determinación de proteínas	24
9. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	24
10. Técnicas inmunológicas	24
10.1. Western blot	24
10.2. Inmunoprecipitación	24
11. Detección de ARNm	24
11.1. Extracción de ARN total	24
11.2. Electroforesis de ARN	25
11.3. Preparación y marcación de sondas radioactivas	25
11.4. Ensayos de Northern blot	25
12. Ensayos enzimáticos	25
12.1. Medición de la actividad de PKA	25
12.2. Ensayo de autofosforilación	25
13. Microscopía de fluorescencia	26

14. Materiales	26
Resultados	
1. Expresión y localización subcelular de la proteína de fusión Bcy1-GFP en <i>C. albicans</i>	26
1.1. Construcción de la fusión <i>BCY1</i> -GFP a nivel genómico	26
1.2. Amplificación del módulo de transformación	27
1.3. Selección de las cepas que integraron el módulo correctamente y verificación de las mismas por PCR	28
2. Análisis de la expresión de la proteína de fusión Bcy1-GFP	29
2.1. Estudio de la expresión de R	31
2.2. Inmunoprecipitación de la proteína Bcy1-GFP en las cepas transformadas	31
3. Análisis de la dependencia de AMPc de la actividad de PKA en extractos crudos	32
3.1. Ensayo de fosforilación intramolecular de la subunidad R	33
4. Estudio de la localización subcelular de la proteína de fusión Bcy1-GFP	34
5. Capacidad germinativa de la cepa mutante <i>tpk2 BCY1/bcy1</i>	35
Referencias	38

Resumen

Uno de los objetivos de esta tesis de licenciatura fue investigar la localización subcelular de la subunidad reguladora (R) de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). En *C. albicans*, la subunidad R está codificada por un único gen *BCY1*, mientras que la subunidad catalítica (C) está codificada por dos genes, *TPK1* y *TPK2*.

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que en células carentes de subunidad R la proteína Tpk1 está distribuida en toda la célula, mientras que en células que expresan niveles normales de la subunidad R la proteína se localiza predominantemente en el núcleo. Estos resultados sugieren, que al menos para la isoforma Tpk1p, su localización es dependiente de la localización de Bcy1p (Cassola y col., 2004), infiriendo de este dato que uno de los posibles roles de R es localizar a C dentro del núcleo.

Con el objeto de evaluar la localización de la subunidad R en *C. albicans* se construyeron fusiones genómicas en las cuales se insertó el gen de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) río abajo del gen *BCY1*, de manera que se expresara la proteína de fusión Bcy1-GFP. Estas construcciones se llevaron a cabo en las cepas mutantes que carecen de: la isoforma Tpk1p, o de la isoforma Tpk2p, o de la isoforma Tpk2p y de un alelo de *BCY1*. Las nuevas mutantes generadas fueron denominadas respectivamente RG09, RG05 y RG01.

La observación por microscopía de fluorescencia de células en fase estacionaria mostró que en todas las cepas que portan la fusión, la proteína Bcy1-GFP está distribuida tanto en el núcleo como en el citoplasma.

Por otra parte, se midieron los niveles de proteína R en la cepa *tpk2* (portadora de los dos alelos salvajes de *BCY1*), en la cepa *tpk2 BCY1/bcy1* (un único alelo) y en la nueva cepa RG01 (un único alelo de R fusionado a *GFP*). Los resultados indicaron que la cantidad de proteína detectada se correlaciona con el número de alelos presentes en la célula. En cuanto a la cepa RG01, los niveles de expresión de R resultaron menores que los de la cepa *tpk2 BCY1/bcy1*, sugiriendo que la fusión dificulta la expresión y/o estimula la degradación de esta subunidad R modificada.

Al estudiar la actividad de fosfotransferasa en la cepa heterocigota para la delección de *BCY1*, *tpk2 BCY1/bcy1*, y en la cepa que presenta la fusión, RG01, se encontró que la ausencia de uno de los alelos que codifican para la subunidad R se traduce en una ligera disminución de la actividad catalítica y en una pérdida casi total de la dependencia de AMPc.

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que las dos isoformas de la subunidad C, Tpk1p y Tpk2p, tienen un efecto positivo en la inducción del crecimiento filamentoso en *C. albicans*; sin embargo en un trabajo reciente, también del laboratorio, se encontró que la cepa *tpk2 bcy1* (carente de los dos alelos de *BCY1*), a pesar de poseer actividad catalítica (Tpk1p) constitutivamente activa, resultó ser agerminativa.

En base a estos resultados nos propusimos analizar el comportamiento germinativo de la cepa mutante que posee un solo alelo de R (*tpk2 BCY1/bcy1*) y de la cepa derivada de ella en la cual el único alelo *BCY1* está fusionado a *GFP* (cepa RG01). Los resultados obtenidos mostraron que si bien la presencia de al menos uno de los alelos que codifican para la subunidad R es necesaria para que la célula levaduriforme germine en presencia de un inductor, la mutante *tpk2 BCY1/bcy1* presenta una morfología levaduriforme anormal, compuesta por células grandes que han perdido la forma ovoide característica. En cuanto a la aparición de hifas verdaderas, este evento es minoritario en comparación a la gran proporción de pseudohifas y a la formación de hifas que apicalmente generan un engrosamiento y por ende una forma aberrante. Estos resultados junto a aquellos que muestran una baja dependencia de AMPc de la actividad de PKA de las cepas portadoras de un solo alelo de *BCY1*, sugieren que la presencia de una PKA regulada (mediante la expresión de ambos alelos que codifican para R) es necesaria para que el fenotipo germinativo sea normal. Las características mencionadas anteriormente son compartidas por la cepa RG01, la cual no presenta otras alteraciones significativas, indicando que ni la fusión ni los menores niveles de R detectados en esta cepa interfieren con la transición dimórfica.

1. *Candida albicans*, generalidades

Candida albicans es un hongo patógeno oportunista de vertebrados homeotermos, causante de una de las micosis más comunes y con mayor incidencia mundial entre los seres humanos: la candidiasis. El creciente interés médico por *C. albicans* como un agente causante de esta infección, trajo como consecuencia un mayor interés en estudios básicos sobre la genética y virulencia de este patógeno. *C. albicans* es un hongo diploide perteneciente a la familia Ascomycota, clase Saccharomycetes, orden Saccharomycetales, subclase Saccharomycetales anamórficos, género *Candida*. Se reproduce asexualmente por gemación con producción de blastosporas. Dado que no se le conoce ciclo sexual es considerada una levadura imperfecta.

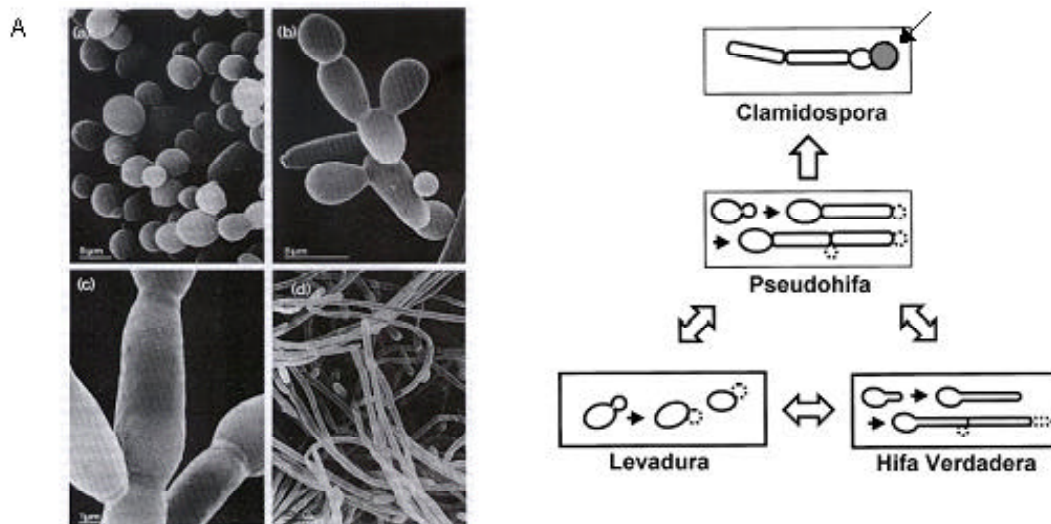


Figura 1 A. Morfologías de *C. albicans*. (a) *blastosporas*, células ovoides; (b) *pseudohifas*, las constricciones de la pared celular muestran claramente que estas células son cadenas de blastosporas y no hifas verdaderas; (c) se observan *pseudohifas* con mayor aumento; (d) *micelio* o hifa verdadera, las constricciones en los septos son mínimas o no se observan (tomado de Odds, 1988).

Figura 1 B. Representación esquemática de las diferentes formas de *C. albicans* y su interacción. Las líneas de puntos indican a las células hijas y las regiones de expansión celular. La flecha en el primer cuadro marca la posición de la clamidospora (tomado de Ernst, 2000).

C. albicans es un organismo polimórfico capaz de desarrollarse como células esféricas simples: blastosporas o clamidosporas, o como células alargadas que pueden ser hifas multicelulares verdaderas o pseudohifas. Bajo ciertas condiciones ambientales las células sufren cambios morfogenéticos tendiendo a adoptar alguna de las siguientes formas de crecimiento filamentoso: hifas verdaderas, formadas por células muy alargadas y cilíndricas que crecen por extensión apical continua separadas por paredes septadas perpendiculares, o pseudohifas que constituyen un estadio intermedio entre la levadura y el micelio, en el cual las células que forman los filamentos son alargadas pero aún elipsoidales (Odds, 1988). La pseudohifa, a diferencia de la hifa verdadera, crece por brotación unipolar: el brote se desarrolla como célula alargada permaneciendo unido a la célula madre, detiene su crecimiento y reanuda la brotación, dejando una constricción entre una célula y otra. Las clamidosporas son células esféricas de pared engrosada que se desarrollan a partir de pseudohifas (Joshi y col, 1993). En la Figuras 1 A y B se pueden observar las distintas morfologías de *C. albicans* y la relación entre ellas.

C. albicans se encuentra como comensal habitual de los tractos respiratorios, gastrointestinal, genito-urinario y menos frecuentemente de la piel. La mayoría de las personas son portadoras sanas pero cuando el portador presenta una depresión de su sistema inmunológico, *C. albicans* se transforma en infeccioso provocando la candidiasis.

La enfermedad causada por este hongo puede presentarse con distintos grados de severidad, existiendo tres tipos básicos de infecciones: superficiales, localmente invasivas y sistémicas. Como consecuencia de ello aparecen infecciones cutáneas, candidiasis oral, aftas, candidiasis vulvovaginal, etc., en general acompañando a otras enfermedades y/o desórdenes fisiológicos tales como obesidad, trastornos endócrinos. La candidiasis también suele aparecer en pacientes sujetos a tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro o sometidos a terapias esteroideas. A diferencia de las infecciones superficiales o localmente invasivas, la infección sistémica aparece en pacientes inmunodeprimidos y puede poner en riesgo su vida. En los últimos 20 años el aumento de casos de pacientes inmunodeprimidos ya sea por tratamientos de quimioterapia, por padecer del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o por haber sido transplantados, se ve reflejado en una mayor incidencia de la candidiasis sistémica. Esta enfermedad es la causa de muerte de aproximadamente la tercera parte de los enfermos de SIDA, de un tercio de los pacientes leucémicos terminales y de un tercio de los pacientes que recibieron trasplante de médula ósea. Por medio de la proteómica se han descrito recientemente una serie de proteínas, las cuales podrían ser útiles para el desarrollo de una futura vacuna (Fernandez-Arenas, 2004).

En la mayoría de las lesiones establecidas como candidiasis, el hongo puede encontrarse en la forma levaduriforme o miceliana, de forma tal que la descripción cualitativa de la morfología de *C. albicans* en un tejido no prueba ni descarta la relación entre la morfología y la patogenia (Odds, 1988). La relación entre los cambios morfogenéticos y la virulencia en *C. albicans* ha sido objeto de intensos estudios. El uso de

mutantes del hongo permitió establecer una correlación entre defectos en el crecimiento filamentosos y deficiencias en su virulencia. Se ha postulado que la habilidad de cambiar su morfología está directamente relacionada con su virulencia, ya que mutantes defectivas en el crecimiento filamentosos son menos virulentas que sus contrapartes salvajes en modelos de ratones (Leberer y col., 1997; Lo y col., 1997; Gale y col., 1998). Sin embargo, las mutaciones que afectan la formación de hifas pueden modificar otras características celulares como la tasa de crecimiento, adherencia y expresión de factores de virulencia- que también juegan un rol importante en el crecimiento del patógeno *in vivo* (Kobayashi y Cutler, 1998). Estas modificaciones podrían contribuir al fenotipo de algunas cepas mutantes, deficientes en la formación de hifas, que son menos virulentas que sus controles en modelos de infección *in vivo*, sugiriendo que la pérdida de virulencia no puede ser atribuida simplemente a la incapacidad de formar filamentos (Riggle y col., 1999). Se postula que la forma miceliana podría estar involucrada en los estadios tempranos de invasión, facilitando la penetración en los tejidos (Anderson y Odds, 1985), adhiriéndose al epitelio (Kimura y Pearshall, 1978), y evitando la fagocitosis (Smith, 1985), mientras que la forma levaduriforme se diseminaría más fácilmente dentro del hospedador. Así ambas formas de crecimiento jugarían roles importantes en la patogénesis.

2. Dimorfismo en *C. albicans*

El dimorfismo levadura-micelio exhibido por una gran variedad de especies fúngicas puede definirse como el proceso reversible por el cual el hábito de crecimiento levaduriforme o unicelular se transforma por alguna alteración en las condiciones ambientales o de cultivo, en un hábito de crecimiento filamentosos o hifal (Stewart y Rogers, 1978). Este tipo de diferenciación no constituye un proceso esencial en el ciclo celular, sino que es una respuesta a un cambio en el hábitat en el cual se desarrolla el hongo.

Es de destacar que la mayoría de las especies fúngicas de importancia clínica son dimórficas; por lo tanto la dilucidación de los mecanismos que regulan las transiciones dimórficas es de gran importancia para el control de un grupo de micosis cada vez más relevante que afecta tanto al hombre como a los animales. En este sentido, *C. albicans* provee un modelo relativamente simple y fácil de manejar para el estudio de las bases moleculares de la morfogénesis y de la posible relación entre patogenicidad y morfología.

Numerosos factores ambientales promueven la transición a la forma miceliana en *C. albicans*: temperatura, disponibilidad de oxígeno y cantidad de inóculo, pH y composición del medio de cultivo, entre otros.

In vitro, la transición levadura-micelio puede ser inducida por incubación de los cultivos a 37°C en presencia de ciertos compuestos tales como algunos L-aminoácidos (Land y col., 1975), N-acetil glucosamina (NAcGlc) (Simonetti y col., 1974) o suero. El pH del medio de incubación también puede actuar como inductor de la germinación: un pH cercano a 6,5 favorece el desarrollo filamentosos mientras un pH por debajo de 6 estimula el crecimiento levaduriforme (Evans y col., 1975; Pollack y Hashimoto, 1987). Aunque no se han dilucidado aún en forma completa los mecanismos moleculares involucrados en la transducción de las señales extracelulares gatilladas por estos factores, muchos de los elementos de las vías de señalización se conocen y los estudios actuales están orientados a profundizar en éstos basándose en los senderos ya conocidos en otros sistemas.

El avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el dimorfismo de *C. albicans* ha sido lento en relación al de otras levaduras por la dificultad intrínseca que trae aparejada su diploidía, la ausencia de ciclo sexual y la utilización inusual de algunos codones (Santos y col., 1996), lo cual dificulta la manipulación genética impidiendo la identificación de factores que contribuyen a la transición dimórfica y al aislamiento e identificación de las mutaciones que afectan su patogenicidad.

Estas dificultades en la manipulación de *C. albicans* han sido subsanadas en parte debido a la gran conservación evolutiva de las vías de señalización entre los hongos. Muchos de los genes involucrados en las rutas de señalización en *C. albicans* conocidos hasta hoy han sido identificados funcionalmente usando complementaciones genéticas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Estas complementaciones explotan la habilidad que presentan los genes que codifican para proteínas de señalización de *C. albicans* de suprimir defectos en los correspondientes genes de *S. cerevisiae* (Liu y col., 1994; Clark y col., 1995), o bien de interferir (Whiteway y col., 1992) o activar constitutivamente (Leberer y col., 1996) las correspondientes vías de señalización en esta levadura. Más recientemente, la secuenciación del genoma de *C. albicans* (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>) ha facilitado el aislamiento directo de genes involucrados en la transducción de señales sobre la base de similitud de secuencia con otros previamente identificados en *S. cerevisiae*. Sin embargo, el análisis funcional de esos genes aún permanece ligado a *S. cerevisiae* dado que en esta levadura están mejor caracterizadas las correspondientes vías de señalización.

Como se describió anteriormente, el desarrollo filamentosos en *C. albicans* es inducido por una variedad de factores ambientales. Actualmente están parcialmente caracterizados varios senderos de transducción de señales asociados a los cambios externos.

Se ha encontrado también relación entre ciertas hormonas y algunos factores tróficos de mamíferos y la transición dimórfica de este hongo. Así, se ha informado un efecto estimulador sobre la transición dimórfica, (esteroides y gonadotropina coriónica humana (hCG) (Caticha y col. 1992), prostaglandina E2 y β -endorfina (Kalo-Klein y Witkin, 1990)). En nuestro laboratorio se ha demostrado por fluorescencia indirecta que las células levaduriformes son capaces de unir glucagón, sugiriendo la presencia de receptores para esta hormona en la membrana del hongo (Zelada y col. 1996). También se demostró que *C. albicans* posee una adenilato ciclasa dependiente de Mg^{2+} y activable por glucagón y nucleótidos guanina (Paveto y col. 1991). Además se corroboró la existencia de proteínas G triméricas en membrana del hongo (Paveto y col. 1992).

Tomados en su conjunto estos resultados sugieren que *C. albicans* es capaz de sentir cambios hormonales del hospedador, los cuales son transmitidos al interior de la célula a través de la vía de señalización del AMPc, desencadenando en ciertas circunstancias, la transición dimórfica.

3. Transducción de señales

La célula eucariota es una entidad altamente regulada capaz de responder a estímulos generados en su entorno que desencadenan procesos tan diversos como la diferenciación celular, proliferación y morfogénesis. Estos eventos de estímulo-respuesta ocurren a través de una secuencia de reacciones químicas que involucran enzimas específicas, proteínas regulatorias y otros factores. El primer paso en estas vías metabólicas es la transformación del estímulo externo en una señal intracelular por interacción directa de este estímulo con receptores específicos situados en la membrana plasmática. Luego el mensaje intracelular se traduce en modificaciones de las proteínas involucradas en la respuesta biológica.

3.1. Vía de las MAP quinasas

Dentro de los mecanismos moleculares que controlan diversas vías de transducción de señales en eucariotas tiene un rol preponderante la superfamilia de GTPasas monoméricas Ras, involucradas en el control del crecimiento celular y la diferenciación. Las proteínas Ras oscilan en la célula entre una forma inactiva unida a GDP y en una forma activa unida a GTP. La conversión de la forma activa a la forma inactiva es mediada por una actividad GTPasa intrínseca. Las mutaciones que anulan esta actividad llevan a la activación constitutiva de las proteínas Ras induciendo la transformación celular. En células de mamíferos la forma activa de las proteínas Ras es capaz de estimular la cascada de MAP quinasas (Mitogen Activated Protein Kinases). En *S. cerevisiae* existen 2 proteínas funcionalmente homólogas, Ras1p y Ras2p (Kataoka y col., 1985; Toda y col. 1985). Las células de *S. cerevisiae* carentes de ambas formas de Ras no son viables, hecho que se ha atribuido al rol de Ras en la estimulación de la vía del AMPc, esencial para la progresión de las células a través de la fase G1 del ciclo celular (Toda y col., 1985). Ras2p tiene en común con las proteínas Ras de mamíferos la capacidad de activar la cascada de MAP quinasas. Esta cascada se requiere en la transición morfológica levadura-pseudohifa (Gimeno y col., 1992; Mösch y col., 1996).

3.2. Vía del AMPc

Algunos estímulos externos operan intracelularmente a través de moléculas conocidas como segundos mensajeros. Los segundos mensajeros son reconocidos por proteínas blanco las cuales a su vez modulan a otras proteínas de importancia regulatoria. El AMPc es uno de estos segundos mensajeros y está involucrado en la transducción de una gran cantidad de señales extracelulares en organismos eucariotas.

El sendero del AMPc comprende fundamentalmente un receptor de la señal extracelular, una proteína transductora (proteína G) y la enzima (adenilato ciclasa), la cual una vez activada por la proteína G es responsable de la síntesis de AMPc. Las proteínas G triméricas en su forma inactiva están formados por la subunidad α unida a GDP, y un complejo formado por las subunidades β y γ asociadas. El proceso de activación del sendero se produce por unión de un ligando agonista a su receptor, que promueve el intercambio del GDP unido a α por GTP. La unión de GTP produce cambios conformacionales en la subunidad α que provocan su disociación del dímero $\beta\gamma$ y consecuentemente su activación. Este estado se mantiene hasta que el GTP es hidrolizado a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de α ; α -GDP se puede reasociar con las subunidades $\beta\gamma$ volviendo así al estado basal inactivo (Gilman, 1987; Taussig y Gilman, 1995). La subunidad α activada (α -GTP) estimula a la adenilato ciclasa y como consecuencia aumenta el nivel intracelular de AMPc. La actividad de la adenilato ciclasa puede ser inhibida a través de un mecanismo en que intervienen proteínas inhibitorias (G_i) pertenecientes también a la subfamilia de las proteínas G triméricas.

El AMPc puede cumplir diversas funciones dentro de la célula, ya sea modulando el sendero de MAP quinasas a través de su unión a Epac (Exchange protein activated by cAMP), uniéndose y regulando la función de una familia de canales iónicos, o mediando la activación de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc (PKA). La activación de la PKA resulta en la fosforilación de numerosas proteínas tanto estructu-

rales como regulatorias que participan en diferentes caminos metabólicos (Fimia y Sassone-Corsi, 2001).

En el cierre de este proceso de transducción de señales existen varios mecanismos conocidos, uno es la hidrólisis o recaptación de la hormona, otro es el bloqueo de la recepción de la señal a nivel del receptor ya sea por destrucción o por internalización del mismo haciéndose inaccesible al agonista, o bien la hidrólisis del segundo mensajero llevada a cabo por la fosfodiesterasa de AMPc. Por otro lado, las fosfatasa de proteínas encargadas de remover el grupo fosfato de las proteínas fosforiladas vuelven a las proteína a su estado basal. Este sistema de regulación provee a la célula de un mecanismo de control eficiente, flexible y sensible dándole la posibilidad de responder a señales del medio a través de la modificación de sus funciones metabólicas.

El mecanismo de señalización AMPc/PKA opera tanto en organismos eucariotas superiores como en inferiores. En *S. cerevisiae* se ha demostrado la existencia de los componentes de este sendero y se ha establecido la ubicación relativa de los mismos dentro del camino de transducción de señales. Los resultados obtenidos en *S. cerevisiae* han servido de base para el estudio del sendero del AMPc/PKA en otros hongos, entre ellos *C. albicans* como se verá más adelante (Item 5).

4. Quinasas de proteínas

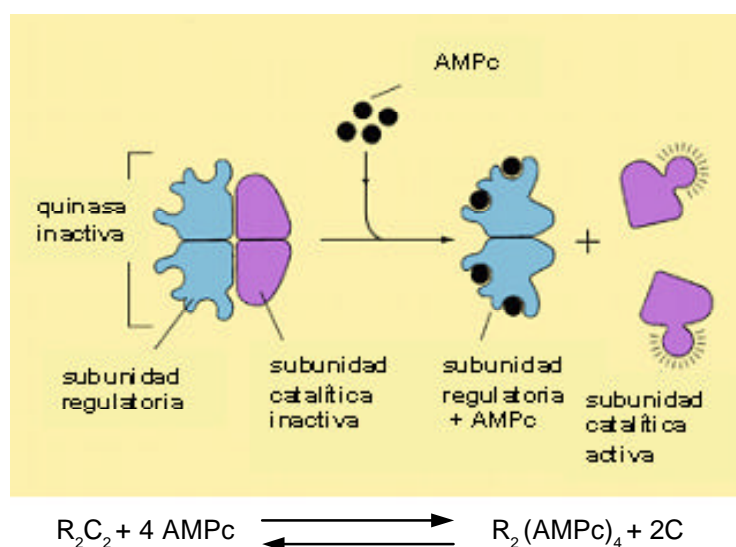
Es bien conocido el importante rol de la fosforilación proteica como modulador de la actividad de proteínas y el papel crucial de las quinasas de proteínas como mediadoras intracelulares de las señales externas. Las quinasas de proteínas conforman una familia diversa que comprende receptores de factores de crecimiento, proteínas quinasas que controlan el ciclo celular y otras que modulan infinidad de reacciones metabólicas.

Las quinasas de proteínas pueden ser clasificadas en dos grandes grupos según el aminoácido que fosforilan: aquellas que transfieren el grupo fosfato del ATP a los aminoácidos serina o treonina (Ser/Thr quinasas), entre las cuales se encuentra a la PKA, y aquellas que lo transfieren al aminoácido tirosina (Tyr quinasas). Existe un tercer grupo, las histidinas-aspártico quinasas, las cuales se autofosforilan en residuos de histidina y le transfieren este fosfato a un residuo de aspártico.

4.1. Quinasa de proteínas dependiente de AMPc

En casi todos los sistemas estudiados la PKA existe en la célula en forma de una holoenzima tetramérica inactiva formada por un dímero de la subunidad reguladora (R) y dos subunidades catalíticas (C). La subunidad R posee dos sitios de alta afinidad para la unión de AMPc. La unión de las dos moléculas del nucleótido es cooperativa y disminuye la afinidad de R por C produciendo la disociación de la holoenzima en un dímero de la subunidad reguladora que mantiene el ligando unido y dos subunidades catalíticas monoméricas activas. Se muestra a continuación un esquema de la holoenzima y de su disociación post-activación.

Figura 2. Activación de la proteína kinasa dependiente de AMPc.



Inicialmente se identificaron dos isoenzimas de PKA, isoformas I y II, aisladas a partir de músculo esquelético y cardíaco (Beavo y col., 1974 y Rubin y col., 1974). Estas se separan en columnas de DEAE celulosa, diferencia que se debe a la asociación de la subunidad C con dos tipos de subunidad R llamadas RI y RII. Posteriormente las modernas técnicas de clonado revelaron gran heterogeneidad en las subunida-

des R y C mostrando la existencia de multiplicidad de isoenzimas de la PKA. Así, se han identificado dos formas de la subunidad RI (RIá y RIâ) y dos de la subunidad RII (RIIá y RIIâ), todas ellas productos de diferentes genes. También se han descrito variantes de RIá provenientes de splicing alternativo. Respecto de la subunidad C se han identificado tres isoformas (Cá, Câ y Cã) y variantes de splicing alternativo de Cá y Câ. Las subunidades RI y RII contienen un dominio de dimerización en su extremo N terminal, una región responsable de su interacción con C (región bisagra) y finalmente en el extremo C terminal dos sitios de unión a AMPc (sitios A y B), probablemente como resultado de duplicación génica. La región bisagra de RI interactúa con el sitio catalítico de C en la holoenzima y en el caso de RII resulta fosforilada por C en una reacción intramolecular. En la holoenzima tetramérica solo está expuesto el sitio B de unión a AMPc; la unión del nucleótido cíclico a este sitio promueve en forma cooperativa la unión al sitio A como resultado de un cambio conformacional de la molécula (para una revisión ver Skalhegg y Tasken, 2000)

Para la mayoría de las PKAs caracterizadas, la masa molecular para la subunidad C es de alrededor de 40 kDa, la de RI 49 kDa y la de RII 55 kDa; la masa molecular estimada para las holoenzimas I y II es de aproximadamente 180-200 kDa que corresponde a los respectivos tetrámeros RI_2C_2 y RII_2C_2 .

La PKA transfiere el grupo fosfato γ del ATP a residuos serina o treonina de diferentes sustratos proteicos. Las secuencias consenso reconocidas por la PKA son R-R-x-S/T y R-x-S/T, se caracterizan por la presencia de uno o dos residuos básicos, separados por un aminoácido cualquiera respecto del aminoácido aceptor. Para la medición de la actividad fosfotransferasa de las quinasas de proteínas se utilizan péptidos que contienen la secuencia canónica respectiva; en el caso de la PKA se utiliza el péptido, heptapéptido sintético, que contiene el sitio de fosforilación de la piruvato quinasa de hígado porcino, LRRASLG, (Kemp y col., 1977). El reemplazo de un aminoácido fosforilable por otro aminoácido no fosforilable, como alanina, a menudo resulta en pseudosustratos que se unen a la enzima pero no pueden ser fosforilados, y en consecuencia actúan como inhibidores competitivos.

5. Transducción de señales y dimorfismo en *C. albicans*

En *C. albicans* se han identificado vías de señalización relacionadas con las ya conocidas en *S. cerevisiae*. Como se comentó anteriormente, los genes que codifican para los distintos componentes de estas vías fueron identificados por homología con su contraparte en *S. cerevisiae*, o por su habilidad de complementar defectos asociados en mutantes de esta levadura.

Las vías de transducción de señales relacionadas con el dimorfismo en *C. albicans* son complejas y parecen no ser completamente independientes una de la otra. A nivel de proteínas transductoras, en *C. albicans* se ha identificado una proteína homóloga a Ras1p, CaRas1p. Ras1p no es esencial para la supervivencia de las células de *C. albicans*, pero su eliminación provoca un marcado defecto en la formación de hifas verdaderas en respuesta a suero y otras condiciones (Feng y col., 1999). Más recientemente se ha demostrado que Ras1p es parte tanto del sendero de MAP quinasas como del AMPc/PKA (Leberer y col., 2001).

Otras proteínas transductoras de *S. cerevisiae* implicadas en el crecimiento pseudohifal han encontrado su homólogo en *C. albicans*. Este es el caso de CaCdc42p que pertenece también a la superfamilia Ras. La función de Cdc42p en *C. albicans* parece ser importante en el crecimiento polarizado tanto de las células levaduriformes como de la forma filamentosas (Ushinsky y col., 2002). Teniendo en cuenta la homología funcional con Cdc42p de *S. cerevisiae* se ha propuesto la ubicación de CaCdc42p en un paso previo a la cascada de las MAP quinasas (Sanchez-Martinez y Perez-Martin, 2002) (ver Figura 3).

Recientemente se ha encontrado en *C. albicans* el gen *GPA2* que codifica para un homólogo de la subunidad α de una proteína G (Sanchez-Martinez y Perez-Martin, 2002). Células de *C. albicans* nulas para el gen *GPA2* muestran defectos en la transición morfológica en respuesta a diversas condiciones, pero no en respuesta a suero. Estos defectos no son revertidos por la adición exógena de AMPc. Se ha encontrado evidencia de que el producto del gen *GPA2* es requerido para la regulación de la vía de señalización de MAP quinasas (Sanchez-Martinez y Perez-Martin, 2002) (ver Figura 3).

5.1. Vía de señalización por MAP quinasas

En *C. albicans* se han identificado homólogos de prácticamente todos los componentes que integran el sendero de MAP quinasas en *S. cerevisiae*. Así, el factor de transcripción Cph1p, último elemento de la cascada, es homólogo al factor de transcripción Ste12p (Liu y col., 1994). Ste12p regula el apareamiento y el crecimiento pseudohifal en *S. cerevisiae* (Madhani y col., 1997). De la misma forma que Ste12p en *S. cerevisiae*, Cph1p es regulado por una cascada de quinasas (Figura 3). Esta cascada consiste en las quinasas Cst20p (homólogo a Ste20p), Hst7p (homólogo a Ste7p) y Cek1p (homólogo a Fus3p y Kss1p) (Lengeler y col., 2000). Todas las mutantes de *C. albicans* que carecen de estos genes (*CST20*, *HST7* y *CEK1*) son defectivas en el desarrollo filamentosas en medio sólido en respuesta a diferentes condiciones de

inducción. Sin embargo, la eliminación de estos genes no afecta la producción de hifas inducida por suero (Liu y col., 1994; Kohler y Fink, 1996; Leberer y col., 1996). Un componente homólogo a Ste11p de *S. cerevisiae* ha sido identificado en el secuenciamiento del genoma de *C. albicans*, pero esta putativa MAP quinasa aún no ha sido ubicada formalmente en la cascada de señalización (Sanchez-Martinez y Perez-Martin, 2002).

La cepa de *C. albicans* mutante en el factor de transcripción Cph1p es defectiva en la filamentación y en la inducción de genes asociados con la elongación celular en ciertos medios líquidos pero no en respuesta a suero (Liu, 2001). En *C. albicans* el gen *CPP1* codifica para una fosfoproteínfosfatasa de tirosina (Whiteway y col., 1993), similar a la MAP quinasa fosfatasa Msg5p de *S. cerevisiae* (Doi y col., 1994). La eliminación de *CPP1* en *C. albicans* desreprime la transición levadura-micelio, sugiriendo que Cpp1p tiene una función inhibitoria de dicha transición. Se cree que Cpp1p regula el estado de fosforilación de Cek1p (Csank y col., 1997) (Figura 3). Sin embargo, esta cepa mutante, constitutivamente filamentosa, no presenta una mayor virulencia que la de su contraparte salvaje. Estos resultados refuerzan la idea de que no hay una correlación biunívoca entre crecimiento filamentoso y virulencia.

5.2. Vía de señalización por AMPc-PKA

El rol del AMPc en el desarrollo y morfogénesis de los hongos ha sido intensamente estudiado. Existen numerosas evidencias de la intervención del AMPc en la diferenciación de distintos hongos (Kronstad y col., 1998; Madhani y Fink, 1998).

En *C. albicans* Niimi y col. (1980), Sabie y Gadd (1992) y Niimi (1996) encontraron que la germinación está relacionada con altos niveles intracelulares de AMPc. También observaron que se incrementa la formación de tubos germinativos por aumento de la concentración intracelular del nucleótido cíclico provocada por la inhibición de su diesterasa específica o por el agregado de dbAMPc al medio de cultivo.

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron una caída de los niveles de AMPc en un estadio temprano de la morfogénesis seguido de un aumento gradual a lo largo del proceso de formación de micelio (Egidy y col., 1990). Posteriormente se demostró que el agregado al medio de cultivo de compuestos que llevan a un aumento de los niveles de AMPc, vg. teofilina (inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc), dbAMPc (análogo permeable del AMPc) o glucagon producen una marcada estimulación en la formación de tubos germinativos cuando las células son inducidas con NAcGlc o con suero (Zelada y col., 1996). Así también, mostramos que *in vivo* dos inhibidores permeables de la PKA, myrPKI y H-89, bloquean el crecimiento filamentoso inducido por NAcGlc, pero no por suero (Castilla y col., 1998). En conjunto, estos resultados indican que el sendero del AMPc/PKA cumple un rol central en la morfogénesis de *C. albicans*, así como de la existencia de una vía alternativa, probablemente independiente de PKA en la inducción por suero.

En años recientes se han identificado en *C. albicans* genes homólogos a los involucrados en la vía de señalización por AMPc descrita en *S. cerevisiae*. Esta vía es muy similar a la encontrada en *S. cerevisiae* en cuanto a localización y función (actividad) de los componentes homólogos. Recientemente se ha aislado y caracterizado funcionalmente el gen *CaCDC35* que codifica un homólogo de la adenilil ciclase en *C. albicans*. La ciclase no es esencial para el crecimiento de *C. albicans*, pero es necesaria para el desarrollo filamentoso. Mediante experimentos de epistasis se ha propuesto que CaCdc35p actúa río abajo de Ras1p (Rocha y col., 2001) (Figura 3). Aún no se ha establecido si el producto del gen *GPA2* puede estar implicado en la activación directa de CaCdc35p en respuesta a señales externas.

En *C. albicans*, existen sólo dos genes, *TPK1* y *TPK2* (Sonneborn y col., 2000) que codifican para las subunidad catalítica de la PKA y un único gen, *BCY1* (Cassola y col., 2004) que codifica para la subunidad reguladora. A diferencia de *S. cerevisiae*, en donde sólo una de las tres isoformas de la subunidad catalítica (Tpk2p) es un activador y las otras dos (Tpk1p y Tpk3p) son inhibitoras del crecimiento pseudohifal (Robertson y Fink, 1998), ambas isoformas de la PKA de *C. albicans* son reguladores positivos de la morfogénesis (Bockmhül y col., 2001; Cloutier y col., 2003) (Figura 3). Si bien Tpk1p y Tpk2p tienen roles redundantes en la inducción de la germinación, el uso de mutantes que carecen de uno u otro gen ha permitido establecer diferencias en cuanto a la importancia relativa de la intervención de una u otra isoforma en la formación de hifas en distintos medios. Así, Tpk1p parece intervenir especialmente en la formación de hifas en medios inductores sólidos, mientras que Tpk2p lo haría en la inducción de hifas en medio líquido (Bockmhül y col., 2001).

El factor de transcripción Efg1p es el último componente de la cascada que lleva a la regulación de genes relacionados con la morfogénesis dependiente de AMPc. Este factor de transcripción es una proteína básica del tipo hélice-giro-hélice equivalente a Sok2p y Phd1p de *S. cerevisiae*. La cepa mutante *efg1/efg1* no forma hifas verdaderas en la mayoría de las condiciones inductoras de la germinación, incluyendo suero, aunque sí presenta formación de pseudohifas en esta última condición (Lo y col., 1997). Esta cepa también es defectiva en la inducción de genes relacionados con el crecimiento filamentoso. Sin embargo, en ambien-

tes especiales estas mutantes son capaces de desarrollar hifas verdaderas, sugiriendo que Efg1p es parte de una vía de señalización, pero no de la maquinaria celular involucrada en la formación de las hifas (Brown y Gow, 1999; Riggle y col., 1999; Sonneborn y col., 1999; Ernst, 2000). Hasta el momento sólo la cepa doble mutante *cph1/cph1 efg1/efg1* es incapaz de producir hifas y/o pseudohifas en presencia de suero. Este resultado sugiere que el suero desencadenaría múltiples vías de señalización en *C. albicans*, cada una de las cuales sería capaz de inducir la morfogénesis (Lo y col., 1997).

En la inducción de la germinación, los niveles de ARN mensajero de *EFG1* decrecen significativamente antes de la aparición de tubos germinativos, sugiriendo que Efg1p es requerido en eventos tempranos durante la formación de hifas, por ejemplo, creando un estado de competencia para iniciar el crecimiento filamentoso (Stoldt y col., 1997). Efg1p posee un putativo sitio de fosforilación para la PKA en la treonina 206. La sustitución de la treonina 206 por alanina, lleva a un bloqueo en la formación de hifas verdaderas, mientras que la sustitución de la treonina 206 por glutamato (simulando un grupo fosfato) causa hiperfilamentación (Bockmühl y Ernst, 2001). Aún se desconoce si Efg1p es directamente fosforilado por alguna de las isoformas de PKA de *C. albicans* (ver Figura 3).

5.3. Vía de señalización por pH

En *C. albicans* la respuesta al pH está mediada por una vía de transducción de señales conservada en otros hongos. Como ocurre en *S. cerevisiae* y en *Aspergillus nidulans* la proteólisis del factor de transcripción *RIM101* (*PRR2*) media la respuesta por pH (Porta y col., 1999; Ramon y col., 1999; Davis y col., 2000). La forma truncada de Rim101p causa la filamentación y la expresión de genes inducidos por pH alcalino, independientemente del pH del medio (El Barkani y col., 2000). Efg1p es requerido para la filamentación inducida por Rim101p, pero no para la expresión de genes inducida por pH alcalino. Por lo tanto, Efg1p actuaría debajo de Rim101p o los dos factores actuarían en paralelo en la regulación de la filamentación (Liu, 2001) (ver Figura 3).

6. Represión de la filamentación en *C. albicans*

Estudios del gen *TUP1* de *C. albicans* indican que la filamentación puede ser también reprimida. *TUP1* codifica para un represor transcripcional que controla negativamente el crecimiento filamentoso. Es muy probable que Tup1p sea parte de un complejo represor de la transcripción que es llevado hasta los promotores por proteínas de unión a ADN específicas de secuencia. La mutante *tup1/tup1* de *C. albicans* muestra un crecimiento pseudohifal constitutivo pero no es infectiva, mostrando nuevamente que el crecimiento pseudohifal *per se* no implica una mayor virulencia de las células. Sorprendentemente, esta mutante no forma hifas verdaderas frente a la inducción con suero, sugiriendo que la iniciación de la vía de transición levadura-hifa verdadera requiere la forma levaduriforme (Braun y Johnson, 1997). Braun y Johnson (2000) demostraron mediante mutaciones simples, dobles y triples de los genes *EFG1*, *CPH1* y *TUP1*, que los productos de estos genes actúan en vías diferentes de la filamentación, pero de manera aditiva (ver Figura 3).

Componentes conocidos de la vía de las MAP quinasas, de la vía de AMPc/PKA y de la vía de Rim101

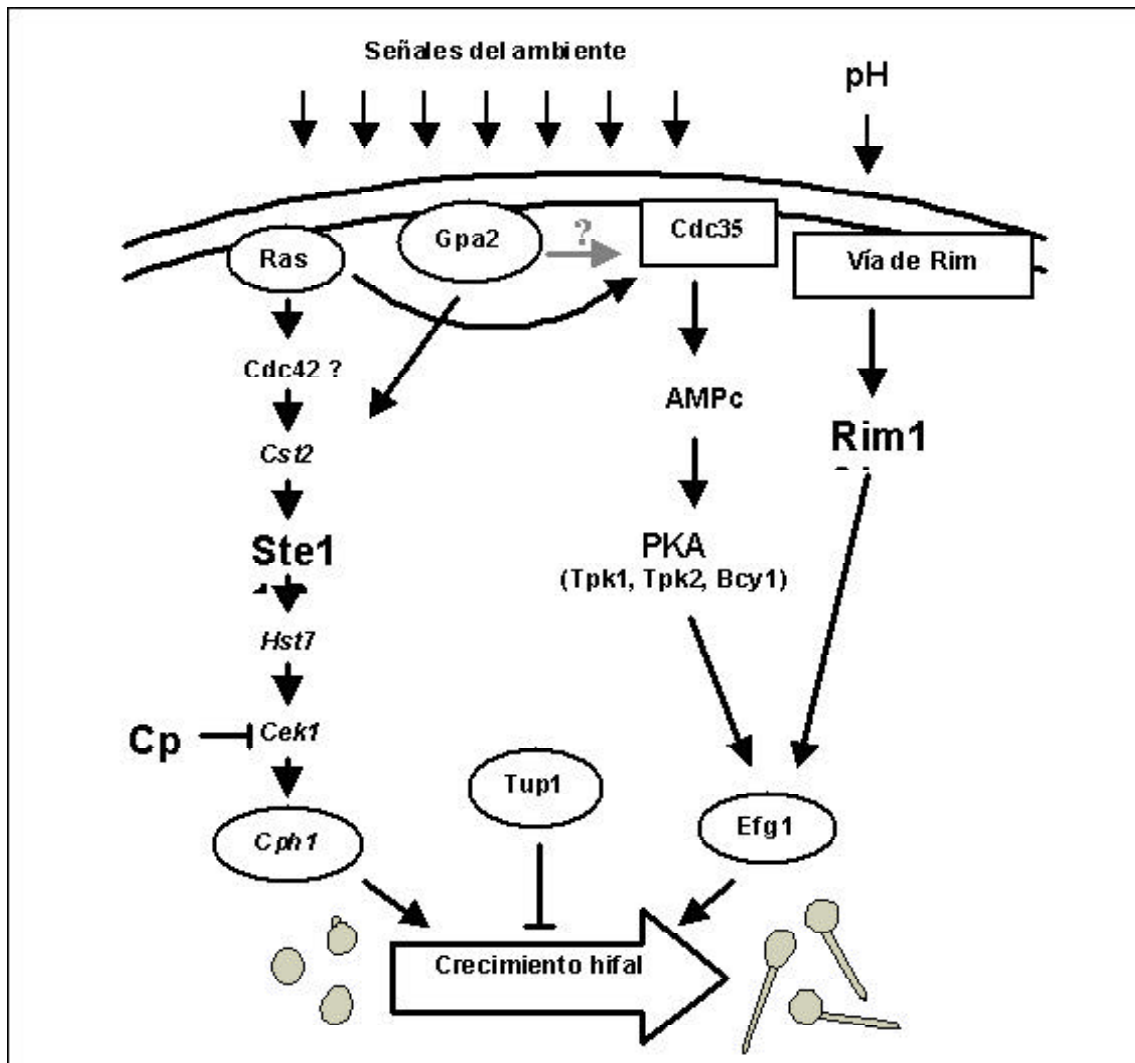


Figura 3. Vías de señalización en *C. albicans*.

7. Localización subcelular de la PKA en eucariotas superiores

La vía de señalización del AMPc está involucrada en la transducción de una gran variedad de señales extracelulares en las células eucariotas. Es importante entonces comprender de qué manera se establece una respuesta celular específica a una señal determinada. Uno de los mecanismos propuestos para explicar esta especificidad es la localización de la PKA en membranas y organelas celulares en organismos eucariotas superiores a través de la interacción con una familia de proteínas de anclaje (A Kinase Anchoring Proteins, AKAPs) distintas pero funcionalmente homólogas (Edwards y Scott, 2000; Dodge y Scott, 2000). Se han identificado más de 25 AKAPs, algunas de las cuales son productos de una compleja familia de genes que varían en el procesamiento de su ARNm (Colledge y Scott, 1999). Las AKAPs inmovilizan la PKA a través de su unión a las subunidades RI y RII. El módulo molecular que media la unión AKAP con RII está altamente conservado; la secuencia de aminoácidos en este módulo es tal que adopta la estructura de una hélice anfipática, con residuos hidrofóbicos alineados a lo largo de una de las caras de la hélice y residuos cargados a lo largo de la otra cara (Carr y col., 1991). Los primeros 30 aminoácidos de RII participan en la unión a AKAP y promueven la dimerización de las subunidades RII, prerequisite para la unión a una AKAP (Hausken y col., 1996). Las AKAPs además poseen una secuencia que dirige al complejo PKA-AKAP a determinados compartimentos celulares ya sea por interacción proteína-proteína que lo ubica en elementos estructurales o por interacción lípido proteína que lo ancla a las membranas. Algunas AKAPs tienen la

8. Localización subcelular de la PKA de *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* se ha demostrado, mediante la expresión ectópica de proteínas fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP), que la subunidad R de la PKA (Bcy1p) y una de las isoformas de C (Tpk1p) asociada a ella están localizadas predominantemente en el núcleo de células en fase de crecimiento logarítmico (Griffioen y col., 2000). En mutantes que no sintetizan el nucleótido cíclico la disociación de la PKA nuclear por el agregado exógeno de AMPc permite observar la aparición de una fracción significativa de Tpk1p en el citoplasma, mientras que Bcy1p permanece en el núcleo. Este resultado muestra que Tpk1p no posee la capacidad intrínseca de concentrarse en el núcleo y que su acumulación nuclear es dependiente de la interacción con la subunidad R. Se ha encontrado también que el extremo N terminal de Bcy1p es necesario y suficiente para su localización nuclear. En células en fase estacionaria o crecidas en fuentes de carbono no fermentables, tanto Bcy1p como Tpk1p están distribuidas en núcleo y citoplasma. Estos resultados indican que la localización subcelular de la PKA de *S. cerevisiae* depende de la fase de crecimiento y de la fuente de carbono utilizada. Se ha observado un retardo en la proliferación de células mutantes que son incapaces de concentrar en el núcleo Bcy1p, denotando que sería de suma importancia la remoción de Bcy1p del citoplasma, ya que podría interferir con procesos metabólicos necesarios para retomar el crecimiento rápido (Griffioen y col., 2000).

Se ha propuesto un modelo para explicar el mecanismo que regula los cambios en la distribución subcelular de la PKA en el cual juega un rol fundamental el estado de fosforilación de R por una quinasa específica (Griffioen y col., 2001).

9. PKA de *C. albicans*

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se purificó y caracterizó la PKA de *C. albicans* (Zelada y col., 1998). La holoenzima purificada a partir de células levaduriformes posee una estructura tetramérica (de 287 kDa) formada por dos subunidades catalíticas que presentan una masa molecular inusualmente alta (aproximadamente 78 kDa) y de dos subunidades regulatorias de 64 kDa. La holoenzima es completamente dependiente de AMPc. Las Kms calculadas para el ATP y el kemptido son de 30 y 60 mM respectivamente. La subunidad R es del tipo II, es fosforilada por C en una reacción intramolecular y une 2 moles de AMPc por mol de monómero. Utilizando la subunidad R expresada en *E. coli*, tanto en su forma nativa como mutagenizada en el sitio de autofosforilación, demostramos que la autofosforilación de R modula, *in vitro*, su interacción con C (Zelada y col., 2002).

Como se mencionó anteriormente, existen dos isoformas de la subunidad catalítica de la PKA que están codificadas por los genes *TPK1* y *TPK2* (Bockmühl y col., 2001; Cloutier y col., 2003). La mutante que carece de ambos alelos del gen *TPK2* (mutante *tpk2*) presenta una germinación atenuada en presencia de NacGlc, la cual es bloqueada completamente por myrPKI, un derivado permeable del PKI, indicando la presencia de actividad de PKA involucrada en la morfogénesis pese a la eliminación de *TPK2*. Esta actividad medida *in vitro* es de sólo un 10 % de la medida en la cepa salvaje. Se presentaron evidencias bioquímicas y moleculares mostrando la existencia de un segundo gen que codifica para una subunidad catalítica de PKA que se expresa en células salvajes y en la mutante *tpk2* (Cloutier y col., 2003). La existencia de este gen, llamado *TPK1*, había sido predicha por los resultados del Proyecto Genoma de *C. albicans*. Con respecto a la subunidad R, existe una única isoforma codificada por el gen *BCY1*, nombrado de esta manera por su homología con su par en *S. cerevisiae* (Cassola y col., 2004).

10. Mutantes en *C. albicans*

Como se mencionó anteriormente la manipulación genética de *C. albicans* se ve dificultada por su diploidía y por la ausencia de ciclo sexual. Las mutaciones recesivas no son expresadas en estados de heterocigosis y las mutaciones indeseables introducidas en el curso de mutagénesis al azar no pueden ser eliminadas por cruzamiento genético. Sin embargo en los últimos años la aplicación de las técnicas modernas de genética molecular y de un sistema de transformación, inicialmente desarrollados en *S. cerevisiae*, han subsanado algunos de estos problemas (Kurtz y col., 1990).

Al igual que en *S. cerevisiae*, la transformación integrativa de *C. albicans* ocurre a través de recombinación homóloga y esta propiedad ha sido explotada para la mutagénesis dirigida de su genoma. Dado que *C. albicans* es diploide, los alelos mutantes introducidos por transformación deben presentarse en homocigosis de manera de desenmascarar fenotipos recesivos. Esto ha sido logrado por transformaciones sucesivas usando dos marcadores de selección diferentes (Kurtz y Marrinan, 1989) y más recientemente por transformación secuencial usando el mismo marcador de selección (Gorman y col., 1991). Este último método, originalmente desarrollado en *S. cerevisiae*, ha sido aplicado a *C. albicans* usando el cassette Ura-blaster (Fonzi e Irwin, 1993). Este cassette lleva repeticiones directas de genes bacterianos como *HISG* o *CAT* separados por una copia del gen *URA3* de *C. albicans*. A este cassette se le agregan regiones flanqueantes

homólogas al gen a eliminar que median la integración de este cassette por recombinación. La inserción de este cassette es seleccionada a través de la función del gen *URA3* en cepas *ura-*. La utilidad de este cassette reside en que la escisión del gen *URA3* ocurre frecuentemente a través de la recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes, y también a la existencia de un sistema de contra-selección. La selección de los segregantes que han sufrido la escisión se realiza en un medio conteniendo ácido fluororotico (5-FOA), tóxico para aquellas levaduras que no eliminaron el gen *URA3*. De esta manera se recuperan mutantes *ura-*. Una segunda ronda de transformación es usada para eliminar el segundo alelo del gen en cuestión (para una revisión ver Pla y col., 1996). Para identificar los transformantes en los cuales el cassette se ha insertado correctamente en la secuencia blanco del genoma se utiliza tanto la técnica de PCR como la de Southern blot.

El uso de estas técnicas de eliminación de genes en *C. albicans* ha permitido crear cepas mutantes para diversos genes, entre ellos algunos de los involucrados en la transición morfogénica. La homología funcional de los productos de estos genes con los ya conocidos en otras especies fúngicas, principalmente *S. cerevisiae*, ha permitido adjudicar la función de cada uno de ellos. Los experimentos de epistasis en las diferentes mutantes han permitido asignarle a los productos de estos genes una ubicación dentro de las cascadas de señalización antes descritas.

11. Objetivos de este trabajo

En un trabajo previo se demostró que la localización de la isoforma Tpk1p de la subunidad catalítica es predominantemente nuclear en una cepa portadora de los dos alelos de *BCY1*, mientras que en la cepa *tpk2 bcy1*, carente de ambos alelos, la Tpk1p se encuentra distribuida homogéneamente en toda la célula (Cassola y col., 2004). Estos resultados sugieren que uno de los posibles roles de Bcy1p es localizar a la subunidad C dentro del núcleo.

Con el objeto de analizar la localización subcelular de la subunidad regulatoria de la PKA (Bcy1p) se encaró la construcción de la proteína de fusión Bcy1p-GFP. Para ello se modificó a nivel genómico uno de los alelos de *BCY1*, en el contexto del gen, de tal manera que resultase en la expresión de la proteína de fusión Bcy1-GFP, a partir de su propio promotor, en distintas cepas de *C. albicans* (*tpk1*, *tpk2* y *tpk2 BCY1/bcy1*, ésta última portadora de un único alelo de *BCY1*). La observación por microscopía de fluorescencia de las cepas portadoras de la fusión (RG09, RG05 y RG01) permitió determinar la localización de la proteína Bcy1.

Un segundo objetivo consistió en el análisis del comportamiento germinativo de la cepa mutante *tpk2 BCY1/bcy1*, la cual carece de uno de los alelos de *BCY1*. Resultados previos de nuestro y otros laboratorios demostraron que la PKA posee un rol positivo en la inducción del crecimiento filamentosos, permitiendo suponer que la ausencia de subunidad R en la doble mutante *tpk2 bcy1* promovería la aparición de un fenotipo constitutivamente germinativo, debido a la presencia de actividad enzimática desregulada. Inesperadamente la doble mutante *tpk2 bcy1* resultó en un fenotipo agerminativo (Cassola y col., 2004). Por lo tanto procedimos a analizar el comportamiento germinativo de las cepas *tpk2 BCY1/bcy1* y RG01, lo cual nos permitió establecer una correlación entre los niveles de expresión de la subunidad R, dependiente del número de alelos presentes en la cepa, y el patrón de germinación de la misma.

1. Organismos y condiciones de cultivo

1.1. *Candida albicans*

1.1.1. Cepas

En este trabajo se utilizaron las cepas de *C. albicans* que se muestran en la Tabla 1. Las cepas fueron mantenidas en placas de petri en medio YPD (extracto de levadura 1 %, Bacto peptona 2 %, glucosa 2 %) agarizado suplementado con uridina 50 mg/litro (YPD + Uri) (cepas CA14, H2D, *tpk1* y *tpk2 BCY1/bcy1*), o medio SD (Yeast Nitrogen Base 0,67 %, Glucosa 2 %) agarizado suplementado con aminoácidos (cepas RG09, RG05 y RG01), y se repicaron cada 30 días en medio fresco. Stocks de cada cepa se conservaron a -70°C en medio YPD líquido conteniendo 15 % glicerol.

Tabla 1. Cepas de *C. albicans* utilizadas en este trabajo

Cepas	Genotipo	Fuente
CAI4	<i>ura3::λ imm 434/ura3::λ imm 434</i>	Fonzi e Irwin, 1993
<i>tpk1</i>	<i>ura3::λ imm 434/ura3::λ imm 434 tpk1Δ::Cat/tpk1Δ::Cat</i>	Cloutier y col., 2003
H2D*	<i>ura3::λ imm 434/ura3::λ imm 434 tpk2Δ::Cat/tpk2Δ::Cat</i>	Cassola y col., 2004
<i>tpk2 BCY1/bcy1</i>	<i>ura3::λ imm 434/ura3::λ imm 434 tpk2Δ::Cat/tpk2Δ::Cat/ bcy1Δ::Cat/BCY1</i>	Giasson, L., 2003
RG09	<i>ura3::λ imm 434/ura3::λ imm 434 tpk1Δ::Cat/tpk1Δ::Cat BCY1/BCY1-GFP URA3</i>	Este trabajo
RG05	<i>ura3::λ imm 434/ura3::λ imm 434 tpk2Δ::Cat/tpk2Δ::Cat BCY1/BCY1-GFP URA3</i>	Este trabajo
RG01	<i>ura3::λ imm 434/ura3::λ imm 434 tpk2Δ::Cat/tpk2Δ::Cat/ bcy1Δ::Cat/ BCY1-GFP URA3</i>	Este trabajo

* De aquí en más referida como *tpk2*

1.1.1. Cultivos

Para la obtención de cultivos levaduriformes de las cepas CAI4, *tpk1*, *tpk2* y *tpk2 BCY1/bcy1* las células provenientes de cultivos en medio sólido se inocularon en medio líquido YPD + Uri. Los cultivos se crecieron a 28°C con agitación orbital de 200 rpm manteniendo una relación atmósfera medio de cultivo de 4:1. Estos cultivos se utilizaron como preinóculos para cultivos líquidos de volúmenes variables de medio YPD + Uri.

1.2. *Escherichia coli*

1.2.1. Cepas

Para amplificar el plásmido conteniendo la secuencia utilizada como sonda en los experimentos de Northern blot se utilizó la cepa *E. coli* DH-5a (*F- de o R recA1 end hsd R17 (r_k⁻, m_k⁺) supE44I- thi1 gyrA96 relA1*).

1.2.2. Cultivos

Las células se cultivaron en medio líquido LB (CINa 1 %, triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %). Para crecer las bacterias en medio sólido se utilizó medio LB agarizado al 2%. Cuando fue necesario se agregaron los siguientes antibióticos: kanamicina (30 mg/ml) o ampicilina (50 mg/ml).

2. Condiciones de formación de tubos germinativos

Las células levaduriformes provenientes de un cultivo en fase estacionaria se cosecharon por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos, se lavaron 2 veces con H₂O destilada y se resuspendieron a una densidad final de 2 x 10⁶ células/ml en el medio descrito por Shepherd y col., (1980) cuya composición es: buffer imidazol 20 mM, pH 6.6; Cl₂Mn 0.2 mM, y NAcGlc 10 mM como inductor de la germinación. El cultivo

se incubó a 37°C con agitación y la evolución de formación de tubos germinativos se monitoreó por microscopía de campo claro.

3. Manipulación del plásmido GFP-URA3

3.1. Características del plásmido GFP-URA3

Este plásmido posee un módulo de amplificación para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) formado por la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) modificada para su óptima expresión en *C. albicans*, seguido de la región terminadora de la transcripción del gen de la alcohol deshidrogenasa (T_{ADH1}) y del gen de la orotidina-5'-monofosfato decarboxilasa (URA3), ambos de *C. albicans*, este último conservando su propio promotor. La amplificación de este módulo por PCR con primers específicos da un producto de 3.200 pares de bases. Además este plásmido posee un origen de replicación en bacterias y un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacterias (Gerami-Nejad y col. 2001). Este plásmido fue cedido gentilmente por la Dra. Cheryl Gale.

3.2. Preparación de bacterias electrocompetentes

Se inocularon 500 ml de medio LB con 5 ml de un preinoculo de células de *E. coli* DH-5a. El cultivo se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 0.5-0.7. Se dejó el cultivo en hielo durante 10 minutos y para los pasos subsiguientes se mantuvieron las células a 4°C. El cultivo se centrifugó durante 15 minutos a 4.000 rpm. Las células se lavaron tres veces con 500 ml de glicerol 10 % frío, y finalmente se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10 % frío. Las células se guardaron inmediatamente a -70°C.

3.3. Transformación de bacterias electrocompetentes

Alícuotas de 40 ml de bacterias electrocompetentes se mezclaron con 25-50 ng del plásmido GFP-URA3 en frío. Las bacterias fueron transformadas por electroporación usando un MicroPulser (BioRad, # 165-2100), y la selección de las transformantes se realizó en medio LB sólido con ampicilina (50 mg/ml). A partir de colonias que crecieron en el medio de selección se obtuvieron cultivos líquidos en LB ampicilina, a partir de los cuales se purificó el plásmido pGFP-URA3.

3.4. Mini preparación de ADN plasmídico

Para las preparaciones de ADN plasmídico se utilizó el sistema Wizard Plus SV de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido purificado se guardó a -70°C, y una alícuota de 10 ml fue sometida a digestión con BamHI y EcoRI para verificar que el plásmido purificado fuera el correcto.

4. Fusión de GFP a *BCY1* en *C. albicans*

Para lograr la fusión de GFP al gen *BCY1* se utilizó la técnica desarrollada por Gerami-Nejad y col. (2001). Este método utiliza primers para PCR con extremos 5' que corresponden a la secuencia blanco del gen deseado, y extremos 3' que dirigen la amplificación de GFP seguida por el marcador de selección URA3 a partir del módulo presente en el vector pGFP-URA3. El ADN así amplificado posee una secuencia 5' con homología al gen, seguido de la secuencia de GFP en el marco de lectura correcto, un marcador de selección (URA3), y una región de homología 3' corriente abajo del gen.

La amplificación del módulo GFP-URA3, se realizó por la técnica de PCR utilizando como molde el plásmido pGFP-URA3, y los primers:

5'GTTGTGGAGGTATTGAAAGAACAAGACCCTACAAAGAGTCAAGACCCA ACTGCTGGTCATGGTGGT-GTTCAAAGGTGAAGAATTATT 3' (directo)

5'CACGCCCGGATAACTTCAATAATGTTCAACCCATGGGAAGCTCGTTCATGCTGCCATCTCGTATCTAGA-AGGACCACCTTTGATTG 3' (reverso).

El ADN para las transformaciones fue generado por PCR usando una mezcla de Taq ADN Polimerasa (Promega)/Vent ADN Polimerasa (New England Biolabs) en una relación 2:1. La mezcla de 50 µl estaba compuesta por Cl_2Mg 3.5 mM, buffer de PCR 10 X 5 µl, 0.4 mM de cada dNTP, 0.6 µM de cada primer, 4 U de mezcla Taq ADN polimerasa y 0.1 µg de plásmido molde. Las reacciones fueron incubadas durante 4 minutos a 94°C, posteriormente sometidas a 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, 3 minutos a 72°C, seguidos de 10 minutos a 72°C. Los productos de 10 reacciones de amplificación (aproximadamente 2 mg de ADN) se reunieron, se precipitaron con etanol y se resuspendieron en 50 ml de H_2O MilliQ. El ADN así obtenido se utilizó para transformar células levaduriformes de *C. albicans* de las cepas CAI4, *tpk2*, *tpk1* y *tpk2 BCY1/bcy1* utilizando la técnica descrita por Wilson y col. (1999).

5. Transformación de levaduras

Se utilizó el protocolo descrito por Wilson y col. (1999). Se utilizaron como inóculos 2 ml de las cepas CA14, *tpk2*, *tpk1* y *tpk2 BCY1/bcy1* crecidos en medio YPD + Uri durante una noche a 28°C, para 50 ml de medio de cultivo YPD + Uri. Estos cultivos se incubaron a 28°C hasta una OD₆₀₀ de 0.7. Las células se cosecharon, se lavaron con 5 ml de buffer LATE estéril (AcOLi 0.1 M; Tris-ClH 10 mM, pH 7.5; EDTA 1 mM) y se resuspendieron en 0.25 ml de buffer LATE estéril. Una alícuota de 0.1 ml de esta suspensión se incubó a 28°C por 30 minutos con 50 mg de ADN de esperma de salmón y 2 mg del producto de amplificación GFP-URA3 (ver Ítem 4). Terminada la incubación se agregó 0.7 ml de buffer PLATE estéril (polietilenglicol 3350 40 % en buffer LATE) y se resuspendió en vortex por 2 segundos. La suspensión de células se incubó toda la noche a 28°C, luego de lo cual se realizó una incubación a 42°C por 1 hora. Las células se cosecharon, se lavaron con 1 ml de buffer TE estéril (Tris-ClH 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM, pH 8) y se resuspendieron en 0.1 ml de buffer TE. Estas células se plaquearon en medio SD-Uri sólido suplementado con aminoácidos y las cajas se incubaron a 28°C hasta la visualización de colonias.

6. Verificación de la correcta integración del módulo en el genoma

Los transformantes fueron seleccionados plaqueando la mezcla de transformación en medio sintético SD-Uri (Sherman y col., 1983) suplementado con aminoácidos. Se hicieron al menos dos pasajes de las colonias obtenidas a nuevo medio sólido sintético. Para identificar las cepas en las cuales el módulo se insertó correctamente en la secuencia blanco del genoma, el ADN genómico fue usado como molde en una reacción de amplificación, usando un primer con homología en el módulo de transformación, y un segundo primer fuera de la región alterada

5'CCACCACCAACCAAGAGCCA 3' (directo)

5'GCCACGAATACTTCCAACAG 3' (reverso)

Esta reacción, desarrollada en las condiciones anteriormente descritas, excepto que se usó 2 mM de cada primer, 1 ml de ADN genómico como molde y 30 segundos de amplificación a 50°C, amplificó un fragmento de 1.334 pb.

6.1. Purificación de ADN genómico

Los clones de *C. albicans* transformados que crecieron en el medio de selección se crecieron en 2.5 ml de medio YPD a 28°C hasta alcanzar la fase estacionaria (3 días). Las células se cosecharon, se lavaron con H₂O destilada y se resuspendieron en 0.2 ml de: Tris-ClH 10 mM, pH 8; ClNa 100 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 2%; SDS 1 %. A las células resuspendidas se les agregó 0.2 ml de fenol/cloroformo (1:1) y 0.3 g de perlas de vidrio. Las células se rompieron por agitación durante un minuto en vortex; el tratamiento se repitió cuatro veces con intervalos de 1 minuto a 0°C entre cada tratamiento. A la suspensión se le agregó 0.2 ml de buffer TE y se centrifugó por 5 minutos a 10.000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio. A estos tubos se les agregó 1 ml de etanol 100 % y se mezclaron por inversión seguido de centrifugación a 10.000 rpm por 2 minutos. Se recuperó el precipitado, el cual se resuspendió en 0.4 ml de buffer TE más 10 mg de RNasa A, y se incubó por 15 minutos a 37°C. Luego de la incubación se realizó una extracción con 0.4 ml de fenol/cloroformo (1:1) y a la fase acuosa recuperada se le agregó 40 ml de AcONa 3 M y 1 ml de etanol 100 %. Las preparaciones se guardaron a -20°C por un día, luego de lo cual se centrifugaron a 10.000 rpm por 5 minutos. Los precipitados obtenidos se secaron al vacío y se resuspendieron en 40 ml de buffer Tris-ClH 20 mM, pH 8. Se utilizaron 2 ml de esta preparación para la PCR de verificación.

6.2. PCR de célula entera

En esta técnica adaptada de Kirkpatrick (1998), se transfirió a 6 µl de H₂O MilliQ una colonia aislada de placa. El tubo se calentó a 94°C por 6 minutos en el termociclador e inmediatamente se colocó a -70°C durante 5 minutos. Se agregaron 19 µl de la mezcla de PCR, compuesta por Cl₂Mg 25 mM, buffer de PCR 10 X, 10 mM de cada dNTP, 1 µM de cada primer y 1.5 U de Taq ADN polimerasa. Las reacciones se incubaron por 3 minutos a 94°C, se sometieron luego a 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 2 minutos a 72°C y finalmente 5 minutos a 72°C. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1%.

7. Preparación de extractos celulares

Aproximadamente 1 x 10⁸ células provenientes de los diferentes cultivos en medio líquido se cosecharon y lavaron dos veces en frío con H₂O destilada y se resuspendieron en 300 ml de buffer de ruptura (buffer PO₄NaH₂ 20 mM, pH 6.8; EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, b-mercaptoetanol 10 mM, e inhibidores de proteasas: antipaína 20 mg/ml; leupeptina 20 mg/ml; pepstatina A 20 mg/ml; PMSF 1 mM). Las células se rompieron por agitación durante un minuto en vortex en presencia de 200 ml de perlas de vidrio; el tratamiento se repitió siete veces con intervalos de 1 minuto a 0°C entre cada tratamiento. La temperatura se mantuvo entre 0 y

4°C. El extracto obtenido se centrifugó en frío a 10.000 rpm durante 30 minutos para separar restos celulares, las perlas de vidrio y células no rotas. El sobrenadante (S-10) se utilizó inmediatamente en los ensayos enzimáticos.

8. Determinación de proteínas

La cantidad de proteína en las preparaciones se midió por el método de Bradford (1976) utilizando seroalbúmina bovina como estándar, o bien por el método de Lowry (1951).

9. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970) utilizando minigeles. Las muestras se mezclaron con ¼ de volumen de solución de Laemmli 4 X (Tris base 0.25 M; b-mercaptoetanol 3 M; glicerol 20 %; SDS 0.3 M; azul de bromofenol 0.05 %) y se calentaron durante 5 minutos a 100°C. Las corridas se llevaron a cabo manteniendo un voltaje constante de 100 voltios y a temperatura ambiente.

10. Técnicas inmunológicas

10.1. Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF por transferencia semi seca durante 90 minutos a 2.5 mA/cm² en una solución de Tris base 50 mM; glicina 40 mM; SDS 0.04 % y metanol 20 %. Las proteínas transferidas se visualizaron por tinción reversible con solución Ponceau S 0.1% en ácido acético 5%. Posteriormente la membrana se bloqueó por incubación con PBST-leche (buffer PO₄NaH₂ 10 mM pH 6.8; ClNa 0.9 %; Tween-20 0.05 % y leche en polvo descremada 5 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación la membrana se incubó con una dilución 1/4.000 del antisuero anti-subunidad R de *C. albicans*, o con una dilución 1/500 del anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFP (9996-Santa Cruz Biotechnology) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalizada la incubación las membranas se lavaron e incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia del segundo anticuerpo (anti IgG de conejo o ratón conjugado a fosfatasa alcalina) y los inmunocomplejos se revelaron utilizando BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato) y NBT (Nitro Blue Tetrazolium) en buffer de revelado TNM (Tris-ClH 100 mM, pH 9.5; ClNa 100 mM; Cl₂Mg 100 mM). La reacción se detuvo por inmersión de la membrana en H₂O destilada.

10.2. Inmunoprecipitación

Una alícuota de la fracción S-10 conteniendo 30 mg de proteínas totales (aproximadamente 1 ml) se preadsorbió sobre proteína A Sepharosa incubándola con 100 ml de resina durante 1 hora a 10°C. Finalizada la incubación la mezcla se centrifugó a 1.000 rpm por 3 minutos y al sobrenadante se le agregó 160 ml de proteína A Sepharosa previamente unida al anticuerpo anti-R, y se incubó toda la noche a 10°C. La suspensión se centrifugó a 1.000 rpm durante 3 minutos y el precipitado obtenido se lavó 2 veces con 1 ml de una solución conteniendo PO₄NaH₂ 10 mM; ClNa 75 mM. El precipitado final se resuspendió en 100 ml de buffer de Laemmli (1970), se hirvió 5 minutos y el sobrenadante obtenido se sometió a electroforesis y Western blot como se describió en los ítems 9 y 10.1.

11. Detección de ARNm

11.1. Extracción de ARN total de *C. albicans*

Para la extracción del ARN total de *C. albicans* se utilizó la técnica de calentamiento con fenol ácido. Se procedió como se explica a continuación: 1-2 x 10⁸ células se cosecharon y lavaron dos veces con H₂O Milli-Q estéril. Las células se resuspendieron en 400 ml de buffer TES (Tris-ClH 10 mM pH 7.5; EDTA 10 mM; SDS 0.5%), se agregaron 400 ml de fenol ácido y se agitó vigorosamente durante 10 segundos. Posteriormente, la suspensión se incubó a 65°C durante 1 hora con agitación cada 5 minutos. Al final de la incubación los tubos se colocaron en hielo durante 5 minutos y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos. La fase acuosa superior se transfirió a otro tubo, al cual se le agregaron 400 ml de fenol ácido, la mezcla se agitó vigorosamente, se dejó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos. Sobre la fase acuosa se repitió el tratamiento anterior.

A la fase acuosa de la última extracción se le adicionaron 40ml de AcONa 3 M pH 5.3 y 1 ml de etanol 100% para precipitar el ARN. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos y el pellet obtenido se lavó con etanol frío 70%. El pellet se resuspendió en 50 ml de H₂O Milli-Q estéril. La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente por medición de la absorbancia a 260 y 280 nm, manteniendo la relación 1.8-2 como parámetro de calidad.

11.2. Electroforesis de ARN

Se utilizaron geles de agarosa 1% desnaturizantes con 6% formaldehído en buffer MOPS 1X pH 7 (buffer MOPS 10 X: MOPS 0.2 M, AcONa 0.5 M pH 7, EDTA 0.01 M). Las muestras a sembrar se llevaron a 10 ml con H₂O Milli-Q y se les agregó igual volumen de buffer de siembra (se emplearon 10 ml de la siguiente mezcla cada 10ml de muestra: 5 ml de MOPS 10 X, 9 ml de formaldehído, 25 ml de formamida y 1 ml de bromuro de etidio (BrEt) 1 mg/ml). Las muestras se calentaron a 65°C por 15 minutos y se colocaron en hielo. La corrida electroforética se realizó en buffer MOPS 1X a 5 V/cm. Los geles fueron visualizados con luz UV y fotografiados con el equipo Kodak DC 120.

11.3. Preparación y marcación de sondas radiactivas

El ADN correspondiente a la sonda de GFP utilizada en el ensayo de Northern blot se escindió del plásmido que portaba este inserto (descrito previamente en el ítem 3.1) por medio de las enzimas de restricción PstI y HindIII, se lo aisló en gel de agarosa y se lo extrajo por medio del kit QIAEX II (Qiagen). Se procedió de igual manera para aislar y purificar el producto de 687 pb amplificado por la técnica de PCR, correspondiente a la sonda del 18S ARNr (ver Bahn y col., 2001).

Los primers utilizados fueron:

5'-ACTTTTCGATGGTAGGATAG-3' (directo)

5'-TGATCATCTTCGATCCCCTA-3' (reverso)

Las sondas radiactivas se marcaron con el kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La marcación se realizó utilizando 25 ng de templado por extensión de una batería de hexámeros generados al azar utilizando el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa. Como nucleótido radiactivo se usó [³²P]-dCTP (3.000 Ci/mmol).

11.4. Ensayos de Northern blot

Aproximadamente 30-50 mg de ARN total aislado de células en fase de crecimiento estacionario se corrieron en un gel de agarosa-formaldehído (1%). Luego de la separación electroforética, el ARN se transfirió por capilaridad toda la noche a una membrana Hybond N+ (Amersham) usando SSC 10 X (SSC 20 X: C1Na 3 M, citrato de sodio 0.3 M, pH 7). Previamente, para aumentar la eficiencia de la transferencia del ARN del gel a la membrana, el mismo se trató con las siguientes soluciones: a) 30 minutos con OHNa 0.05 M, C1Na 0.15 M, b) 20 minutos con Tris-ClH 0.1 M pH 7.5, C1Na 0.15 M y c) 30 minutos con 10x SSC. El ARN se fijó a la membrana por calentamiento a 80°C durante 2 horas.

La membrana se incubó en solución de hibridización Northern Max (Ambion) a 42°C durante 1 hora en horno de hibridización con cilindro rodante. Posteriormente se agregó a la misma solución la sonda correspondiente previamente desnaturizada a 100°C durante 5 minutos. Se incubó toda la noche a 42°C con rotación constante. Al día siguiente, la membrana se lavó sucesivamente con 2x SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente durante 30 minutos y con dos lavados con 2x SSC, 0.1% SDS a 55°C de 15 minutos. Por último la membrana se expuso a una placa fotográfica X-Omat (Kodak) a -70°C durante 2-3 días, en un cassette con pantalla amplificadora. Alternativamente se registró la señal empleando un Phosphorimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech). Las diferencias se cuantificaron empleando el software Image Quant.

12. Ensayos Enzimáticos

12.1. Medición de la actividad de PKA

La actividad de PKA se midió de acuerdo a Zelada y col. (1998). El ensayo estándar se llevó a cabo en un volumen final de 60 ml conteniendo Tris-ClH 20 mM, pH 7.5; Cl₂Mg 10 mM; b-mercaptoetanol 1 mM, kemptido 0.1 mM; [γ-³²P] ATP 0.1 mM (0.1-0.5 Ci/mmol), y AMPc 10 mM cuando fue necesario. Después de incubar a 30°C por 10 minutos, la reacción se detuvo sembrando la mezcla de reacción en papeles de fosfocelulosa, los cuales se lavaron con PO₄H₃ 75 mM según Roskoski (1983); la radioactividad retenida en los mismos se determinó en un contador de centelleo líquido.

12.2. Ensayo de autofosforilación

Los ensayos de fosforilación intramolecular se llevaron a cabo en un volumen final de 60 ml en una mezcla de reacción conteniendo: Tris-ClH 20 mM, pH 7.5; Cl₂Mg 10 mM; b-mercaptoetanol 1 mM y [γ-³²P] ATP 1 μM (150 μCi/mmol), en ausencia de AMPc y sustrato exógeno.

La mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a 4°C, la reacción se detuvo por el agregado de solución de Laemmli 2x y posterior calentamiento a 100°C por 2 minutos. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE 12%, reconocidas en Western blots (ítems 9 y 10.1) y sometidas a autorradiografía.

13. Microscopía de fluorescencia

La proteína de fusión se visualizó por microscopía de fluorescencia en células levaduriformes sin fijación. Los núcleos se visualizaron por tinción con 1 mg/ml 4,6-diamino-2-phenylindol (DAPI). Se utilizó un microscopio de fluorescencia Olympus BX50. Las imágenes se tomaron con una Cámara digital color CoolSNAP-Pro_{cf} usando el software Image Pro Plus (Media Cybernetics).

14. Materiales

Inhibidores de proteasas, kémpitido, AMPc, ATP, DAPI, anticuerpos anti-IgG de conejo y de ratón acoplados a fosfatasa alcalina fueron provistos por Sigma Chemical Co. Yeast Nitrogen Base y Bacto Peptona se adquirieron en Difco. Se utilizó papel de fosfocelulosa p-81 Whatman. Las membranas de PVDF (Immobilon-P) fueron provistas por Millipore Corp y las membranas para ácidos nucleicos de Hybond N+ (Amersham). [g - ^{32}P]ATP y [^{32}P]CTP fueron adquiridos de New England Nuclear. Los reactivos utilizados para electroforesis en geles de poliacrilamida fueron de grado electroforético y provistos por BioRad. Todos los otros reactivos fueron de grado analítico.

1. Expresión y localización subcelular de la proteína de fusión Bcy1-GFP en *C. albicans*

Para estudiar la localización subcelular de Bcy1p en las cepas mutantes *tpk1*, *tpk2* y *tpk2 BCY1/bcy1*, se insertó en los respectivos genomas el gen de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) de manera que la célula expresara la proteína de fusión Bcy1-GFP.

1.1. Construcción de la fusión BCY1-GFP a nivel genómico

Para lograr la fusión de GFP al gen *BCY1* en las cepas mencionadas anteriormente se utilizó la técnica desarrollada por Gerami-Nejad y col. (2001), que utiliza una variante de GFP modificada especialmente para su correcta expresión en *C. albicans*. La construcción de la fusión se realizó según se detalla en Materiales y Métodos, Ítem 4. En la Figura 5 se esquematiza el procedimiento utilizado para lograr la fusión. Este método utiliza para la reacción de PCR dos primers de 60 bases con extremos 5' que corresponden a de la secuencia blanco del gen *BCY1* y extremos 3' que dirigen la amplificación de GFP seguida por el marcador de selección *URA3* a partir del módulo presente en el vector pGFP-URA3. El ADN así amplificado posee una secuencia 5' con homología al gen, seguida de la secuencia de GFP fusionada en fase al último codón de Bcy1p, de un marcador de selección (*URA3*) y una región de homología 3' corriente abajo del gen. Este ADN fue utilizado para transformar células de *C. albicans*. La selección de los clones transformantes se realizó en medio SD-Uri, y sobre estos clones se verificó por PCR que el módulo se hubiera insertado en la posición correcta del genoma.

Es importante aclarar que la fusión se realizó en el extremo carboxilo terminal de Bcy1p, que la expresión de la proteína de fusión Bcy1-GFP queda bajo el control del propio promotor del gen *BCY1*, y que en el caso de las cepas *tpk1* y *tpk2* sólo uno de los dos alelos del gen *BCY1* posee la fusión.

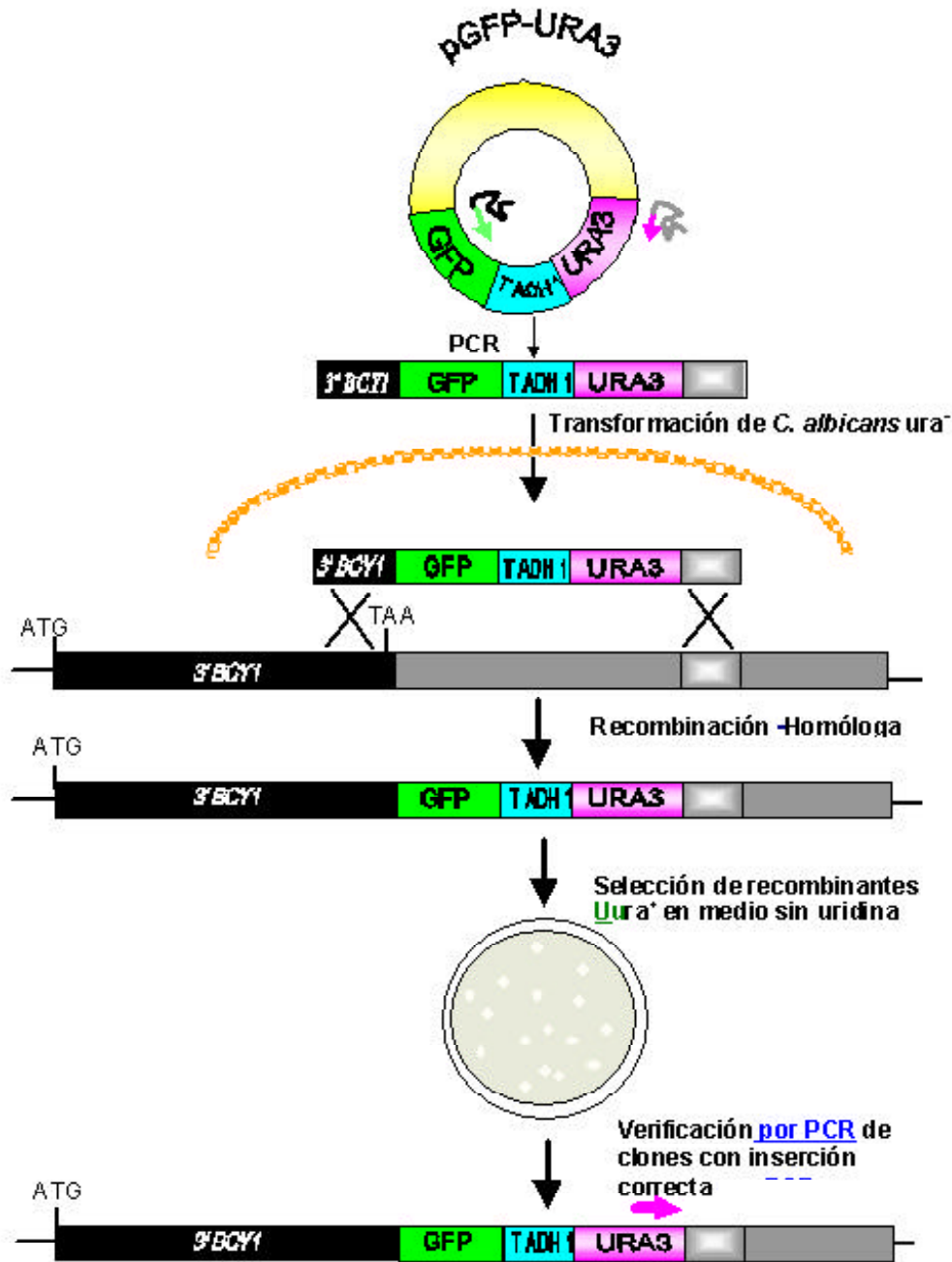


Figura 5. Esquema de la construcción de la fusión a nivel genómico.

1.2. Amplificación del módulo de transformación

Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 3.200 pares de bases mediante la amplificación por PCR del módulo presente en el plásmido GFP-URA3, utilizando los primers diseñados especialmente para lograr la fusión río abajo del gen *BCY1*.

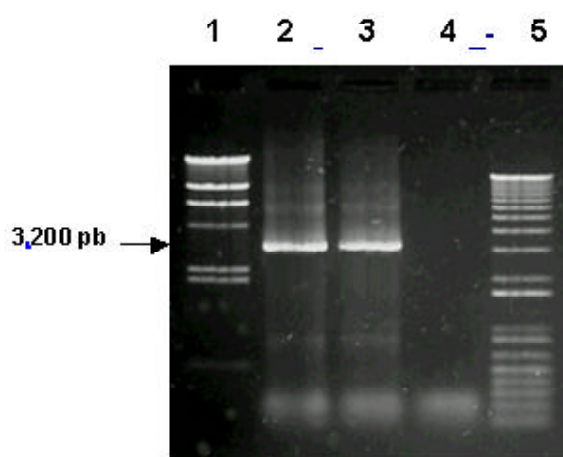


Figura 6. Amplificación del módulo de transformación por PCR. La amplificación del módulo de realizó como se detalla en Materiales y Métodos, Ítem 4, y el producto de amplificación fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 1,2 %. Calles 1 y 5: estándares de tamaño de ADN de diferente rango. Calles 2 y 3: 20 μ l de la amplificación usando pGFP-URA3 como molde. Calle 4: 20 μ l del control sin molde. En el margen izquierdo la flecha indica la banda amplificada del tamaño esperado.

1.3. Selección de las cepas que integraron el módulo correctamente y verificación de las mismas por PCR

Para las transformaciones de cada una de las cepas se utilizaron los productos de 10 PCR individuales. Los transformantes fueron seleccionados plaqueando la mezcla de transformación en medio sintético SD completo -Uri. Los transformantes en los cuales el módulo se insertó correctamente en la secuencia blanco del genoma fueron identificados utilizando el ADN genómico o bien colonias aisladas para la técnica de célula entera, como se detalla en Materiales y Métodos, ítem 6. Se utilizó un primer con homología en el módulo de transformación y un segundo primer fuera de la región alterada, como se indica en la Figura 5. Todos los clones aislados en medio SD-Uri fueron analizados por PCR y dieron una banda esperada de 1.334 pb. A modo de ejemplo se muestran los resultados para la cepa *tpk2* utilizando ambas técnicas (fig. 7 y 8 respectivamente).

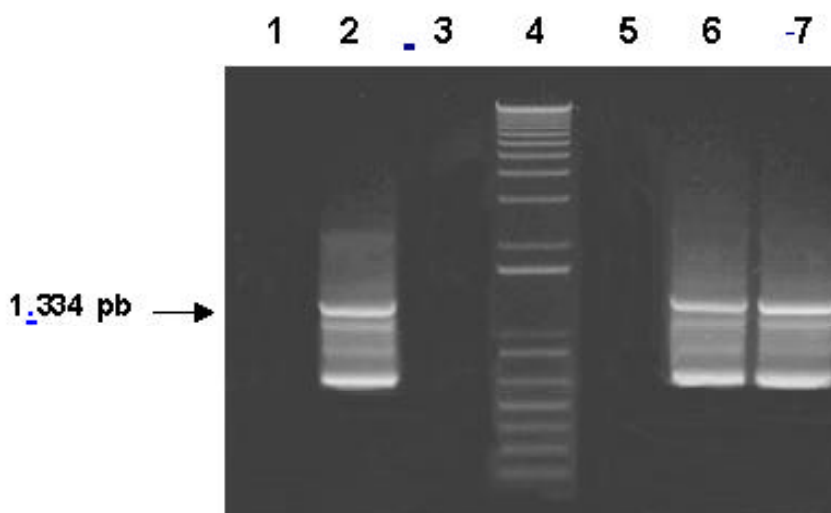


Figura 7. Verificación por PCR de clones positivos para la fusión de GFP al gen BCY1 en la cepa *tpk2*, utilizando ADN genómico como molde. Los productos de amplificación obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 0,8 %. Calle 1: control sin molde. Calles 2, 6 y 7: clones que poseen la inserción y amplifican el fragmento de 1.334 pb. Calles 3 y 5: clones que no poseen la inserción. Calle 4: 5 ml del estándar de tamaño de ADN. La flecha a la izquierda indica la posición esperada para el fragmento amplificado.

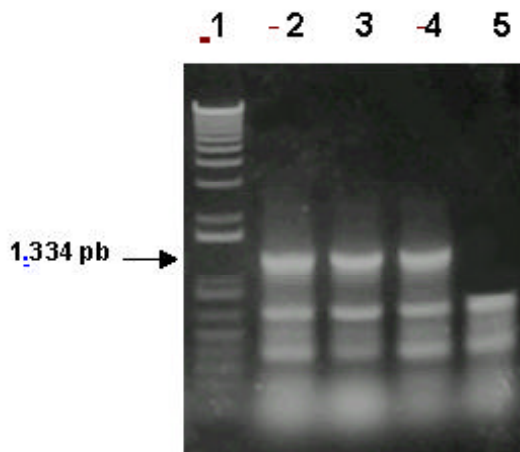


Figura 8. Verificación de clones positivos derivados de la cepa *tpk2* mediante la técnica de PCR de célula entera. De la misma manera los productos de amplificación obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0,8 %. Calle1: 5 ml del estándar de tamaño de ADN. Calles 2, 3 y 4: clones que presentan la inserción y amplifican el fragmento de 1.334pb. Calle 5: clon sin inserción. La flecha a la izquierda indica la posición esperada para el fragmento amplificado.

De los clones positivos que integraron correctamente el módulo a su genoma, se seleccionaron tres que fueron nombrados RG09, RG05 y RG01, los cuales poseen los genotipos de las cepas *tpk1*, *tpk2* y *tpk2 BCY1/bcy1* respectivamente (ver Tabla 1, Ítem 1.1. de Materiales y Métodos).

2. Análisis de la expresión de la proteína de fusión Bcy1-GFP

El análisis de la expresión de la proteína de fusión en las cepas transformadas que llevan la construcción *BCY1-GFP* se realizó en extractos crudos (S-10) por la técnica de Western blot utilizando un antisuero anti-R y un anticuerpo monoclonal anti-GFP. Se usó en cada caso la respectiva cepa original como control.

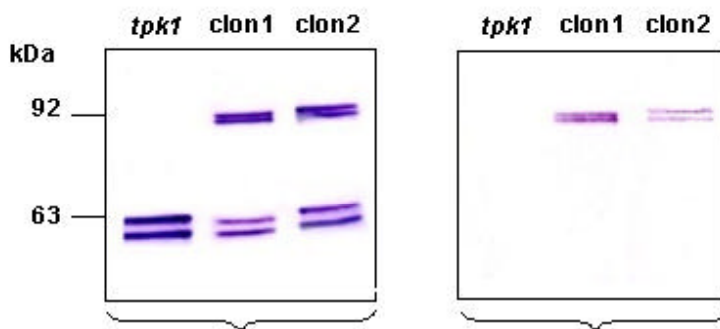


Figura 9. Análisis por Western blot de proteínas de extractos crudos provenientes de la cepa *tpk1* y de dos clones positivos para la fusión. Alícuotas de extractos crudos de células levaduriformes en fase de crecimiento estacionario conteniendo la misma cantidad de proteína (100 mg) fueron sometidas a SDS-PAGE 10 %. Las proteínas fueron posteriormente transferidas a una membrana de PVDF. La inmunodetección de la subunidad R se realizó con un antisuero anti-R de *C. albicans* (panel izquierdo) generado en el laboratorio y la proteína Bcy1-GFP con un anticuerpo monoclonal anti-GFP (panel derecho). En el margen izquierdo se indica la posición de la subunidad R y de R-GFP y sus respectivas masas moleculares relativas.

Como puede observarse (figura 9, panel izquierdo) ambos alelos, el normal y el fusionado se expresan correctamente en la cepa transformada, y sus masas moleculares son las esperadas, ya que la masa molecular de GFP es de aproximadamente 30 kDa. Es de notar que la expresión de estas proteínas se detectó como un doblete, este evento aleatorio podría deberse a modificaciones post-traduccionales (fosforilación) o proteólisis limitada. Uno de los clones positivos analizados fue llamado RG09 y fue el utilizado a lo largo de este trabajo.

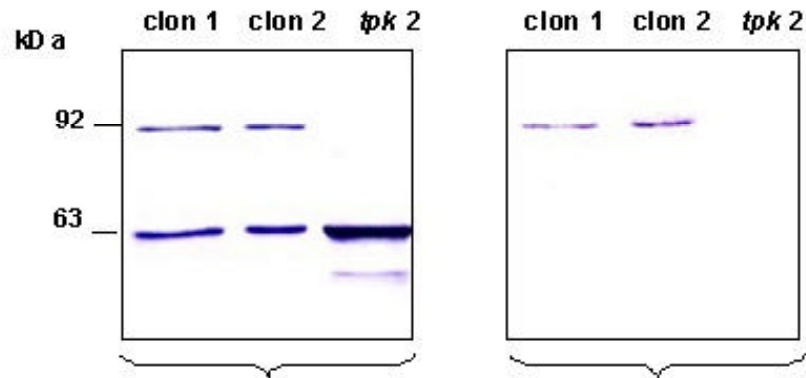


Figura 10. Análisis por Western blot de proteínas de extractos crudos provenientes de la cepa *tpk2* y de dos clones positivos para la fusión. Ver detalle del procedimiento en figura 9. En el margen izquierdo se indica la posición de la subunidad R y de R-GFP y sus respectivas masas moleculares relativas.

Los clones analizados también expresan la proteína de fusión Bcy1-GFP de 92 kDa y la proteína Bcy1 de 63 kDa codificada por el alelo no modificado. Nombramos a uno de ellos RG05. En este caso no se observa la presencia de dobletes.

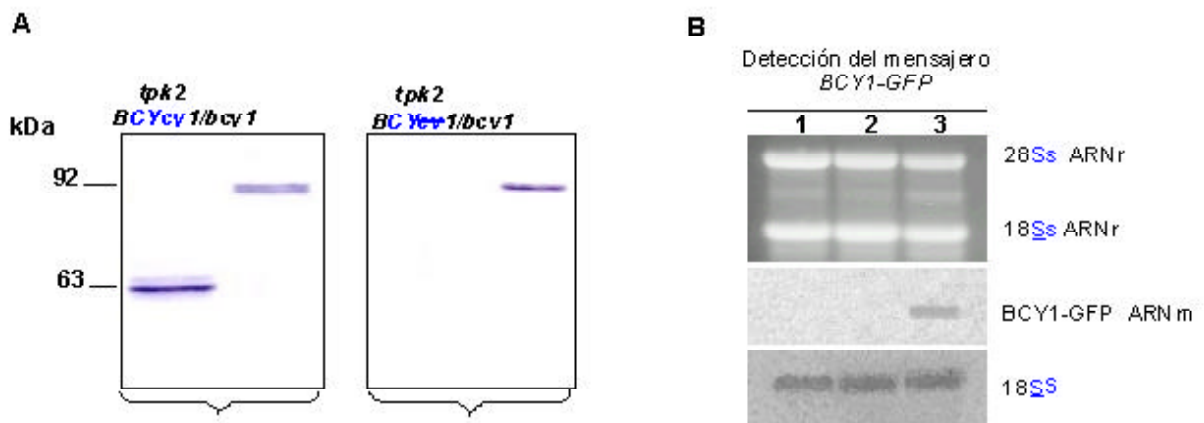


Figura 11. A) Análisis por Western blot de proteínas de extractos crudos provenientes de la cepa *tpk2 BCY1/bcy1* y de un clon positivo nombrado RG01. Ver detalles del procedimiento en figura 9. En el margen izquierdo se indica la posición de la subunidad R y de R-GFP y sus respectivas masas moleculares relativas.

B) Northern blot para detectar el ARNm de *BCY1-GFP*. Se llevó a cabo la detección de ARNm (ver Materiales y Métodos, ítem 11). Se extrajo el ARN total de células en fase estacionaria, se separó en un gel 1% de agarosa-formaldehído y se transfirió a la membrana. En el panel superior se muestran los ARN ribosomales por fluorescencia del bromuro de etidio. Calle 1: cepa *tpk2*. Calle 2: cepa *tpk2 BCY1/bcy1*. Calle 3: cepa RG01. En el panel intermedio se muestra la detección del mensajero de *BCY1-GFP* mediante una sonda para GFP. El panel inferior muestra el control de carga de ARN total detectado con una sonda específica de ADN para la subunidad ribosomal 18S.

Como se puede ver en la figura 11 A, la proteína de fusión también se expresa en la cepa *tpk2 BCY1/bcy1* modificada (RG01), mostrando la masa molecular esperada. La figura 11 B muestra que, como era de esperar, al utilizar una sonda para GFP se detectó el mensajero *BCY1-GFP* solo en la cepa RG01.

2.1. Estudio de la expresión de R

Se examinó la expresión de R en las cepas: *tpk2* (cepa original portadora de los dos alelos salvajes que codifican para R), *tpk2 BCY1/bcy1* (posee un único alelo) y RG01 (un único alelo fusionado a GFP). Se utilizó la técnica de inmunodetección por Western blot con antisuero anti-R. Los resultados pueden verse en la figura 12:

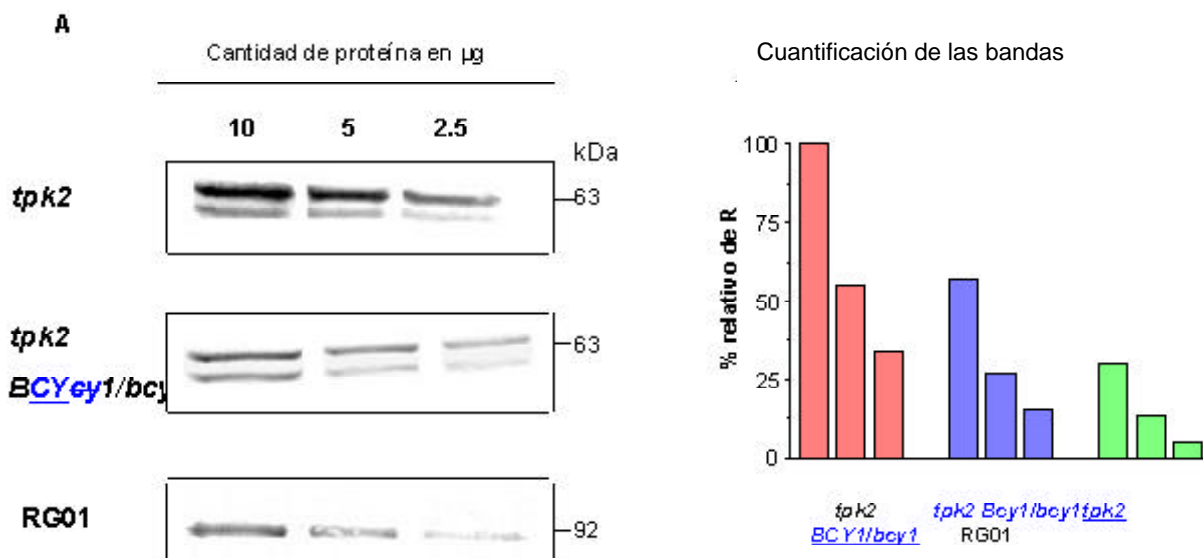


Figura 12 A). Análisis de los niveles de expresión de R en las cepas *tpk2*, *tpk2 BCY1/bcy1* y RG01 mediante Western blot. Alícuotas de extractos crudos (S-10) de células levaduriformes en fase de crecimiento estacionario conteniendo cantidades decrecientes de proteína fueron sometidas a SDS-PAGE 10 %. Las proteínas fueron posteriormente transferidas a una membrana de PVDF. La inmunodetección fue realizada con antisuero anti-R. En el margen derecho se indica la posición de la subunidad R y de R-GFP y sus respectivas masas moleculares relativas.

B). Cuantificación de las bandas inmunoreactivas. La cuantificación de R se realizó por densitometría, relativizando los valores al doblete de 10 µg de la cepa *tpk2*. Se utilizó el programa GELBASE&SOL; GELBLOT PRO PROGRAM (UVP Inc.).

Como puede observarse los niveles de R en la cepa *tpk2 BCY1/bcy1* son aproximadamente la mitad de los de la cepa original *tpk2* (posee los dos alelos salvajes de R), mientras que para la cepa que solo posee un alelo de R fusionado a la GFP (RG01) la expresión que se estima es de un cuarto de la medida en la cepa original, sugiriendo que los menores niveles de esta proteína artificial en la célula podrían deberse a inestabilidad del mensajero, a mayor degradación de la proteína, o ambas.

2.2. Inmunoprecipitación de la proteína Bcy1-GFP en las cepas transformadas

Como se describió en Materiales y Métodos, Ítem 10.2, se utilizó el antisuero anti-subunidad R para inmunoprecipitar alícuotas provenientes de la fracción S-10 de las cepas RG09, RG05, RG01 y de la cepa *tpk2* como control. Los inmunoprecipitados se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP.

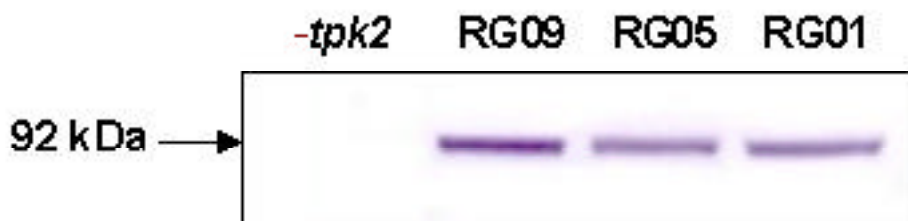


Figura 13. Inmunoprecipitación de Bcy1p-GFP. Cantidades iguales de los inmunoprecipitados obtenidos usando el antisuero anti-R fueron analizados por Western blot utilizando el anticuerpo anti-GFP. La flecha a la izquierda marca la posición de la banda de 92 kDa reconocida por el anticuerpo anti-GFP.

Como puede observarse en la figura, el anticuerpo anti-GFP permitió el reconocimiento de una banda con movilidad esperada para la proteína de fusión Bcy1-GFP (92 kDa) en todas las cepas transformadas, como consecuencia de la inmunoprecipitación de ésta por medio del antisuero anti-R. Este tipo de técnica se utilizó como una herramienta para evaluar la interacción entre R y C en experimentos subsiguientes.

3. Análisis de la dependencia de AMPc de la actividad de PKA en extractos crudos

Se evaluó la actividad de PKA y dependencia de AMPc en extractos crudos (S-10) de la cepa *tpk2* (portadora de los dos alelos salvajes que codifican para R), *tpk2 BCY1/bcy1* (posee un único alelo) y RG01 (un único alelo fusionado a GFP), con el objeto de analizar si la interacción entre la subunidad R y C varía en las distintas cepas.

Cabe recordar que la actividad fosfotransferasa de la cepa *tpk2* es fuertemente dependiente de AMPc (Cloutier y col., 2003), mientras que en la cepa mutante *tpk2 bcy1*, carente de ambos alelos del gen *BCY1*, la actividad de PKA es independiente del agregado de AMPc, evidenciando la presencia de subunidad catalítica (Tpk1p) constitutivamente activa (Cassola y col., 2004).

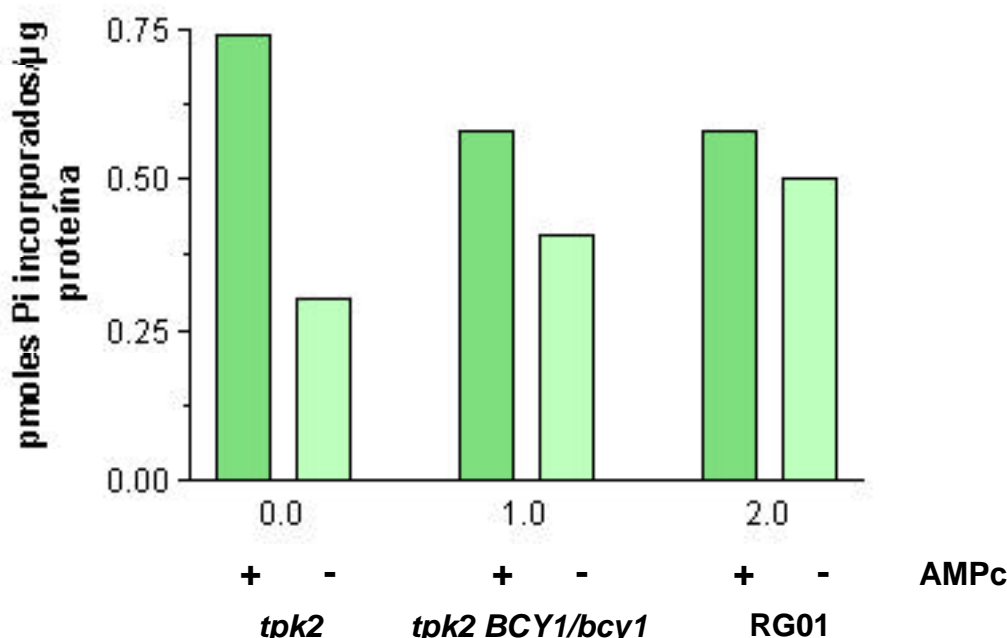


Figura 14. Actividad de PKA en extractos crudos de las cepas *tpk2*, *tpk2 BCY1/bcy1* y RG01. La actividad fosfotransferasa fue medida en extractos crudos (S-10) provenientes de células en fase de crecimiento estacionario como se detalla en Materiales y Métodos, Ítem 15, en ausencia o presencia de AMPc 10 mM.

Los datos de la figura muestran que la ausencia de uno de los alelos de *BCY1* (cepas *tpk2 BCY1/bcy1* y RG01) se tradujo en una ligera disminución de la actividad fosfotransferasa y en un marcado descenso de la dependencia de AMPc, especialmente en la cepa RG01. Los experimentos mostrados anteriormente en el ítem 2.1, indican que los niveles de R son menores en estas últimas dos cepas, por lo cual se puede inferir que la pérdida de dependencia se debe a un exceso de C (Tpk1p) que no forma parte de la holoenzima, ya que al medir actividad en presencia de AMPc se mide tanto la C unida a la subunidad R como la C libre.

3.1. Ensayo de fosforilación intramolecular de la subunidad R

Teniendo en cuenta los resultados anteriores era dable esperar que la cantidad de subunidad C que interactúa con R fuera menor en las cepas *tpk2 BCY1/bcy1* (la cual posee un único alelo de R) y RG01 (un único alelo fusionado a GFP), comparada con la cepa *tpk2*, la cual expresa el doble de subunidad R.

Hasta el momento no contamos con un anticuerpo anti-C, por consiguiente la fosforilación intramolecular de R por C en los inmunoprecipitados de las tres cepas se tomó como una evidencia de la interacción entre R y C.

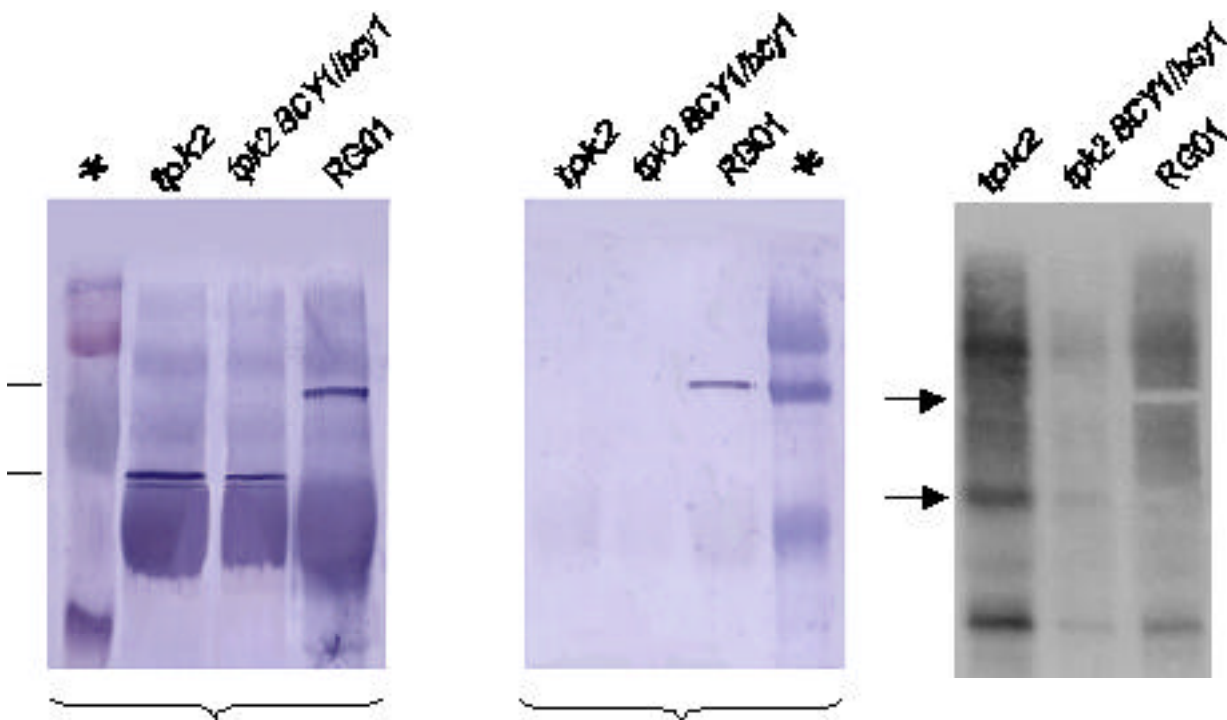


Figura 15. A) Fosforilación de la subunidad R. Inmunoprecipitados de las cepas *tpk2*, *tpk2 BCY1/bcy1* y RG01 fueron fosforilados como se indica en Materiales y Métodos, ítem 11.2 y analizados por Western blot, usando antisuero anti-R y anticuerpo anti-GFP. Las calles flanqueantes señaladas con un asterisco indican los estándares de masa molecular de proteínas. **B) Autorradiografía.** Se muestra la autorradiografía del Western blot revelado con el antisuero anti-R. En el margen izquierdo se señala el patrón de fosforilación de R y de R-GFP.

Como puede verse en la figura B, si bien la proteína R es fosforilada por la subunidad C en la cepa mutante *tpk2 BCY1/bcy1*, la señal es notoriamente menor que la de la cepa parental *tpk2*. Este resultado concuerda con el hecho de que la expresión de R en esta cepa es menor y por lo tanto refuerza la idea de que hay una mayor proporción de C libre, catalíticamente activa.

En el caso del clon RG01 la proteína de fusión no parece haber sido fosforilada. Inferimos entonces que en esta cepa la fusión podría interferir con la interacción de R con C, debilitando la asociación de las subunidades que conforman a esta quinasa.

4. Estudio de la localización subcelular de la proteína de fusión Bcy1-GFP

La evaluación de la localización de la proteína de fusión Bcy1-GFP en células levaduriformes de las tres cepas que llevan la construcción *BCY1-GFP* (RG09, RG05 y RG01), se realizó por microscopía de fluorescencia de células crecidas en medios YPD o SD-Uri líquidos y sólidos. La expresión de la proteína de fusión fue detectada en células en fase de crecimiento logarítmico, sin embargo, la fluorescencia fue más intensa en células de fase estacionaria crecidas en medio líquido o sólido. Este resultado parece indicar que en *C. albicans* la expresión de Bcy1p está regulada por la fase de crecimiento, al menos en medio conteniendo glucosa. En la Figura 16 se puede apreciar la localización subcelular de la proteína de fusión Bcy1-GFP en células de fase estacionaria crecidas en medio SD-Uri sólido.

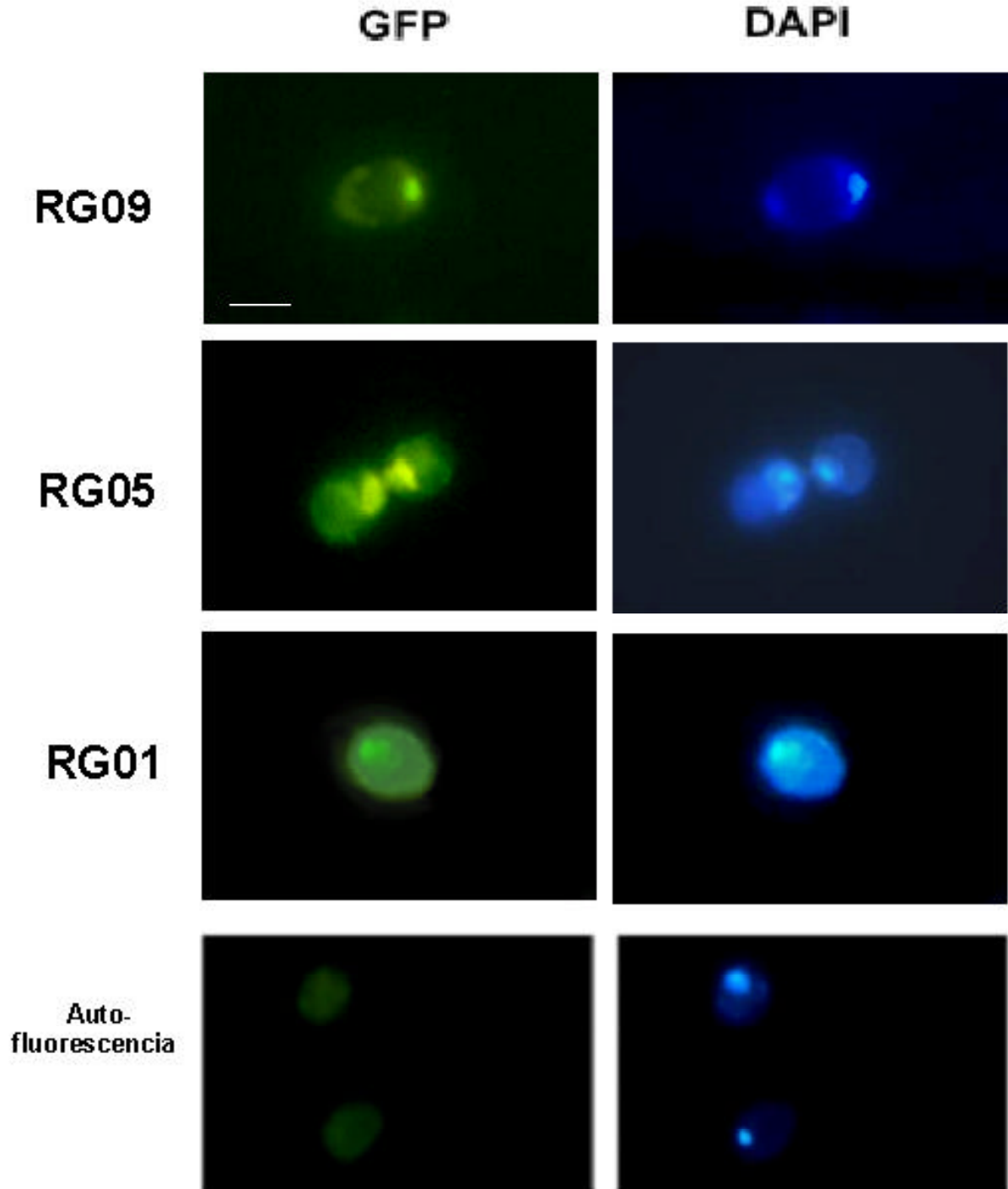


Figura 16. Localización subcelular de Bcy1p-GFP. Células levaduriformes de las cepas RG09, RG05 y RG01 expresando la construcción genómica *BCY1-GFP* crecidas en medio SD-Uri sólido, se analizaron por microscopía de fluorescencia directamente sin fijación. Los núcleos fueron teñidos por el agregado de DAPI 1 μ g/ml a la suspensión celular. Barra: 5 μ m.

Como se comentó en la Introducción, en *S. cerevisiae* la localización de R es dependiente de la fase de crecimiento y de la fuente de carbono utilizada. En células en fase estacionaria o crecidas en fuentes de carbono no fermentables, Bcy1p se encuentra distribuida tanto en núcleo como citoplasma (Griffioen y col., 2000). Nuestros resultados concuerdan con estos datos, ya que se puede observar que en *C. albicans* Bcy1p-GFP también se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma (panel izquierdo).

5. Capacidad germinativa de la cepa mutante *tpk2 BCY1/bcy1*

Como se comentó en la Introducción, resultados previos de nuestro laboratorio y de otros mostraron que ambas isoformas de la subunidad catalítica (Tpk1p y Tpk2p) tienen un efecto positivo en la inducción del crecimiento filamentoso de *C. albicans* (Castilla y col., 1998; Sonneborn y col., 2000; Bockmühl y col., 2001; Cloutier y col., 2003). Este dato permitía suponer que la ausencia de la subunidad R promovería la aparición de un fenotipo constitutivamente filamentoso en la doble mutante *tpk2 bcy1* debido a la presencia de subunidad C (Tpk1p) desregulada, independiente de la presencia de AMPc. Sin embargo se encontró que la doble mutante *tpk2 bcy1* en presencia de inductores como NAcGlc o suero es agerminativa, indicando que la carencia absoluta de regulación conlleva a un fenotipo incapaz de formar hifas verdaderas. (Cassola y col., 2004).

En este trabajo probamos que la PKA de la cepa *tpk2 BCY1/bcy1*, carente de uno de los alelos de *BCY1* es muy poco dependiente de AMPc, sugiriendo la existencia de C libre, por consiguiente procedimos a estudiar la capacidad germinativa de la mutante *tpk2 BCY1/bcy1*. Los ensayos se realizaron en medio Shepherd a 37°C utilizando como inductor NAcGlc.

Los resultados se muestran en la figura 17. Como puede observarse al tiempo cero, tanto la mutante *tpk2 BCY1/bcy1* como la cepa RG01 muestran una morfología heterogénea compuesta por una mezcla de células anormalmente grandes, reflejando un defecto en la regulación osmótica, y cadenas cortas de células alargadas y de forma aberrante. En cuanto a la formación de hifas verdaderas, este es un evento que se da en un porcentaje bajo de células, ya que una gran proporción de éstas generan pseudohifas e hifas engrosadas apicalmente (panel derecho, tiempo dos horas). RG01 no presentó otras alteraciones, demostrando que la fusión de GFP con la subunidad R no interfiere con la morfogénesis.

Se puede concluir que si bien la presencia de al menos uno de los alelos que codifican para la subunidad R es necesaria para que la célula pueda dar hifas verdaderas en presencia de un inductor, la desregulación de la PKA producida por la ausencia de un alelo da lugar a un fenotipo anormal y a una marcada tendencia al crecimiento pseudohifal.

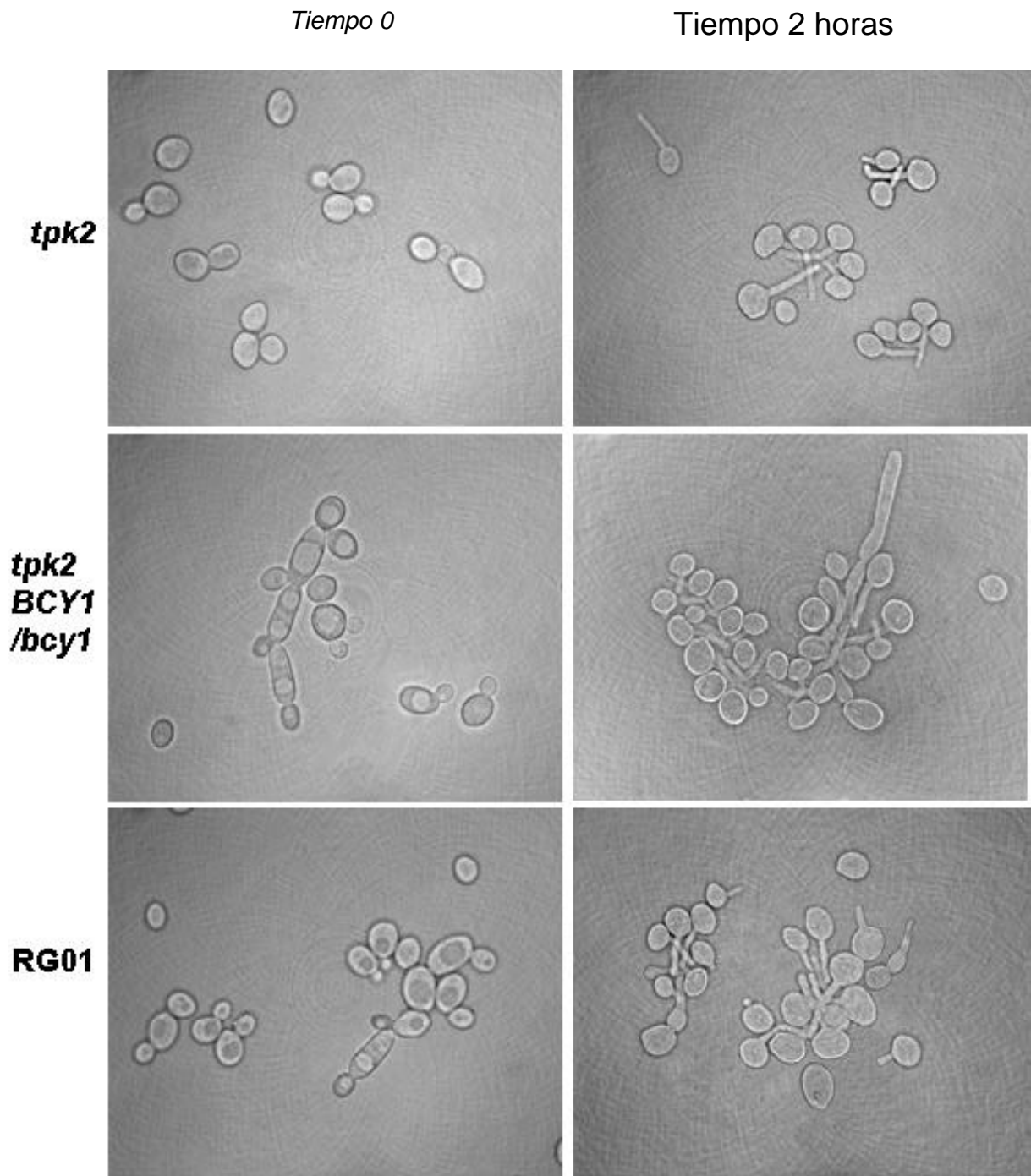


Figura 17. Comportamiento germinativo de las cepas *tpk2*, *tpk2 BCY1/bcy1* y RG01. Células provenientes de fase estacionaria fueron lavadas 2 veces con H₂O destilada y resuspendidas a una densidad de 2x10⁶ células/ml en medio Shepherd líquido en presencia del inductor NAcGlc 10 mM, e incubadas por 2 horas a 37° C. Las flechas señalan células con hifas emergentes.

En *Candida albicans* y en muchos otros hongos, el uso de mutantes deficientes en uno o más de los genes involucrados en una determinada ruta metabólica ha permitido investigar en detalle la función de cada uno de los componentes de la vía en estudio. Trabajos previos de nuestro y otros laboratorios demostraron que la PKA cumple un rol importante en la transición levadura-micelio (Niimi y col., 1996; Zelada y col., 1996; Castilla y col., 1998). En un trabajo reciente del laboratorio se demostró que una cepa mutante carente de R presenta un fenotipo agerminativo y una localización subcelular alterada de la subunidad catalítica (C) (Cassola y col., 2004). Por consiguiente, nos resultó de sumo interés investigar la localización subcelular de la subunidad regulatoria codificada por *BCY1*. Con este objetivo encaramos la fusión de GFP al gen *BCY1*. Hasta el momento se lograron tres nuevas cepas portadoras de la fusión: RG09, RG05 y RG01, que corresponden a los genotipos de las cepas mutantes *tpk1*, *tpk2* y *tpk2 BCY1/bcy1*.

La fusión genómica *BCY1*-GFP permitió la detección de una proteína de fusión de 92 kDa, capaz de ser inmunoprecipitada por un antisuero anti-R en todas las cepas transformadas. Es importante destacar que los ensayos de Western blot nos permitieron visualizar tanto a la proteína de fusión Bcy1-GFP como a la proteína normal en las cepas RG09 y RG05, en las cuales solo uno de los alelos del gen *BCY1* lleva la fusión, indicando que ambos alelos que codifican para la subunidad R se expresan. Los niveles de R en la cepa mutante *tpk2 BCY1/bcy1* (carente de un alelo de *BCY1*) fueron significativamente inferiores comparados con los de la cepa original *tpk2*, indicando que la expresión de esta proteína se correlaciona con el número de alelos presentes en la célula. Los niveles de R detectados en la cepa RG01 resultaron aún menores. Se podría pensar que la fusión dificulta la expresión de la subunidad R modificada, o bien que el mensajero de esta proteína artificial es más inestable y/o que la proteína quimera es más susceptible a la degradación.

Se observó una muy baja dependencia de AMPc de la actividad de quinasa en las cepas *tpk2 BCY1/bcy1* y RG01, comparada con la de la cepa original *tpk2*, en coincidencia con los niveles de R, sugiriendo que la ausencia de uno de los alelos genera un aumento en la proporción de subunidad catalítica libre.

Como se comentó en la Introducción, la subunidad regulatoria de *C. albicans* es de tipo II, por lo tanto es fosforilada por C en una reacción intramolecular que no requiere de AMPc. Mediante un ensayo de fosforilación intramolecular de R en inmunoprecipitados observamos que la ausencia de un alelo de *BCY1* (*tpk2 BCY1/bcy1*) se tradujo en un patrón de fosforilación sensiblemente menor comparado con el de la cepa original *tpk2*. Estos datos concuerdan con el hecho de que la expresión de R y la dependencia de AMPc es menor en la cepa mutante *tpk2 BCY1/bcy1*, reforzando la idea de la existencia de una mayor proporción de C que no forma parte de la holoenzima. En el caso del clon RG01 la proteína de fusión no parece haber sido fosforilada, sugiriendo que la fusión con GFP podría interferir en la interacción de R con C.

En células eucariotas, la existencia de varias vías de señalización en las cuales está involucrada la PKA lleva a la pregunta de cómo se logra la fosforilación sendero-específica de los sustratos. Como se comentó en la introducción, en eucariotas superiores la especificidad está dada en parte por la compartimentalización de la PKA en diferentes ubicaciones subcelulares a través de su interacción con proteínas de anclaje (AKAPs). Estas proteínas interaccionan con las subunidades R de la PKA y mantienen a la holoenzima en sitios discretos dentro de la célula (ver Feliciello y col., 2001). Hasta el momento no se han identificado AKAPs en eucariotas unicelulares.

La localización nuclear de R fue demostrada previamente en *S. cerevisiae* en células en fase logarítmica, así como también la distribución nuclear y citoplasmática en el estadio estacionario (Griffioen y col., 2000). Los resultados de microscopía de fluorescencia presentados en este trabajo coinciden con las observaciones hechas en *S. cerevisiae*, ya que la proteína de fusión de *C. albicans*, también se encuentra distribuida en núcleo y en citoplasma en el estadio estacionario.

Está ampliamente aceptado que la localización de R podría ser un mecanismo de anclaje de la PKA, contribuyendo así a la especificidad de esta quinasa. En el caso de *C. albicans* el análisis de secuencia de las subunidades de la PKA (Tpk1p, Tpk2p y Bcy1p) no mostró ninguna señal consenso de localización nuclear o de exportación nuclear. Sin embargo no podemos descartar la posible existencia de otra(s) proteína(s) con la capacidad de localizar a la PKA dentro de la célula a través de su interacción con la subunidad R o de modificaciones post-traduccionales de la misma como fosforilaciones, ya que se ha informado que en *S. cerevisiae* la localización nuclear de Bcy1p está a su vez modulada por la fosforilación de su extremo N-terminal por la quinasa Yak1p (Griffioen y col., 2001). La búsqueda en la base de datos Prosite indica que la subunidad R de la PKA de *C. albicans* posee sitios adicionales de fosforilación por otras quinasas (Zelada y col., 2002). Todos estos resultados sugieren que la subunidad R podría cumplir un rol fundamental regulando no solo la actividad enzimática sino también la disponibilidad de la PKA en el núcleo o en el citoplasma dependiendo de sus propias modificaciones. En este sentido es importante señalar, que en un trabajo del laboratorio se demostró que la ausencia de proteína R causa la deslocalización de la subunidad catalítica (Cassola y col., 2004).

Evidencia proveniente de nuestro y otros laboratorios indican que las isoformas Tpk1p y Tpk2p de la PKA juegan un rol positivo en la filamentación de *C. albicans* (Castilla y col., 1998; Sonnerborn y col., 2000; Bockmühl y col., 2001; Cloutier y col., 2003). Estos resultados indican que células con una subunidad catalítica constitutivamente activa deberían presentar un fenotipo germinativo aún en ausencia de inductores, sin embargo, en nuestro laboratorio se encontró que la doble mutante *tpk2 bcy1*, carente de ambos alelos de *BCY1* resultó agerminativa en presencia de NAcGlc o suero (Cassola y col., 2004). En nuestro caso, el análisis de la capacidad germinativa de la cepa mutante *tpk2 BCY1/bcy1* mostró que la presencia de al menos uno de los alelos que codifican para la subunidad R es necesario para que la célula levaduriforme germine y genere hifas verdaderas, aunque estas últimas son minoritarias en comparación a la gran proporción de pseudohifas y de hifas engrosadas apicalmente. Es importante señalar que las células levaduriformes de esta cepa están agrandadas y no presentan la estructura ovoide característica. La cepa RG01 comparte estas características, sin presentar otras alteraciones significativas. Estos resultados indican que la proteína de fusión no modifica apreciablemente el fenotipo de estas células y que los niveles de R, aún menores que los detectados en la cepa que le dio origen, son suficientes para que la célula produzca hifas verdaderas, aunque el fenotipo germinativo no sea el normal. Es posible que la eliminación de un alelo de R no solamente conduzca a una actividad de PKA parcialmente desregulada, sino que además promueva una deslocalización de la subunidad catalítica, la cual contribuiría al defecto en la germinación.

Bibliografía

- Anderson ML, Odds FC. Adherence of *Candida albicans* to vaginal epithelia: significance of morphological form and effect of ketoconazole. 1985. *Mykosen*. 8(11):531-40
- Bockmühl DP, Ernst JF. A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. 2001. *Genetics*. 157: 1523-1530.
- Bockmühl DP, Krishnamurthy S, Gerads M, Sonnerborn A, Ernst JF. Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. 2001. *Mol. Microbiol.* 42(5):1243-57
- Borrelli E, Montmayeur JP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Signal transduction and gene control: the cAMP pathway. 1992. *Crit. Rev. Oncog.* 3(4):321-38
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 1976. *Anal. Biochem.* 72: 248-354.
- Braun BR, Johnson AD. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. 1997. *Science*. 277(5322):105-9
- Braun BR, Johnson AD. TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. 2000. *Genetics*. 155(1):57-67
- Brown AJ, Gow NA. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. 1999. *Trends Microbiol.* 7(8):333-338
- Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Bishop SM, Acott TS, Brennan RG, Scott JD. Interaction of the regulatory subunit (R1I) of cAMP-dependent protein kinase with R1I-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. 1991. *J. Biol. Chem.* 266, 14188-14192
- Cassola A, Parrot M, Silberstein S, Magee BB, Passeron S, Giasson L, Cantore ML. *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. 2004. *Eukaryotic Cell.* 3 (1): 190-199
- Castilla R, Passeron S, Cantore ML. N-Acetyl-D-glucosamine induces germination in *Candida albicans* through a mechanism sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. 1998. *Cell. Signal.* 10:713-719
- Clark KL, Feldmann PJ, Dignard D, Larocque R, Brown AJ, Lee MG, Thomas DY, Whiteway M. Constitutive activation of the *Saccharomyces cerevisiae* mating response pathway by a MAP kinase kinase from *Candida albicans*. 1995. *Mol. Gen. Genet.* 249(6):609-21
- Cloutier M, Castilla R, Bolduc N, Zelada A, Martineau P, Bouillon M, Magee BB, Passeron S, Giasson L, Cantore ML. The two isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit are involved in the control of dimorphism in the human fungal pathogen *Candida albicans*. 2003. *Fungal Genet. Biol.* 38(1):133-141
- Colledge M, Scott JD. AKAPs: from structure to function. 1999. *Trends Cell Biol.* 9(6):216-21
- Csank C, Makris C, Meloche S, Schroppel K, Rollinghoff M, Dignard D, Thomas D, Whiteway M. Derepressed Hyphal Growth and Reduced Virulence in a VH1 Family-related Protein Phosphatase Mutant of the Human Pathogen *Candida albicans*. 1997. *Mol. Biol. Cell* 8, 2539-2551.

- Dandekar S, Modi VV. Involvement of cyclic AMP in carotenogenesis and cell differentiation in *Blakeslea trispora*. 1980. Biochim. Biophys. Acta. 628(4):398-406
- Davis D, Wilson RB, Mitchell AP. RIM101-dependent and -independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. 2000. Mol. Cell Biol. 20:971-978.
- Dodge K, Scott JD. AKAP79 and the evolution of AKAP model. 2000. FEBS Letters. 476:58-61.
- Doi K, Gartner A, Ammerer G, Errede B, Shinkawa H, Sugimoto K, Matsumoto K. MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. 1994. EMBO J. 13(1):61-70
- Edwards AS, Scott JD. A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. 2000. Curr. Opin. Cell Biol. 12:217-221.
- Egidy G, Paveto C, Passeron S, Galvagno MA. cAMP levels and in situ measurements of cAMP related enzymes during yeast-to-hyphae transition in *Candida albicans*. 1990. Cell. Biol. Int. Rep. 14: 59-68.
- El Barkani A, Kurzai O, Fonzi WA, Ramon A, Porta A, Frosch M, Muhlschlegel FA. Dominant active alleles of RIM101 (PRR2) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. 2000. Mol. Cell Biol. 20:4635-4647.
- Ernst JF. Transcription factors in *Candida albicans* —environmental control of morphogenesis. 2000. Microbiology. 146:1763-1774.
- Evans EG, Odds FC, Richardson MD, Holland KT. Optimum conditions for initiation of filamentation in *Candida albicans*. 1975. Can. J. Microbiol. 21(3):338-42
- Fantozzi DA, Taylor SS, Howard PW, Maurer RA, Feramisco JR, Meinkoth JL. Effect of the thermostable protein kinase inhibitor on intracellular localization of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. 1992. J. Biol. Chem. 267(24):16824-8
- Feliciello A, Gottesman ME, Avvedimento EV. The biological functions of A-kinase anchor proteins. 2001. J. Mol. Biol. 308(2):99-114
- Feng Q, Summers E, Guo B, Fink G. Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. 1999. J Bacteriol. 181(20):6339-46.
- Fimia GM, Sassone-Corsi P. Cyclic AMP signalling.** 2001. J. Cell Sci. 114: 1971-1972
- Fonzi WA, Irwin MY. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. 1993. Genetics. 134(3):717-28
- Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J, Hostetter MK. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. 1998. Science. 279 (5355):1355-8
- Gerami-Nejad M, Berman J, Gale CA. Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans*. 2001. Yeast. 18: 859-864.
- Gilman. AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. 1987. Annu. Rev. Biochem. 56:615-49
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. 1992. Cell. 68(6):1077-90
- Gorman JA, Chan W, Gorman JW. Repeated use of GAL1 for gene disruption in *Candida albicans*. 1991. Genetics. 129(1):19-24
- Griffioen G, Anghileri P, Imre E, Baroni M, Ruis H. Nutritional Control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. 2000. J. Biol. Chem. 275: 1449-1456.
- Griffioen G, Branduardi P, Ballarini A, Anghileri P, Norbeck J, Baroni MD, Ruis H. Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. 2001. Mol. Cell. Biol. 21(2):511-23
- Griffioen G, Thevelein JM. Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. 2002. Curr. Genet. 41(4):199-207
- Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R, Montminy MR. Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. 1993. Mol. Cell. Biol. 13(8):4852-9
- Hausken ZE, Dell'Acqua ML, Coghlan VM, Scott JD. Mutational analysis of the A-kinase anchoring protein (AKAP)-binding site on RII. Classification of side chain determinants for anchoring and isoform selective association with AKAPs. 1996. J. Biol. Chem. 271: 29016-29022.
- Hohl N, Galland P, Senger H. Altered pterin patterns in photobehavioral mutants of *Phycomyces blakesleeanus*. 1992. Photochem. Photobiol. 55(2):239-45
- Joshi KR, Solanki A, Prakash P. Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and corn meal agar with and without Tween-80. 1993. Indian J. Pathol. Microbiol. 36(1): 48-52.

- Kalo-Klein, A. Y Witkins, S. 1990. *Infect. Immun.* 58: 260-262.
- Kataoka T, Broek D, Wigler M. DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. 1985. *Cell.* 43(2 Pt 1):493-505
- Kemp BE, Graves DJ, Benjamini E, Krebs EG. Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. 1977. *J. Biol. Chem.* 252(14):4888-94
- Kimura LH, Pearsall NN. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. 1978. *Infect. Immun.* 21(1): 64-8
- Kobayashi SD, Cutler JE. *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? 1998. *Trends Microbiol.* 6(3): 92-4
- Kohler JR, Fink GR. *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93(23):13223-8
- Kronstad J, De Maria A, Funnel D, Laidlaw RD, Lee N, Moniz de Sá M, Ramesh M. Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. 1998. *Arch. Microbiol.* 170: 395-404.
- Kurtz MB, Marrinan J. Isolation of hem3 mutants from *Candida albicans* by sequential gene disruption. 1989. *Mol. Gen. Genet.* 217(1):47-52
- Kurtz MB, Kelly R, Kirsch DR. Molecular genetics of *Candida albicans*. 1990. in *The genetics of Candida* pp. 21-74, edited by Kirsch, D. R., Kelly, R., y Kurtz, M. B. CRC Press, Boca raton, Fla.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. 1970. *Nature.* 227: 680-685.
- Land GA, McDonald WC, Stjernholm RL, Friedman TL. Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: relationship of the uptake and distribution of proline to morphogenesis. 1975. *Infect Immun.* 11(5): 1014-23
- Leberer E, Harcus D, Broadbent ID, Clark KL, Dignard D, Ziegelbauer K, Schmidt A, Gow NAR, Brown AJP, Thomas DY. Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:13217-13222.
- Leberer E, Ziegelbauer K, Schmidt A, Harcus D, Dignard D, Ash J, Johnson L, Thomas DY. Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCla4p. 1997. *Curr. Biol.* 7(8):539-46
- Leberer E, Harcus D, Dignard D, Johnson L, Ushinsky S, Thomas DY, Schroppel K. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. 2001. *Mol. Microbiol.* 42(3):673-87
- Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. 2000. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4):746-85.
- Liu H, Kohler J, Fink GR. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. 1994. *Science.* 266:1723-1726.
- Liu H. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. 2001. *Curr. Opin. Microbiol.* 4(6):728-35.
- Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. 1997. *Cell.* 90(5):939-49
- Loose, d.; Schurman, D. Y Feldman, D. 1981. *Nature* 293: 477-
- Lowry OH, Rsenbrough H, Farr AI, Randall R. Protein measurements with the phenol reagent. 1951. *J Biol Chem.* 193: 265-275
- Madhani HD, Styles CA, Fink GR. MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. 1997. *Cell.* 91:673-684.
- Madhani HD, Fink GR. The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. 1998. *Trends. Cell. Biol.* 8: 348-353.
- Meinkoth JL, Alberts AS, Went W, Fantozzi D, Taylor SS, Hagiwara M, Montminy M, Feramisco JR. Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. 1993. *Mol. Cell. Biochem.* 127-128:179-86
- Mosch HU, Roberts RL, Fink GR. Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93(11):5352-6
- Nigg EA. Mechanisms of signal transduction to the cell nucleus. 1990. *Adv. Cancer. Res.* 55:271-310
- Niimi M, Niimi K, Tokunaga J, Nakayama H. Changes in cyclic nucleotide levels and dimorphic transition in *Candida albicans*. 1980. *J. Bacteriol.* 142(3):1010-4

- Niimi M. Dibutyryl cyclicAMP-enhanced germ tube formation in exponentially growing *Candida albicans* cells. 1996. Fungal Genet. Biol. 20: 79-83.
- Odds, *Candida* y candidosis. 1988. 2nd edn Baillere Tindall, London.
- Pan X, Heitman J. Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. 1999. Mol. Cell. Biol. 19: 4874-4887.
- Paveto, C.; Mallo, G; Egidy, G; Galvagno, M y Passeron, S. 1990. Biochem. Biophys. Res. Comm. 167: 1177-1183.
- Paveto, C.; Montero, L y Passeron, S. 1992. FEBS 311: 51-54.
- Pla J, Gil C, Monteoliva L, Navarro-Garcia F, Sanchez M, Nombela C. Understanding *Candida albicans* at the molecular level. 1996. Yeast. 12(16):1677-702
- Pollack JH, Hashimoto T. The role of glucose in the pH regulation of germ-tube formation in *Candida albicans*. 1987. J. Gen. Microbiol. 133 (Pt 2):415-24
- Porta A, Ramon AM, Fonzi WA. PRR1, a homolog of *Aspergillus nidulans* palF, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. 1999. J. Bacteriol. 181:7516-7523.
- Ramon A, Porta A, Fonzi WA. Effects of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. 1999. J. Bacteriol. 181:7524-7530.
- Riggle PJ, Andrutis KA, Chen X, Tzipori SR, Kumamoto CA. Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. 1999. Infect. Immun. 67(7):3649-52.
- Robertson LS, Fink GR. The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 95 13783-87.
- Rocha CR, Schroppe K, Harcus D, Marcil A, Dignard D, Taylor BN, Thomas DY, Whiteway M, Leberer E. Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. 2001. Mol. Biol. Cell. 12(11):3631-43
- Roskoski R. Assay of protein kinase. In: Methods in Enzimology. 1983. Corbin, J. D., & Hardman, J. G., (ed.), 99, pp. 3-6, Academic Press, San Diego.
- Rubin C, Erlichman J y Rosen O. 1974. Methods in Enzimology. 119: 147-156.
- Sabie FT, Gadd GM. Effect of nucleosides and nucleotides and the relationship between cellular adenosine 3':5'-cyclic monophosphate cyclic AMP and germ tube formation in *Candida albicans*. 1992. Mycopathologia. 119: 147-156.
- Sanchez-Martinez C, Perez-Martin J. Gpa2, a G-Protein alpha Subunit Required for Hyphal Development in *Candida albicans*. 2002. Eukaryot. Cell. 1(6):865-74
- Santos MA, Perreau VM, Tuite MF. Transfer RNA structural change is a key element in the reassignment of the CUG codon in *Candida albicans*. 1996. EMBO J. 15(18):5060-8
- Shepherd MG, Yin CY, Ram SP, Sullivan PA. Germ tube induction in *Candida albicans*. 1980. Mol. Microbiol. 35: 386-396.
- Sherman F, Fink GR, Hicks JB. Methods in Yeast genetics, 1983. pp. 61-62, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor, NY.
- Simonetti N, Strippoli V, Cassone A. Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. 1974. Nature. 250 (464):344-6
- Skalhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. 2000. Front. Biosci. 5:D678-93
- Skowronski, R y Feldman, D. 1989. Endocrinology 124 (4): 1965-1972.
- Smith CB. Candidiasis: pathogenesis, host resistance and predisposing factors. 1985
In: Bodey, G. P., Fainstein, V. (eds). Candidiasis. Pp. 53-70. Raven Press, New York.
- Smith A, Ward MP, Garrett S. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. 1998. EMBO J. 17(13):3556-64
- Sonneborn A, Bockmuhl DP, Ernst JF. Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. 1999. Infect. Immun. 67(10):5514-7
- Sonneborn A, Bockmühl DP, Gerards M, Kurpanek K, Sanglard D, Ernst, JF. Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. 2000. Mol. Microbiol. 35:386-396.
- Srivastava RK, Lee YN, Noguchi K, Park YG, Ellis MJ, Jeong JS, Kim SN, Cho-Chung YS. The RIIbeta regulatory subunit of protein kinase A binds to cAMP response element: an alternative cAMP signaling pathway. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 95(12):6687-92
- Stewart PR, Rogers PJ. «The filamentous fungi». 1978. Vol. 3, Cap. 9. Eds. Smith y Berry. Pag. 456.

Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. 1997. *EMBO J.* 16(8):1982-91

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

Thevelein JM, Cauwenberg L, Colombo S, De Winde JH, Donation M, Dumortier F, Kraakman L, Lemaire K, Ma P, Nauwelaers D, Rolland F, Teunissen A, Van Dijck P, Versele M, Wera S, Winderickx J. Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. 2000. *Enzyme. Microb. Technol.* 26(9-10):819-825

Toda T, Uno I, Ishikawa T, Powers S, Kataoka T, Broek D, Cameron S, Broach J, Matsumoto K, Wigler M. In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylyl cyclase. 1985. *Cell.* 40(1):27-36

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(4):1371-7

Ushinsky SC, Marcus D, Ash J, Dignard D, Marcil A, Morschhauser J, Thomas DY, Whiteway M, Leberer E. CDC42 is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. 2002. *Eukaryot. Cell.* 1(1):95-104

Wendland J. Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. 2001. *Fungal Genet. Biol.* 34(2):63-82

Whiteway M, Dignard D, Thomas DY. Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(20):9410-4

Whiteway M, Csank C, Thomas DY. Dominant negative selection of heterologous genes in yeast. 1993. *Methods.* 5:110-115

Wilson RB, Davis D, Mitchell AP. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. 1999. *J. Bacteriol.* 181(6):1868-74

Zelada A, Castilla R, Passeron S, Cantore ML. Reassessment of the effect of glucagon and nucleotides on germ tube formation in *Candida albicans*. 1996. *Cell. Mol. Biol.*, 42: 567-576

Zelada A, Passeron S, Lopez Gomes S, Cantore, ML. Isolation and characterization of cAMP-dependent protein kinase from *Candida albicans*. Purification of the regulatory and catalytic subunits. 1998. *Eur. J. Biochem.*, 252: 254-252

Zelada A, Castilla R, Passeron S, Giasson L, Cantore ML. Interactions between regulatory and catalytic subunits of the *Candida albicans* cAMP-dependent protein kinase are modulated by autophosphorylation of the regulatory subunit. 2002. *Biochim. Biophys. Acta.* 1542(1-3):73-81