

Tesis de Posgrado

Purificación y estudio de las características estructurales, cinéticas y regulatorias de la pep-carboxiquinasa del *Trypanosoma cruzi*

Cymeryng, Cora Beatriz

1991

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

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

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

Cita tipo APA:

Cymeryng, Cora Beatriz. (1991). Purificación y estudio de las características estructurales, cinéticas y regulatorias de la pep-carboxiquinasa del *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2430_Cymeryng.pdf

Cita tipo Chicago:

Cymeryng, Cora Beatriz. "Purificación y estudio de las características estructurales, cinéticas y regulatorias de la pep-carboxiquinasa del *Trypanosoma cruzi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2430_Cymeryng.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

PURIFICACION Y ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES,
CINETICAS Y REGULATORIAS DE LA PEP-CARBOXIQUINASA DEL
TRYPANOSOMA CRUZI

AUTOR: Cora Beatriz Cymeryng

DIRECTOR: Dr. Joaquín Juan Bautista Cannata

LUGAR DE TRABAJO: Departamento de Bioquímica. Facultad
de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Tesis presentada para optar al Título de
Doctor en Ciencias Químicas

Año 1991

Tesis
2430
g. 2

A mis padres.

Agradecimientos

Al Dr J.J.B. Cannata por haberme introducido en las complejidades de la investigación científica y por haberme enseñado la meticulosidad y rigurosidad del trabajo de laboratorio.

Al Dr J.J. Cazzulo quién me brindó incondicionalmente su amplio conocimiento en el área de la parasitología y me guió en la realización de parte de este estudio.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad de Buenos Aires que me otorgaron apoyo económico para la realización de los estudios que aquí se describen.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires por haberme permitido utilizar sus instalaciones.

A la Dra Berta Franke de Cazzulo por su colaboración en el cultivo de parásitos, a las Lic Alejandra Raimondi y Patricia Dominguez por los experimentos de FPLC y a la Sra Dora Beatti por los estudios de análisis de aminoácidos.

A Cristina Paz, Fabiana Cornejo, Nicolás Wisniacki y Pablo Cymeryng por haber colaborado en la corrección, confección de figuras e "informatización" de este manuscrito.

A los "vecinos del laboratorio de enfrente" con los que he compartido gratos momentos de trabajo y camaradería.

A Ruth Rosenstein, por haber ejercido su capacidad crítica sobre este trabajo y por su amistad, que perdura a pesar de ello.

ABREVIATURAS

ADP y ATP: adenosina di y trifosfato

CDP y CTP: citidina di y trifosfato

GDP y GTP: guanosina di y trifosfato

IDP e ITP: inosina di y trifosfato

TDP y TTP: timidina di y trifosfato

UDP y UTP: uridina di y trifosfato

CMS: p-cloro mercurifenil sulfonato

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)

IAm: iodoacetamida

IBz: iodobenzoato

FMA: fluoresceín mercuriacetato

NEM: N-etilmaleimida

PCMB: p-cloro mercuribenzoato

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilén diamino tetraacético

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)

OA: ácido oxaloacético

PEP: fosfoenolpiruvato

MDH: enzima málico deshidrogenasa

LDH: enzima láctico deshidrogenasa

3PGA: ácido 3-fosfoglicérico

G3P: gliceraldehido 3-fosfato

DHAP: dihidroxiacetona fosfato

glu 6P: glucosa 6-fosfato

fru 6P: fructosa 6-fosfato

fru 1,6 diP: fructosa 1,6-difosfato

G 1,3 diP: ácido 1,3-difosfoglicérico

2PGA: ácido 2-fosfoglicérico

pir: piruvato

L-mal: L-malato

fum: fumarato

succ CoA: succinil CoA

alfa-OG: alfa-oxoglutarato

isocit: isocitrato

cit: citrato

:L-glu: glutamato

ala: alanina

E-64: trans-epoxysuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino)
butano

TLCK: Na-p-tosil-L-lisina clorometil cetona

PMSF: fenil metil-sulfonil fluoruro

PEPCK: FOSFOENOL PIRUVATO CARBOXIQUINASA

INDICE

	Pag. N°
INTRODUCCION.....	1
1.Biología del <u>T. cruzi</u>.....	1
1.1.Generalidades.....	1
1.2.Ubicación sistemática.....	2
1.3.Ciclo de vida.....	3
2.Metabolismo energético en el <u>T.cruzi</u>.....	7
2.1.Utilización de nutrientes.....	7
2.2.Transporte de nutrientes.....	9
2.3.Catabolismo de carbohidratos: la "fermentación aeróbica".....	9
2.3.1.Productos finales del catabolismo de los glúcidos.....	9
2.3.2.Vías catabólicas.....	12
2.3.2.1.Glucólisis.....	12
2.3.2.2.Vía de las pentosas.....	14
2.3.2.3.Ciclo de los ácidos tricarbóxicos.	15
2.3.3.Sistemas de reoxidación del NADH glicolítico	15
2.3.3.1.Producción de succinato.....	16
2.3.3.2.Producción de L-alanina.....	21
2.3.3.3.Oxidación en la cadena respiratoria.	22
2.3.4.Sistemas de lanzaderas.....	25
2.4.Compartamentalización subcelular y regulación del catabolismo glucídico.....	31
2.5.Compartamentalización de la "fermentación aeróbica"	35

3.La enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.....	38
3.1.Consideraciones generales.....	38
3.2.Reacciones catalizadas por la PEPCK.....	40
3.2.1.Formación de OA o PEP.....	40
3.2.2.Formación de piruvato a partir de OA.....	41
3.3.Propiedades generales de las PEPCK.....	44
3.3.1.Especificidad de nucleótido.....	44
3.3.2.Requerimiento de catión divalente.....	44
3.3.3.Efecto de los reactivos de tioles.....	47
3.3.4.Regulación.....	48
MATERIALES Y METODOS.....	52
1.Organismo.....	52
2.Reactivos.....	52
2.1.Drogas.....	52
2.2.Enzimas.....	53
3.Método de purificación.....	54
3.1.Cultivo del parásito.....	54
3.2.Obtención del extracto crudo.....	55
3.3.Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	56
4.Determinación de la actividad enzimática de la PEPCK..	56
4.1.Reacción de carboxilación.....	57
4.2.Reacción de formación de PEP.....	58
4.3.Reacción de intercambio.....	59

5.Determinación de la actividad oxaloacético decarboxilásica.....	60
6.Determinación de la concentración de proteínas.....	61
7.Determinación de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la PEPCK.....	62
7.1.Coeficiente de Sedimentación (M. de Martin y Ames)	62
7.1.1.Determinación de la posición de las proteí- nas marcadoras en los gradientes de sacarosa	63
7.2.Radio de Stokes y coeficiente de difusión libre (M. de Ackers). Peso molecular de la enzima nativa (M. de Andrews).....	64
7.3.Análisis de aminoácidos.....	67
7.4.Composición en aminoácidos y volumen parcial es- pecífico.....	68
7.5.Peso molecular de la enzima nativa (Ec. de Svedberg) y cociente friccional.....	68
8.Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	69
9.Cromatoenfocado.....	71
10.Cromatografía líquida rápida para proteínas.....	71
11.Determinación de actividad proteolítica.....	72
12.Cálculo de las concentraciones reales del complejo catión-nucleótido, nucleótido libre y catión libre....	73

RESULTADOS.....	76
1.Método de purificación.....	76
1.1.Cromatografía en columna de Sephadex G-200.....	76
1.2.Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	78
1.3.Cromatografía en columna de hidroxilapatita.....	81
1.4.Cromatografía en columna de ATP-agarosa.....	83
1.5.Criterio de pureza.....	86
2.Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la PEPCK...	88
2.1.Coeficiente de sedimentación (M. de Martin y Ames)	88
2.2.Radio de Stokes y coeficiente de difusión libre (M. de Ackers). Peso molecular de la enzima nativa (M. de Andrews).....	88
2.3.Composición en aminoácidos y volumen parcial específico.....	91
2.4.Determinación del peso molecular de la enzima nativa utilizando el volumen parcial específico, el coeficiente de sedimentación y el coeficiente de difusión libre (Ec. de Svedberg). Cociente friccional.....	94
2.5.Determinación del peso molecular de la subunidad..	94
2.6.Determinación del punto isoeléctrico.....	95
3.Características cinéticas.....	99
3.1.Dependencia de la actividad enzimática con el pH..	99
3.2.Acción de los nucleótidos.....	102

3.2.1. Especificidad.....	102
3.2.2. Efecto inhibitorio.....	102
3.3. Requerimiento de catión divalente.....	108
3.4. Determinación de los parámetros cinéticos.....	124
4. Carácter histerético.....	137
4.1. Efecto de sales y de DTT sobre el carácter histerético.....	141
4.2. Acción del NAD^+ y NADH sobre la actividad enzimática.....	148
5. Efecto del quinolinato sobre la actividad de la PEPCK.	151
6. Efecto de los reactivos de grupos sulfhidrilos.....	156
7. Investigación de la presencia de isoenzimas y de los posibles efectos de proteasas sobre la PEPCK del <u>T. cruzi</u>	167
8. Actividad Oxaloacético Decarboxilásica asociada a la PEPCK.....	181
9. Posible existencia de otra proteína con actividad oxaloacético decarboxilásica no asociada a la PEPCK en el <u>T. cruzi</u>	190
DISCUSION.....	202
RESUMEN.....	225
BIBLIOGRAFIA.....	230

INTRODUCCION

1. Biología del T. cruzi

1.1. Generalidades

Evaluaciones recientes indican que la enfermedad de Chagas afecta, con carácter endémico, a no menos de tres millones de personas, sólo en nuestro país y por lo tanto su estudio revista gran importancia desde el punto de vista sanitario. El agente causal de esta enfermedad es el Trypanosoma cruzi.

Si bien existen muchos grupos de investigación abocados al estudio de este parásito y de las consecuencias que su infección provoca en el hombre, aún no se dispone de un tratamiento satisfactorio para esta enfermedad. Sin embargo en los últimos tiempos se han hecho grandes progresos en los estudios de bioquímica básica, biología molecular e inmunología y es de esperar que éstos permitan conseguir un tratamiento eficaz para la cura de la enfermedad.

En este contexto, el presente trabajo de tesis fué encarado como una contribución al mejor conocimiento del metabolismo de éste parásito con el fin de poder establecer características diferenciales con respecto al de su hospedador mamífero. Estos hallazgos podrían permitir el desarrollo de agentes quimioterápicos selectivos que no afectaran a los organismos infectados.

1.2. Ubicación sistemática

El T. cruzi es un protozoo cuya ubicación taxonómica es la siguiente (Levine et al, 1980):

Phylum Sarcomastigophora: Su locomoción se realiza por medio de flagelos y/o pseudopodios. Posee un único tipo de núcleo.

Subphylum Mastigophora: Presentan un pequeño número de flagelos, se reproducen por fisión binaria y en algunos grupos por reproducción sexual.

Clase Zoomastigophorea: Sin cloroplastos, con uno o varios flagelos; reproducción sexual conocida en pocos grupos; grupo prolífico.

Orden Kinetoplastida: Tienen de uno a cuatro flagelos que emergen de una depresión, una única mitocondria que se extiende por toda la célula semejando un tubo o una red de tubos y generalmente poseen una organela autorreplicante que es en realidad una prolongación capsular de la mitocondria, denominada kinetoplasto. El aparato de Golgi está ubicado en la zona de la depresión flagelar. Hay especies parásitas y otras de vida libre.

Suborden Trypanosomatina: Poseen un solo flagelo, libre o con membrana ondulante, el kinetoplasto es pequeño y compacto. Son parásitos.

Familia Trypanosomatidae: En esta familia encontramos varios géneros monogénéticos (es decir, con un solo hospedador): Blastocrithidia, Crithidia, Leptomonas y Herpetomonas, todos parásitos de invertebrados y otros

digenéticos (con más de un hospedador) como *Leishmania* y *Trypanosoma* que alternan un huésped vertebrado y otro invertebrado.

Género Trypanosoma: se divide en dos grandes grupos según el sitio de producción de tripomastigotes metacíclicos en el insecto vector y el consecuente método de infección en el huésped vertebrado (Hoare, 1964).

Sección Salivaria: Incluye tripanosomas cuyo ciclo de desarrollo en el vector invertebrado se completa en las glándulas salivales del insecto. Se transmite por inoculación mediante la picadura del insecto. Ejemplos: Trypanosoma brucei, Trypanosoma congolense.

Sección estercoraria: Comprende tripanosomas que completan su desarrollo en la región posterior del tubo digestivo del vector. Se transmiten por contaminación a través de las heces del insecto. Ejemplo: Trypanosoma cruzi, Trypanosoma lewisi. La única especie de este grupo patógena para el hombre es el Trypanosoma cruzi.

1.3. Ciclo de vida del T.cruzi

El Trypanosoma cruzi es un parásito digenético y se ha encontrado una variedad de insectos hematófagos vectores, como el Triatoma infestans (vinchuca) y huéspedes mamíferos, como el hombre.

El vector se infecta por ingestión de los parásitos presentes en la sangre periférica de un mamífero

infectado. Al ser ingerido por el insecto el parásito sufre transformaciones morfológicas que lo convierten en una forma denominada **epimastigote**, que se encuentra en el intestino del vector y que dado que presenta una activa división es capaz de mantener indefinidamente la infección en el insecto vector (figura 1).

La forma **epimastigote** es alargada, con flagelo libre, el kinetoplasto está situado anteriormente con respecto al núcleo y se multiplica por fisión binaria.

En la ampolla rectal del insecto los **epimastigotes** se diferencian a **tripomastigotes metacíclicos**, una forma muy similar a la que se encuentra en la sangre del huésped vertebrado y que es infectiva para éste. También es alargado, pero más delgado y móvil que el **epimastigote**. Presenta membrana ondulante, flagelo libre anterior, kinetoplasto posterior al núcleo y es incapaz de dividirse.

Se ha descrito también la existencia de otra forma en el intestino del insecto vector que se denominó **esferomastigote**, una forma redondeada y provista de flagelo que provendría de los **tripomastigotes sanguíneos** y daría lugar a los **tripomastigotes metacíclicos** o a los **epimastigotes** (Brack, 1968).

El insecto infectado se alimenta de la sangre del huésped vertebrado eliminando sus heces durante o después de la ingesta y es a través de ellas que se vehiculizan los **tripomastigotes metacíclicos** (Brenner, 1973).

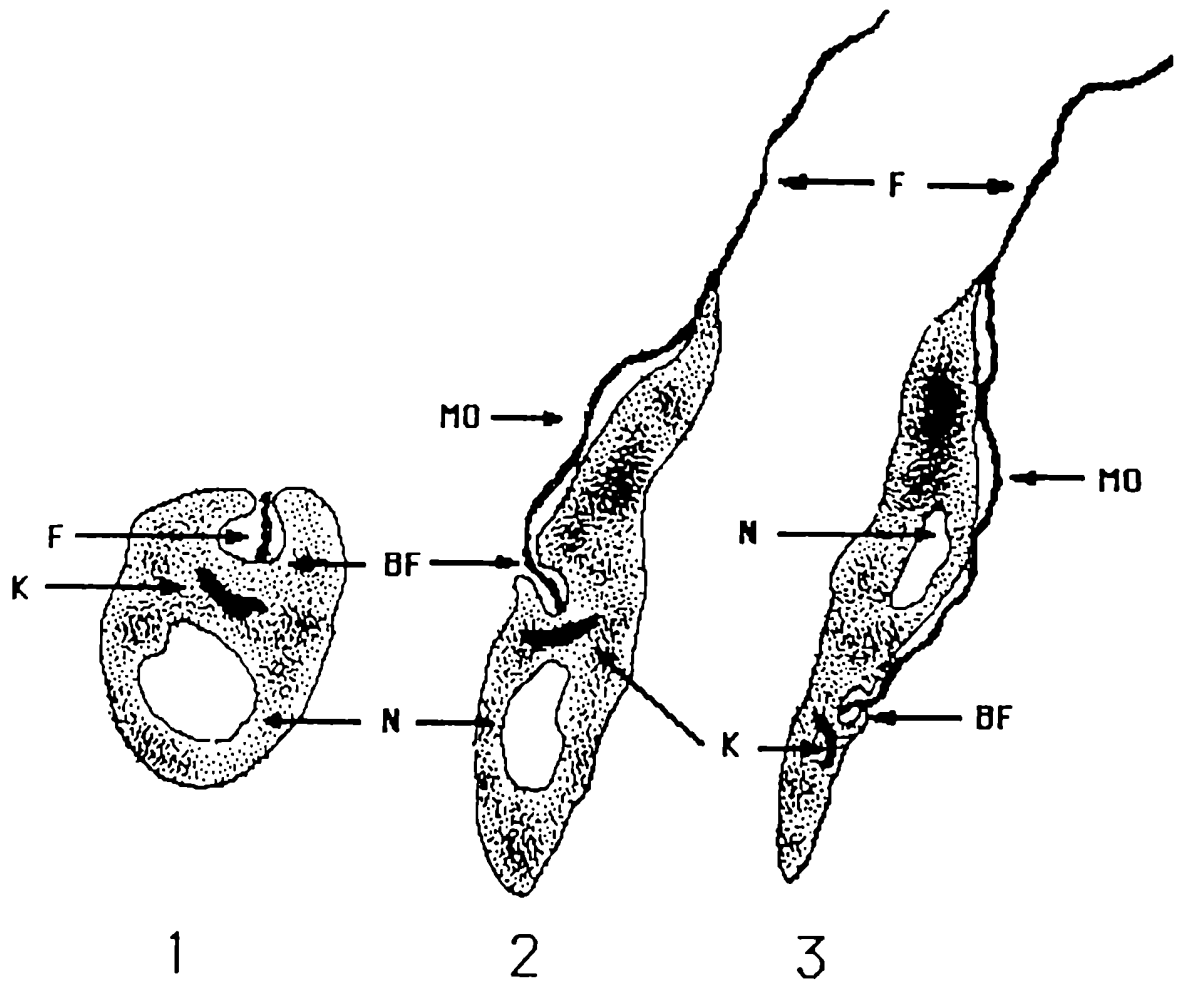


Figura 1: Formas celulares del Trypanosoma cruzi.

1. Amastigote. 2. Epimastigote. 3. Tripomastigote.
Bolsillo flagelar (BF), flagelo (F), kinetoplasto (K),
Membrana ondulante (MO) y núcleo (N).

Estos atraviesan la piel o las mucosas a través de microescoriaciones e invaden las células. Las más comunmente infectadas son las fibras musculares esqueléticas y cardíacas, las células de la glía, el sistema retículo endotelial y el aparato digestivo.

En la fase intracelular del ciclo de vida los tripomastigotes se transforman en amastigotes, una forma redondeada, con flagelo pequeño y que se multiplica por fisión binaria. Luego de un determinado número de divisiones reaparecen los tripomastigotes que se liberan a la circulación por ruptura celular. Estos tripomastigotes sanguíneos invaden otras células comenzando así el ciclo tripomastigote-amastigote que se mantiene indefinidamente.

2. Metabolismo energético en el T. cruzi

La mayor parte de los estudios metabólicos en el T. cruzi se han realizado sobre la forma epimastigote obtenida de cultivo que se presume idéntica a la que se encuentra en el insecto vector.

La comparación de resultados obtenidos con las distintas formas del parásito permite afirmar que todas ellas poseen al menos cualitativamente las mismas características metabólicas (Gutteridge y Rogerson, 1979).

2.1. Utilización de nutrientes

Los epimastigotes pueden utilizar glúcidos y aminoácidos para su desarrollo (von Brand, 1979), sin embargo no ha sido completamente elucidado cuál es el nutriente natural más importante para éste parásito.

Con respecto a esto, evidencias experimentales indican que:

a) la glucosa es el sustrato preferido de los epimastigotes que la metabolizan primero, aún en presencia de proteínas y aminoácidos (Cannata y Cazzulo, 1984; Cazzulo et al, 1985).

b) el T. cruzi requiere de la presencia de glucosa o algún azúcar interconvertible en el medio de cultivo para poder desarrollarse y replicarse constantemente.

También puede utilizar otros azúcares como fructosa, manosa, xylosa (Lehman, 1963), galactosa a mayores concentraciones que los anteriores y en menor proporción

maltosa, celobiosa, malibiosa, rhamnosa, sorbitol, alfa-metilmanósido y glicerol (Zeledon, 1960).

c) los diferentes estadios del parásito parecen preferir uno u otro tipo de nutrientes pues los simil amastigotes (formas similares a las intracelulares obtenidas de cultivo axénico) tienen un metabolismo exclusivamente glicolítico (Engel et al, 1987), los epimastigotes utilizan glucosa (sustrato preferido en la fase exponencial de crecimiento) y aminoácidos (cerca de la fase estacionaria) (Cazzulo et al, 1985; Engel et al, 1987) y los tripomastigotes metacíclicos utilizan para su metabolismo energético exclusivamente proteínas y aminoácidos (Urbina et al, 1989).

d) Tanto las proteínas como los aminoácidos pueden constituir una reserva energética para el parásito dado que en determinadas condiciones, como en la diferenciación de epimastigote a tripomastigote metacíclico el mismo puede consumir parte de su proteína como combustible (Rodríguez et al, 1990).

La mayoría de los autores concuerda en que el T. cruzi no sintetiza polisacáridos de reserva (Brener, 1973). La biosíntesis de oligosacáridos podría limitarse a la porción glucídica de glicoproteínas y lipopeptidofosfoglicanos (Cannata y Cazzulo, 1984, revisión).

Por otro lado existe un gran pool de aminoácidos, de los cuales la L-alanina ocupa el lugar más importante.

Es necesario un ayuno superior a las 24 horas para detectar una estimulación de la respiración producida por glucosa o aminoácidos.

2.2. Transporte de nutrientes

El transporte de glúcidos sólo ha sido estudiado con algún detalle para la galactosa para la que se ha postulado un mecanismo con un componente de transporte activo en el rango de bajas concentraciones y de difusión en las concentraciones altas (Warren y Kitzman, 1963; Warren y Patrzek, 1963).

También los aminoácidos son transportados activamente por los epimastigotes (Cazzulo, 1984) y las proteínas se incorporan al parásito por pinocitosis, proceso que ocurre fundamentalmente a nivel del bolsillo flagelar (De Souza, 1984).

2.3. Catabolismo de carbohidratos: la "fermentación aeróbica"

2.3.1. Productos finales del catabolismo de los glúcidos

Ryley (1956) ha estudiado la metabolización de glucosa por suspensiones de epimastigotes en cultivo y tripomastigotes metacíclicos en condiciones aeróbicas (CO₂/aire) o anaeróbicas (CO₂/N₂).

La presencia de glucosa 15 mM producía una estimulación de la respiración sobre los niveles basales en ambas formas del parásito (30 y 19% respectivamente).

Los resultados de estos experimentos indicaron que los epimastigotes en cultivo producían en aerobiosis ácidos acético, succínico, láctico y pirúvico en ese orden de importancia aumentando en anaerobiosis al doble la producción de estos ácidos con excepción del ácido acético que disminuía un 50%. En el caso de los tripomastigotes sanguíneos los productos principales en aerobiosis eran los ácidos acético y succínico, en ese orden, aumentando considerablemente la producción de succínico en condiciones anaeróbicas sin alteración en el ácido acético.

Cáceres y Fernandes (1976), trabajando con epimastigotes de la cepa Y detectaron producción de ácido láctico, succínico y málico siendo los dos últimos los productos cuantitativamente más importantes. El pico de producción de éstos coincidía con el agotamiento de la glucosa del medio y finalmente los ácidos orgánicos eran recaptados por los parásitos y oxidados.

Estos estudios, como los de Chang (1948) y Bowman y col. (1963), señalan al ácido succínico como un catabolito importante, aunque presentan algunas diferencias con respecto a los metabolitos menores.

En los últimos años se han retomado estos estudios utilizando diferentes metodologías:

- a) ensayos enzimáticos específicos para la detección y cuantificación de los catabolitos producidos.
- b) la técnica no invasiva de RMN-(¹³C) que permite

estudiar el metabolismo en la célula viva.

Los resultados de estos estudios indican que en ambos casos el succinato y la L-alanina son los productos principales (Cazzulo et al, 1985; Engel et al, 1987; Frydman et al, 1990). Por medio de las técnicas enzimáticas se ha podido detectar también la formación de acetato. Una pequeña proporción del mismo provendría del catabolismo de la glucosa (Cazzulo et al, 1985; Engel et al, 1987), pero probablemente la mayor parte de de este catabolito derive de lípidos o aminoácidos (Frydman et al, 1990).

Trabajos recientes indican la existencia de dos pools distintos de alanina, uno que es retenido dentro de la célula y otro que se excreta (Frydman et al, 1990).

En estos experimentos no se ha detectado lactato, piruvato y malato, ni glicerol o etanol, cosa que sí ocurre en otros Tripanosomátidos como Crithidia spp. (Cazzulo et al, 1988).

La comparación de los resultados obtenidos con epimatigotes con los correspondientes a la forma simil amastigote indica que sólo existen diferencias cuantitativas en su metabolismo (Engel et al, 1987).

2.3.2. Vías catabólicas

2.3.2.1. Glucólisis

La glucólisis es operativa tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Evidencias en ese sentido se obtuvieron por Bowman y col. (1963) quienes demostraron que el metabolismo de (1-¹⁴C)glucosa por epimastigotes era consistente con el funcionamiento de la glucólisis y la posterior fijación de CO₂ sobre ácidos monocarboxílicos (C₃).

Confirmando estos hallazgos, al incubar epimastigotes con glucosa uniformemente marcada la radioactividad se recuperaba en hexosas mono y difosfato, lactato y alanina (Shaw et al, 1964). En efecto, han podido ser detectadas todas las enzimas de la vía glucolítica en extractos libres de células (Cannata y Cazzulo, 1984, revisión).

La mayoría de estas enzimas han sido encontradas en las tres formas del parásito (Rogerson y Gutteridge, 1980). No obstante ello, no se dispone en la actualidad de mucha información sobre las características moleculares y cinéticas de las mismas. La hexoquinasa, por ejemplo es capaz de fosforilar además de glucosa; fructosa, manosa, glucosamina y 2-deoxiglucosa. Una característica saliente de la enzima es que no es inhibida por el producto de la reacción como ocurre con la enzima de mamíferos (Urbina, 1980; Racagni y Machado

de Domenech, 1983).

La fosfofructoquinasa, que ha sido estudiada por Crespo y Urbina (1979) sólo presenta inhibición por ATP a concentraciones mucho mayores que las que afectan a la enzima de mamíferos. El 5'AMP activa la enzima disminuyendo el Km para la fru-6-fosfato.

La piruvato quinasa, estudiada por Juan y col. (1976), presenta una cinética sigmoidea para el PEP que tiende a transformarse en hiperbólica en presencia del activador fru-1,6-difosfato y aumenta su carácter sigmoideo en presencia de ATP.

La cinética para el ADP es hiperbólica, siendo el ATP un inhibidor competitivo con respecto a éste. La fru 2,6 difosfato es un fuerte activador de la enzima y puede revertir (a concentraciones micromolares) los efectos inhibitorios de concentraciones milimolares de Pi y ATP (Cazzulo et al, 1989).

La glucólisis en el T. cruzi presenta diferencias con respecto al hospedador mamífero:

a) Taylor y col.(1980) han presentado evidencias que indican que las primeras enzimas glicolíticas se encuentran ubicadas en una organela denominada glicosoma (ver adelante) que fué descubierta por Oppendoes y Borst (1977) en el T. brucei.

b) la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa, enzimas regulatorias claves en la mayoría de los sistemas glicolíticos se ven sólo ligeramente afectadas por los efectores comunes de estas enzimas (Urbina y Crespo,

1984; Racagni y Machado de Domenech, 1983; Aguilar y Urbina, 1986; Taylor y Gutteridge, 1986b).

El único control descrito sobre una enzima glicolítica es el ya mencionado de la fructosa 2,6 difosfato y de la fructosa 1,6 difosfato sobre la piruvato quinasa.

Esta falta de regulación sugeriría que la velocidad de la glucólisis no es apreciablemente modificada en presencia o ausencia de O_2 , en otras palabras que el T. cruzi carece del denominado efecto Pasteur (Cazzulo et al, 1988).

2.3.2.2. Vía de las pentosas

Aparentemente también es operativa la vía de las pentosas fosfato según se desprende del análisis de los resultados obtenidos incubando las células en presencia de glucosa marcada en el C_1 o en el C_6 . Como es de esperar en el caso del funcionamiento de esta vía, los niveles de $^{14}CO_2$ desprendidos en el primer caso eran mayores que los correspondientes al segundo (Bowman, 1963).

Además se ha demostrado la presencia en extractos crudos de las dos primeras enzimas de la vía: la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Raw, 1959). Ambas deshidrogenasas están presentes en las tres formas del parásito siendo su actividad mayor en los epimastigotes (Rogerson y Gutteridge, 1980).

2.3.2.3. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena respiratoria son funcionales en el T. cruzi tanto en epimastigotes (Shaw et al, 1964; Stoppani y Boiso, 1973; Docampo et al, 1978) como en tripomastigotes (Docampo et al, 1979). El piruvato entra al ciclo como acetil-CoA, generado por la enzima piruvato deshidrogenasa (Miller et al., 1976) y reacciona con el oxaloacetato en la reacción catalizada por la citrato sintasa (Juan et al., 1977).

Se han detectado en las tres formas del parásito todas las enzimas del ciclo a excepción de la alfa-oxoglutarato deshidrogenasa (Rogerson y Gutteridge, 1980). No hay informes sobre una succinato tioquinasa, pero se ha descrito una succinil-CoA sintasa(ATP) en epimastigotes (Salzman et al., 1982).

La citrato sintasa posee las características típicas de la enzima eucariótica (Juan et al., 1977) y de las isocitrato deshidrogenasas sólo se ha encontrado la dependiente de NADP⁺.

2.3.3. Sistemas de reoxidación del NADH glicolítico

El T. cruzi posee al menos tres mecanismos de reoxidación del NADH producido en la reacción catalizada por la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa :

2.3.3.1. reducción del oxaloacetato a L-malato y del fumarato a succinato en la fermentación aeróbica (Bowman et al., 1963).

2.3.3.2. producción de L-alanina.

2.3.3.3. oxidación de metabolitos reducidos como el glicerol-3-fosfato y el L-malato en la cadena respiratoria (Rogerson y Gutteridge, 1979).

2.3.3.1. Producción de succinato: Se ha demostrado que tanto en aerobiosis como en anaerobiosis los epimastigotes fueron capaces de fijar $^{14}\text{CO}_2$ y producir succinato exclusivamente marcado en el grupo carboxilo.

Cuando el sustrato era (1- ^{14}C)glucosa la radioactividad incorporada en anaerobiosis sólo aparecía en los grupos metileno del succinato. Estos hechos concuerdan con la hipótesis de que se produce un ácido dicarboxílico (C_4) por la fijación de CO_2 sobre un ácido monocarboxílico (C_3) proveniente de la glucólisis que puede ser PEP o piruvato (Bowman et al., 1963).

De acuerdo a esto, en el esquema de la figura 2 se describe el probable flujo metabólico de radioactividad que explicaría los resultados obtenidos con (1- ^{14}C)glucosa o $^{14}\text{CO}_2$.

La reacción de carboxilación es un aspecto

Figura 2

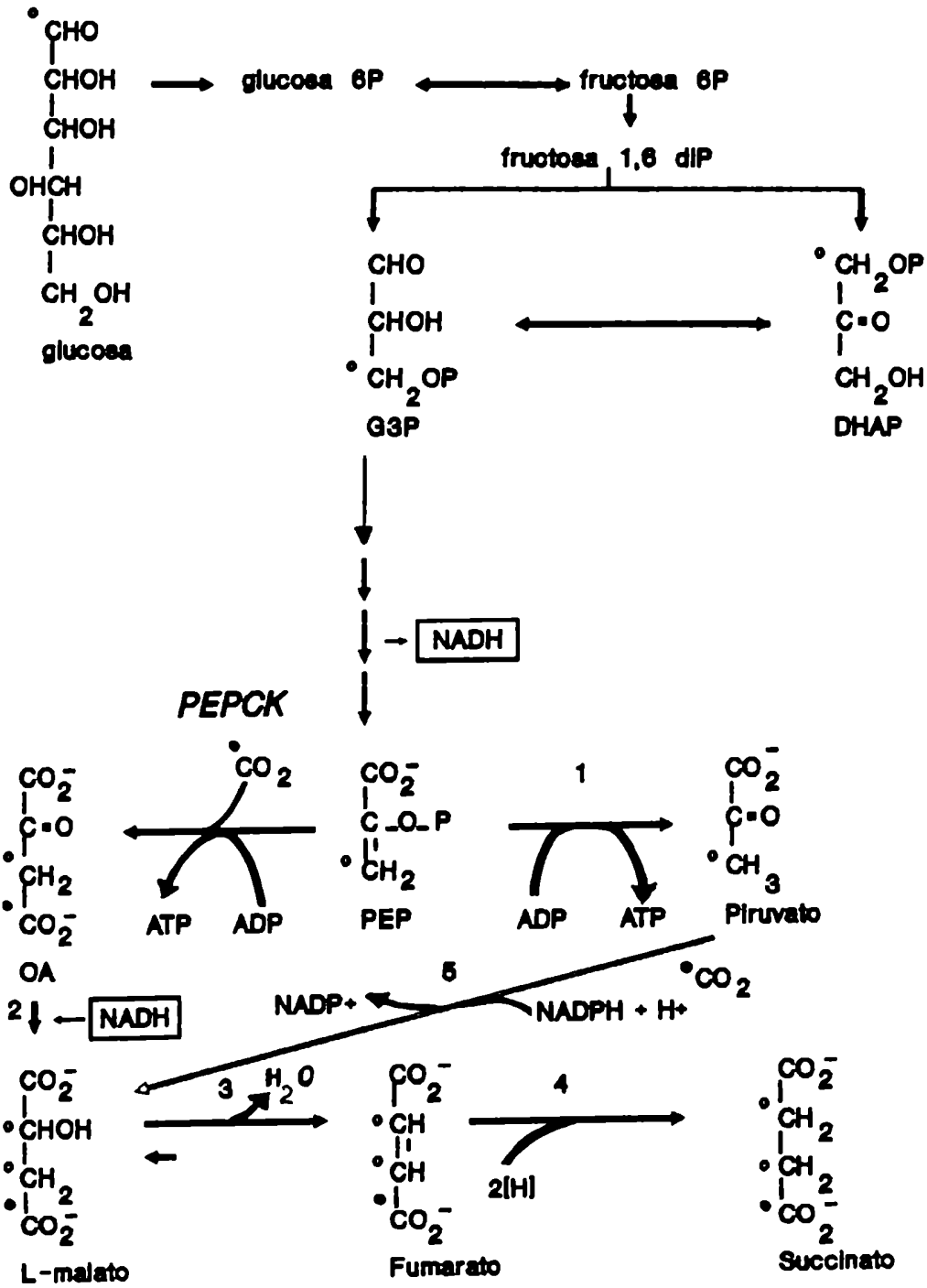


Figura 2: El succinato como producto final en el catabolismo de la glucosa en el T.cruzi.

Flujo metabólico de radioactividad que explica los resultados obtenidos cuando las células se incuban en presencia de (1-¹⁴C)glucosa (o) o ¹⁴CO₂ (●).

Las evidencias presentadas en el texto permiten descartar casi totalmente a la enzima málica como la responsable de la reacción de carboxilación necesaria en la síntesis de succinato (\Rightarrow).

Los números corresponden a las siguientes enzimas:

1. Piruvato quinasa
2. Málico Deshidrogenasa
3. Fumarasa
4. Fumarato Reductasa

controvertido. Cuando se investigó en extractos libres de células la existencia de enzimas carboxilantes sólo se encontró PEPCK y enzima málica (Cataldi de Flombaun et al., 1977) siendo la actividad de PEPCK alrededor de 6 veces mayor que la de la enzima málica en todo el rango de pH estudiado. Además la actividad de esta última era 40 veces mayor para la decarboxilación del malato que para la carboxilación del piruvato (Cazzulo et al., 1977). Estos hechos sugirieron que era la PEPCK la principal enzima fijadora de CO₂ en el T. cruzi. Experimentos de RMN (¹³C) (De los Santos et al, 1987) han demostrado que en Crithidia fasciculata la enzima fijadora de CO₂ es sin lugar a dudas la PEPCK y experimentos similares en T. cruzi muestran resultados que son compatibles con esa hipótesis (Frydman et al, 1990). Además, recientemente Urbina et al (1989) han demostrado con experimentos "in vivo" (RMN-¹³C), que el agregado de ácido 3-mercaptopicolínico, un inhibidor de la PEPCK, a las células producía una disminución en la síntesis de succinato. De acuerdo a éstos resultados sería la PEPCK la enzima responsable de la carboxilación en el T. cruzi.

El oxaloacetato producido en la reacción catalizada por la PEPCK se reduciría a L-malato en una reacción catalizada por la malato deshidrogenasa, el L-malato se deshidrataría a fumarato vía fumarasa y finalmente el fumarato sería reducido a succinato por la fumarato reductasa (Figura 3).

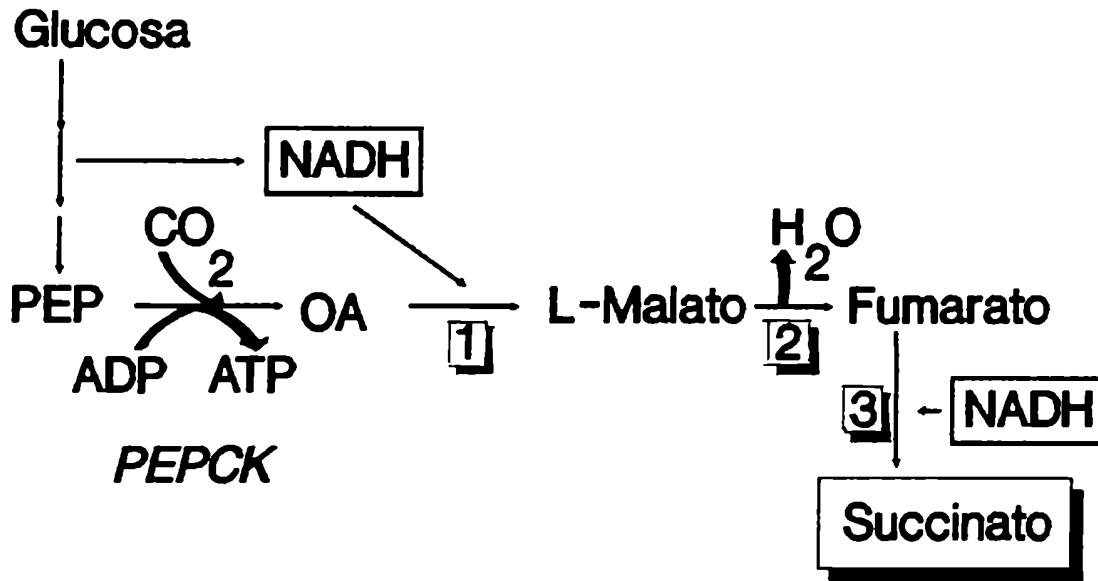


Figura 3: Síntesis de succinato en la "fermentación aeróbica"

Los números corresponden a las siguientes enzimas:

1. Malato Deshidrogenasa
2. Fumarasa
3. Fumarato Reductasa

Se pudo demostrar experimentalmente la presencia en el T. cruzi de todas las enzimas mencionadas: la fumarasa y la malato deshidrogenasa fueron detectadas por Baernstein (1953) mientras que la fumarato reductasa fue encontrada por Boveris y col. (1980).

La reducción a L-malato sería suficiente para la reoxidación del NADH glicolítico si ambas moléculas de PEP se convirtieran en succinato y no habría pérdida energética dado que se produce un ATP tanto en la reacción catalizada por la PEPCCK como por la piruvato quinasa.

2.3.3.2. Producción de L-alanina: La hipótesis presentada por Cazzulo y col. (1988) consiste en que el NADH glicolítico podría ser reoxidado por la enzima glutamato deshidrogenasa con producción de L-glutamato que reaccionaría con el piruvato glicolítico en una reacción de transaminación catalizada por la enzima alanina aminotransferasa (AAT) (Barros y Caldas, 1983). Para que éste mecanismo funcionase sólo se requerirían cantidades catalíticas de L-glutamato y alfa-oxoglutarato y un aporte continuo de NH_3 .

Con respecto a esto se ha informado que la excreción de NH_3 al medio es despreciable mientras se consume glucosa (Cazzulo et al, 1985; Engel et al, 1987; Cazzulo et al, 1988) lo que podría deberse o a una falta de producción o a que se utiliza en el mecanismo descripto.

No se conoce la localización subcelular de estas enzimas, pero se han encontrado al menos dos isoenzimas de la AAT (Miles et al, 1978) pudiendo ser una mitocondrial y la otra citosólica como parecen indicar experimentos de Taylor y Gutteridge (1986a).

También podría producirse L-alanina en el citosol a partir del L-malato sintetizado en el glicosoma (por la malato deshidrogenasa) mediante la acción concertada de la enzima málica, la glutamato deshidrogenasa (NADP) y la AAT. Este mecanismo convertiría L-malato y NH_3 en alanina y CO_2 y no requeriría de un pool citosólico de NADH. La enzima málica (isoenzima II) y la glutamato deshidrogenasa (NADP) son enzimas citosólicas (Cannata et al, 1980; Cannata y Cazzulo, 1984) (Figura 4).

2.3.3.3.Oxidación en la cadena respiratoria: La cadena respiratoria del T. cruzi consiste de los citocromos b, c_{558} , $a + a_3$ (citocromo oxidasa) y también probablemente el citocromo o, como oxidasa terminal alternativa (Stoppani, 1980; Gutteridge, 1981). Existiría además una tercera oxidasa terminal, el citocromo d (Affranchino et al, 1986).

Estudios recientes indican la existencia de una gran variación en el contenido de citocromos tanto en los diferentes aislamientos como en los distintos estadios (Schwarcz de Tarlovsky et al, 1985; Engel et al, 1987).

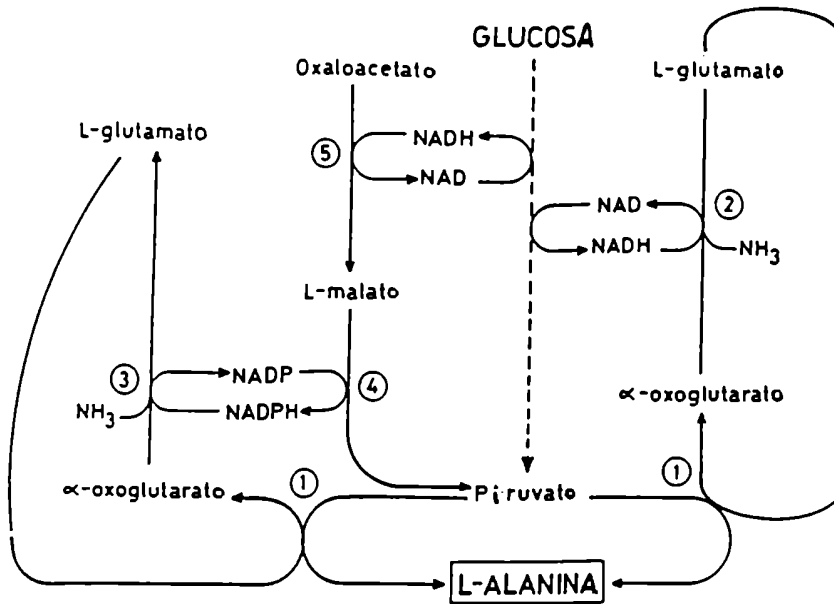


Figura 4: Síntesis de L-alanina como mecanismo de reoxidación del NADH glicolítico en la "fermentación aeróbica".

Las enzimas indicadas son:

1. Alanina aminotransferasa.
2. Glutamato Deshidrogenasa (NAD).
3. Glutamato Deshidrogenasa (NADP).
4. Enzima Málica.
5. Málico Deshidrogenasa.

Los niveles de algunos citocromos son menores que los encontrados en las mitocondrias de mamíferos y la ineficiencia relativa del proceso podría explicar la importancia de la existencia de la denominada "fermentación aeróbica" para mantener el balance redox de los nucleótidos de nicotinamida.

Partículas mitocondriales de los diferentes estadios son capaces de oxidar NADH, succinato y glicerol-3-fosfato (Gutteridge y Rogerson, 1979).

La antimicina A, que bloquea la respiración y el consumo de O_2 en presencia de glucosa (Stoppani et al, 1980; Gutteridge y Rogerson, 1979) inhibe el crecimiento de los epimastigotes y aumenta considerablemente la producción de succinato a partir de glucosa o CO_2 con una disminución en la producción de alanina (Boiso et al, 1979). Esto demostraría la participación de una cadena de transporte electrónico para la reoxidación del NADH.

Se ha informado de una muy baja actividad de lactato deshidrogenasa en extractos libres de células. La enzima parece ser una alfa-hidroxiácido deshidrogenasa que presenta dos isoenzimas, una de las cuáles es más activa con piruvato y alfa-oxobutirato (Ryley, 1956; Raw, 1959; Rogerson y Gutteridge, 1980; Taylor et al., 1980; Coronel et al., 1981). Sin embargo esta opción parece ser de muy poca importancia aún en anaerobiosis (Frydman et al, 1990).

2.3.4. Sistemas de Lanzaderas

Con respecto a los mecanismos de transporte de equivalentes de reducción a la mitocondria un mecanismo posible para la oxidación del NADH citosólico estaría constituido por la lanzadera de alfa-oxoisocaproato/ alfa-hidroxi-oxoisocaproato. La isoenzima II de la enzima alfa-hidroxiácido deshidrogenasa y la leucina aminotransferasa (que permite obtener el alfa-oxoisocaproato a partir de leucina) están presentes en citosol y mitocondria (Montamat et al, 1987) (Figura 5).

Sin embargo, según Taylor y Gutteridge (1986a) la alfa-hidroxiácido deshidrogenasa en epimastigotes está localizada en glicosoma y citosol mientras que las transaminasas son principalmente citosólicas con un pequeño componente particulado (presumiblemente mitocondrial).

La reoxidación del NADH glicolítico podría ser mediada por el L-malato utilizando la enzima malato deshidrogenasa de la que existen dos isoenzimas, una glicosomal y otra mitocondrial. Dado que la aspartato amino transferasa es exclusivamente mitocondrial (Cannata y Cazzulo, 1984), el sistema no sería completo.

Sin embargo la producción de ácidos dicarboxílicos sería continua debido a la acción de la PEPCK en el glicosoma haciendo innecesario su reciclaje (Figura 6).

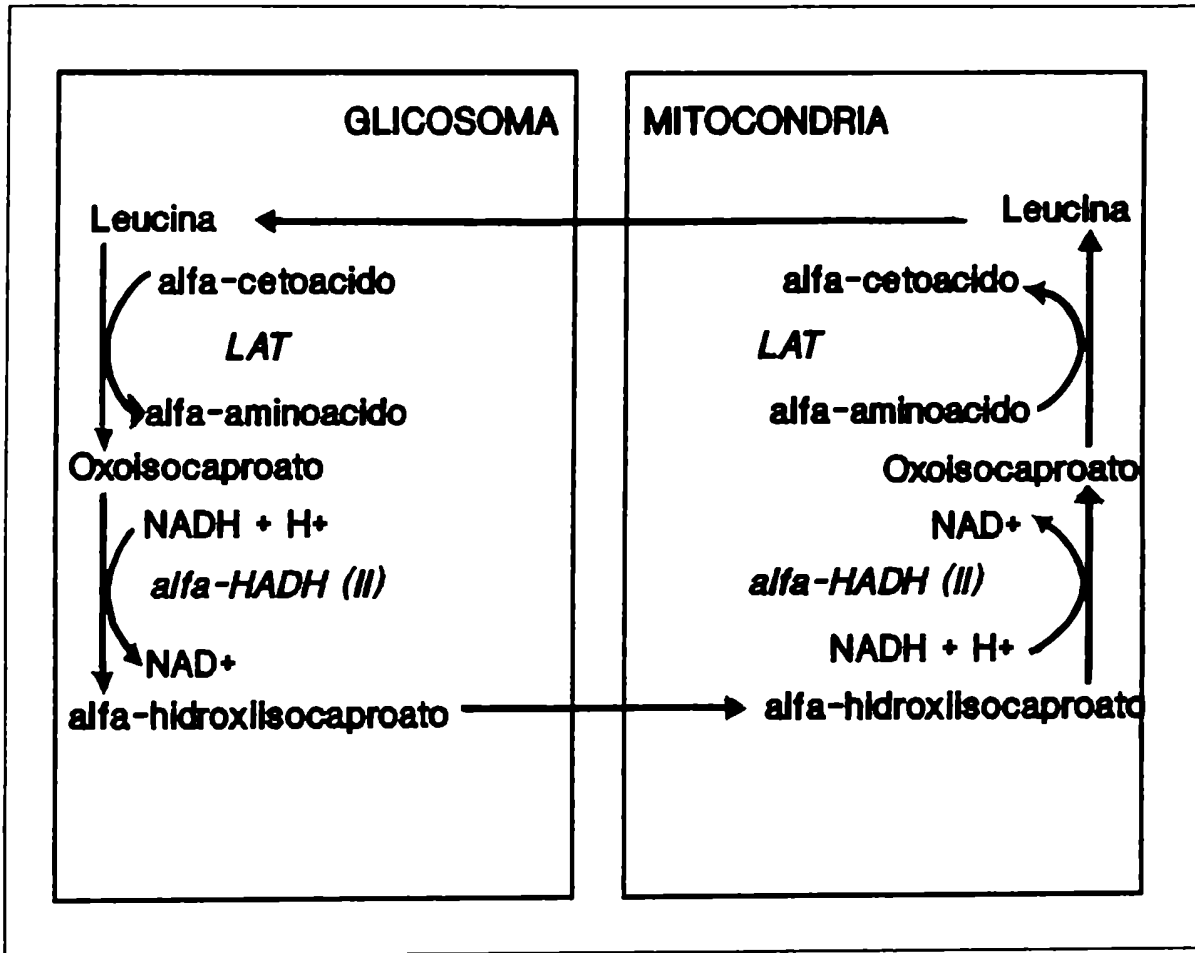


Figura 5: Transporte de equivalentes de reducción a la mitocondria. Lanzadera del oxoisocaproato/ α -hidroxilisocaproato.

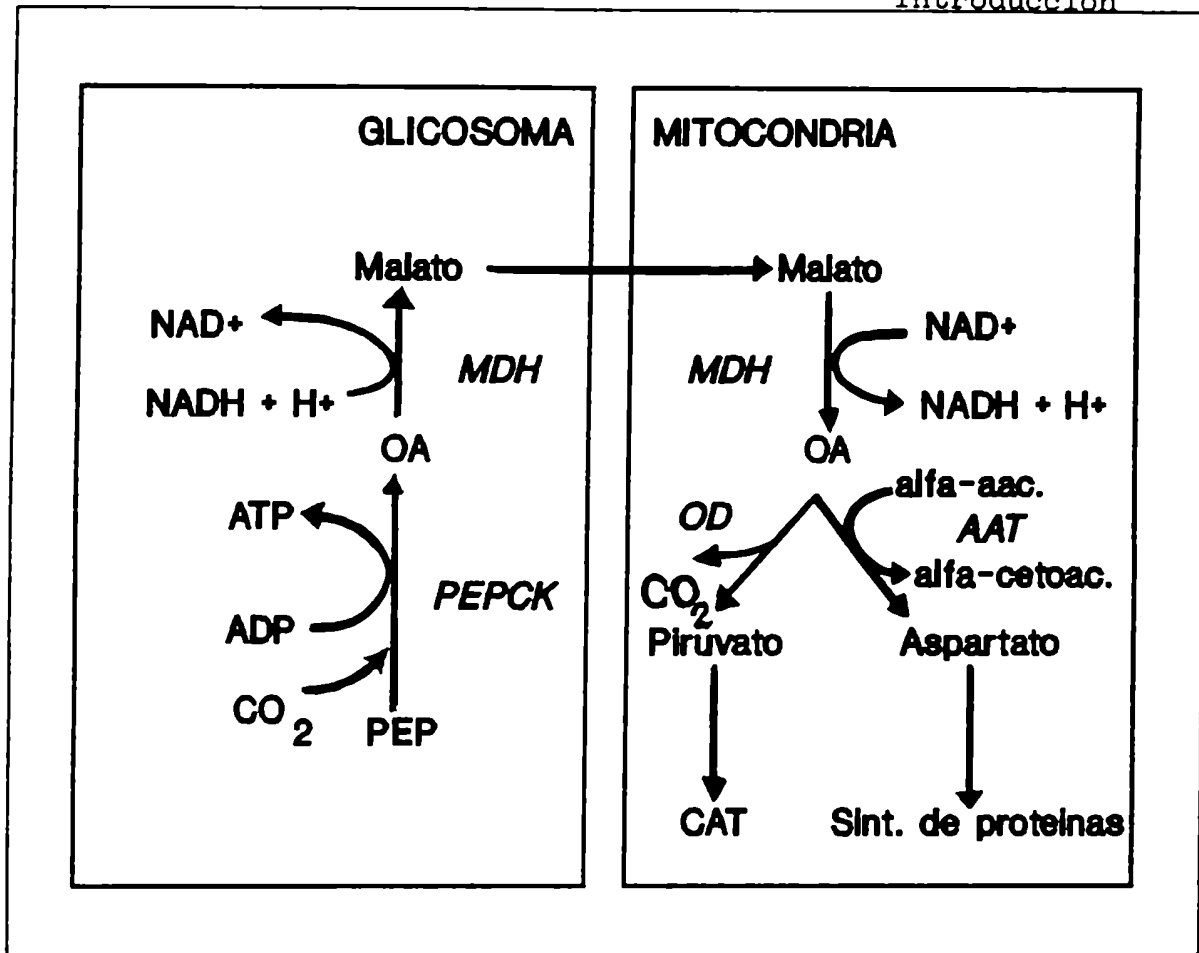


Figura 6: Transporte de equivalentes de reducción a la mitocondria. Lanzadera del malato/oxaloacetato.

El oxaloacetato formado en la mitocondria por oxidación del L-malato podría ser transaminado a L-aspartato y éste ser utilizado para síntesis proteica o bien directamente decarboxilado para formar piruvato que se oxidaría en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en efecto, las preparaciones crudas de T. cruzi presentan una actividad de oxaloacetato decarboxilasa (Cazzulo et al., 1977 y esta tesis) lo cual estaría de acuerdo con la última posibilidad.

La existencia de la lanzadera de glicerol-3-fosfato no ha sido claramente demostrada, pues, aunque se ha detectado la presencia de una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (independiente de NAD) en mitocondrias no se ha encontrado su contrapartida glicosomal (Cazzulo et al, 1988).

En el esquema de la figura 7 se puede observar la interrelación metabólica de las distintas vías funcionales en el T.cruzi.

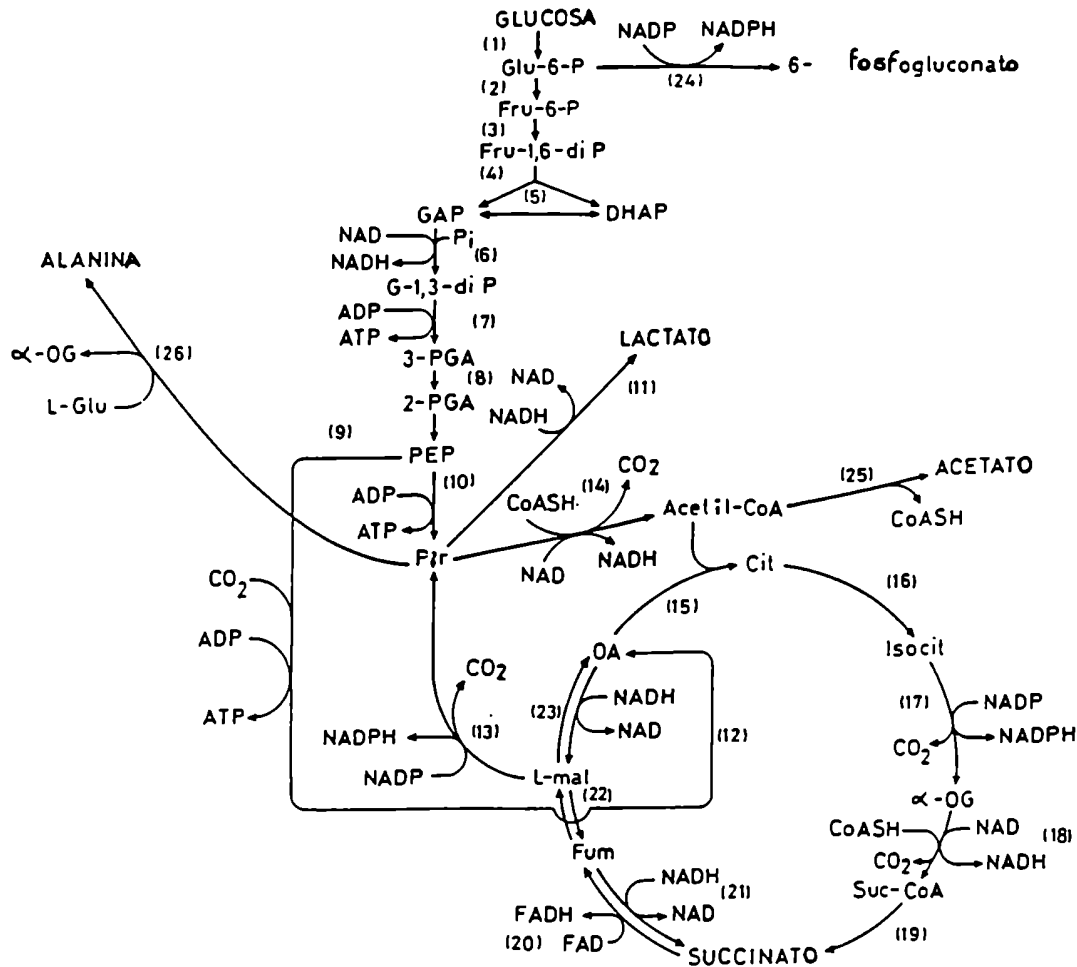


Figura 7: Vías metabólicas que participan en el catabolismo de la glucosa en el *T. cruzi*. Las enzimas involucradas son las siguientes:

1. Hexoquinasa; 2. Hexosa fosfato isomerasa; 3. Fosfofructoquinasa;
4. Aldolasa; 5. Triosa fosfato isomerasa; 6. Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; 7. Fosfogliceroquinasa; 8. Fosfogliceromutasa;
9. Enolasa; 10. Piruvato quinasa; 11. alfa-hidroxiácido deshidrogenasa; 12. FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASA; 13. Enzima málica;
14. Piruvato deshidrogenasa; 15. Citrato sintasa; 16. Aconitasa; 17. Isocitrato deshidrogenasa; 18. alfa-oxoglutarato deshidrogenasa;
19. Succinato tioquinasa; 20. Succinato

Introducción

deshidrogenasa; 21.Fumarato reductasa; 22.Fumarasa; 23.Malato deshidrogenasa; 24.Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 25.Acetil CoA hidrolasa; 26.Alanina aminotransferasa. La enzima 18. aún no ha sido detectada en el T.cruzi.

2.4. Compartimentalización subcelular y regulación del catabolismo glucídico

El efecto Pasteur, que consiste en la disminución del consumo de glucosa cuando se pasa de condiciones anaeróbicas a aeróbicas, permite a muchos tipos celulares utilizar menos combustible para su metabolismo. Esto se debe a que el aprovechamiento de la glucosa es mucho más eficiente en aerobiosis (su rendimiento energético es mayor). Este efecto se ve reflejado en una disminución drástica de la producción de etanol o lactato según el tipo celular y un aumento en la producción de CO₂ que proviene del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

En el T. cruzi la situación es bastante diferente dado que tanto en aerobiosis como en anaerobiosis el consumo de glucosa es similar y normalmente se excretan productos reducidos al medio de cultivo aún en presencia de oxígeno. Este tipo de metabolismo se ha denominado "fermentación aeróbica". El único mecanismo regulatorio de importancia que se ha encontrado en el T. cruzi es la activación de la enzima piruvato quinasa citosólica por la fructosa 1,6-difosfato o 2,6-difosfato (Juan et al., 1976; Cazzulo et al., 1989).

Si bien la falta de regulación en el consumo de glucosa no necesariamente es perjudicial para el parásito, dado que éste obtiene sus nutrientes del hospedador, podría ser necesario algún tipo de control para evitar los

ciclos fútiles que podrían interferir con la fermentación aeróbica. La evidencia hasta ahora acumulada indica que el mecanismo de control utilizado es la **compartamentalización subcelular**.

Los Trypanosomatidos presentan una localización subcelular única de las enzimas glicolíticas que se encuentran en estos parásitos en una organela denominada **glicosoma**.

Los glicosomas fueron descubiertos por Opperdoes y Borst (1977) en el T. brucei. Son microcuerpos semejantes a los encontrados en otros eucariotas en cuanto a morfología y contenido de fosfolípidos y carecen de DNA (diámetro en el T. brucei de 0.27µm) (Opperdoes et al, 1984). También se encuentran en otros miembros del orden Kinetoplastida examinados como T. rhodesiense (McLaughlin, 1981), Crithidia luciliae (Opperdoes et al, 1981), Leishmania mexicana amazoniensis (Hammond y Gutteridge, 1982) y otros.

Los glicosomas de varios miembros del orden Kinetoplastida contienen las primeras enzimas glicolíticas (Opperdoes y Borst, 1977), la PEPCK (Opperdoes y Cottam, 1982), la malato deshidrogenasa, (Opperdoes y Cottam, 1982), algunas enzimas de la vía de síntesis de novo de pirimidinas (Hammond y Gutteridge, 1981) y de la recuperación de bases (Gutteridge y Davies, 1982; Hassan et al, 1985), la 3-betahidroxibutiril CoA deshidrogenasa (Hart y Opperdoes, 1984), otras enzimas de la vía de

biosíntesis de alcoxilfosfolípidos (Oppendoes, 1984) y catalasa (Oppendoes et al, 1977).

La concentración en una organela de las enzimas glicolíticas optimizaría el proceso catabólico, la membrana unitaria formaría una barrera de permeabilidad para los intermediarios de la vía (Visser y Oppendoes, 1980; Visser et al, 1981).

Taylor y col.(1980) quienes estudiaron la localización subcelular de las enzimas glicolíticas en el T.cruzi y Cazzulo y col (1980) y Cannata y col (1982) quienes lo hicieron con las enzimas fijadoras de CO₂ demostraron la presencia de glicosomas en el T.cruzi.

Taylor y Gutteridge (1987) han encontrado en los glicosomas de T.cruzi las enzimas: hexoquinasa, fosfoglucoasa isomerasa, triosafosfatoisomerasa, fosfofructoquinasa, aldolasa y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, en tanto la fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa y piruvato quinasa han sido encontradas en el citosol.

Se descarta la posibilidad de la existencia de un ciclo fútil entre las reacciones catalizadas por la PEPCK y la enzima málica dado que la primera es una enzima glicosomal (Cannata et al, 1982) mientras que la enzima málica presenta dos isoenzimas, una mitocondrial y la otra citosólica (Cazzulo et al, 1980; Cannata et al, 1982). La enzima malato deshidrogenasa también presenta isoenzimas glicosomal y mitocondrial (Cannata y

Cazzulo, 1984).

2.5. Compartimentalización de la "fermentación aeróbica"

El mecanismo propuesto para la fermentación aeróbica es el siguiente (Cannata y Cazzulo, 1984, revisión; Cazzulo, 1991, revisión) (figura 8):

El PEP generado en el citosol, dado que es allí donde se localiza la enzima enolasa (Taylor et al, 1980), puede convertirse en piruvato por la piruvato quinasa citosólica o puede ser captado por el glicosoma y carboxilado por la PKPCK a oxaloacetato. Este último se reduciría a malato por acción de la enzima malato deshidrogenasa glicosomal mientras que el piruvato citosólico se transaminaría a L-alanina.

También podría generarse piruvato tanto en citosol como en mitocondria en la reacción catalizada por alguna de las isoenzimas de la enzima málica.

La síntesis de piruvato en mitocondria y en citosol permitiría explicar la presencia de dos pools diferentes de L-alanina como se desprende de los estudios de RMN-¹³C (Frydman et al, 1990).

La formación de malato dentro del glicosoma permitiría la oxidación de las coenzimas reducidas en la reacción glicolítica catalizada por la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa siempre y cuando las dos moléculas de PEP formado en la glicólisis siguieran esta vía.

El malato glicosomal se transferiría a la mitocondria a

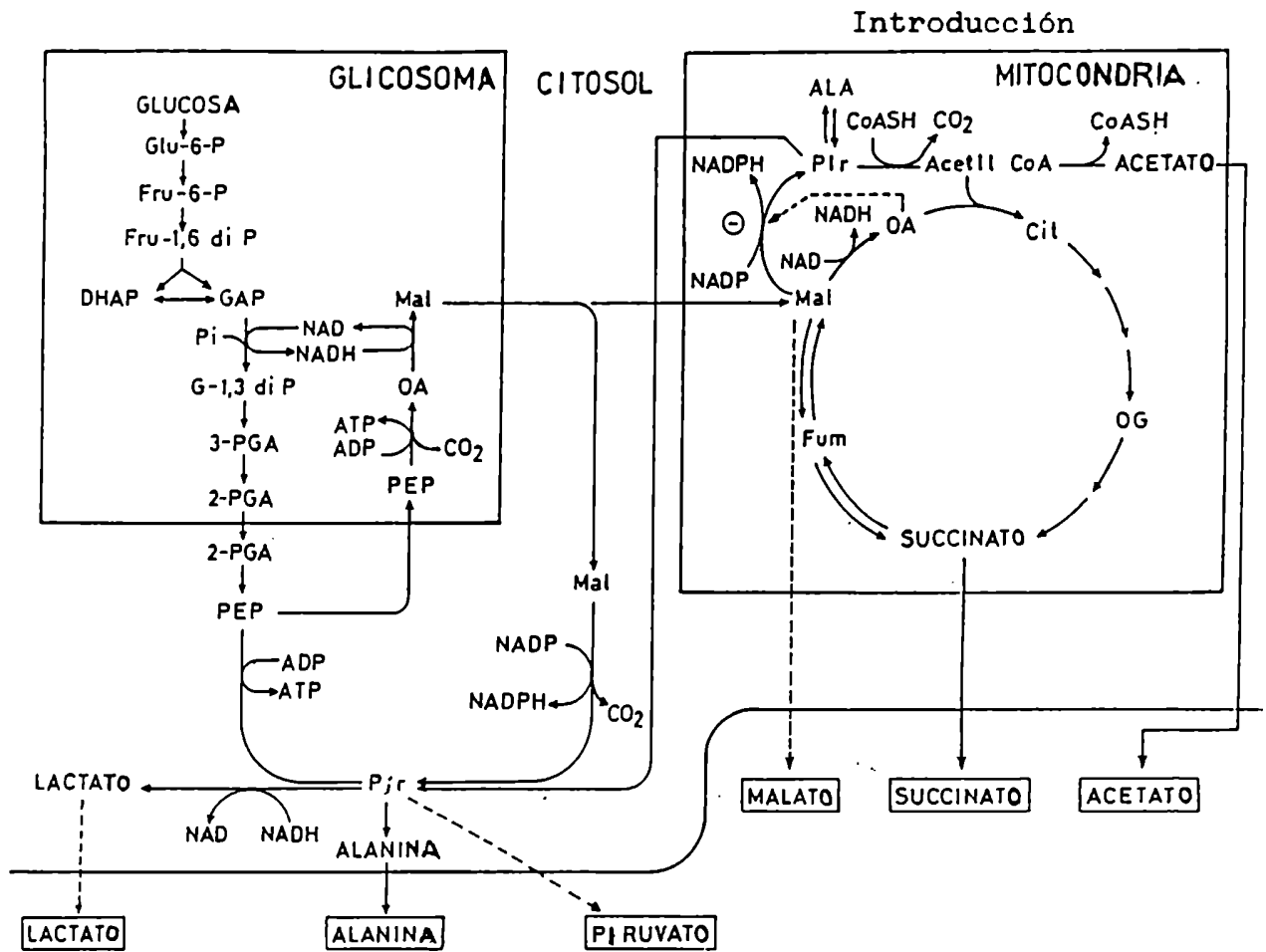


Figura 8: Compartimentalización de enzimas involucradas en el catabolismo de la glucosa en el *T. cruzi*.

través del citosol, donde podría ser sustrato de la enzima málica con producción de NADPH que puede a su vez ser utilizado en los procesos biosintéticos. En la mitocondria, el destino del L-malato dependería de la operatividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

En condiciones anaeróbicas o si por algún motivo el funcionamiento del ciclo no fuera máximo se acumularía oxaloacetato, producto de la reacción catalizada por la enzima malato deshidrogenasa y este metabolito podría actuar como fuerte inhibidor de la enzima málica mitocondrial (K_i para oxaloacetato = 9 μ M; Cannata et al, 1979). Inhibida esta enzima, el L-malato se transformaría casi completamente en succinato a través de las reacciones catalizadas por la fumarasa y la fumarato reductasa.

Si el ciclo funcionara activamente los niveles de oxaloacetato se mantendrían bajos (dado que el oxaloacetato es sustrato de la citrato sintasa) y por lo tanto la enzima málica no estaría inhibida con lo cual parte del malato se descarboxilaría a piruvato que transformado en Acetil-CoA se oxidaría en el ciclo. Los experimentos de Stoppani et al. (1980) con ^{14}C -acetato mostraron que cuando el ciclo funciona activamente se recupera marca en forma de alanina la cual sólo puede provenir del piruvato formado en la reacción de la EM I y que las condiciones que favorecen el marcado de alanina son opuestas a aquellas en las

cuales hay incremento en la producción de succinato. El mecanismo propuesto asigna gran importancia al L-malato y a la enzima málica en la fermentación aeróbica como así también a la **PEPCK** que sería una enzima clave del proceso.

3. La enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

3.1. Consideraciones generales

La PEPCCK ha sido estudiada en muchas especies, tanto animales como vegetales.

Con respecto a los animales superiores se ha purificado de hígado de pollo (Utter et al, 1954a), de cerdo (Chang et al, 1966), de cobayo (Holten y Nordlie, 1965), de mono (Hammond et al, 1978), de rata (Ballard et al, 1969), de conejo (Gallwitz et al, 1988), de escualo (Johnson, 1990), hígado y riñón de camello árabe (Al-Ali et al, 1988) y riñón de oveja (Barns et al, 1972a).

También ha sido purificada de levadura de panadería (Cannata et al, 1963) y de Saccharomyces cerevisiae (Tortora et al, 1985) y entre los helmintos parásitos entre otros de Ascaris suum (Pietrzak Roher et al, 1986) y de Fasciola hepática (Behm y Bryant, 1982).

Con respecto a los procariotas se ha aislado y estudiado en diferentes especies como Veillonella parvula (Chau et al, 1986) y Vibrio costicola (Salvarrey et al, 1989).

Entre los vegetales se ha estudiado por ejemplo en la planta (C₄) Panicum maximum (Urbina et al, 1989).

Con relación a los tripanosomátidos se ha purificado de Leishmania mexicana (Mottram et al, 1985).

Las características de peso molecular, estructura cuaternaria y ubicación subcelular, en aquellos casos en que se ha podido establecer, se resumen en la Tabla I.

Tabla I: Peso molecular, estructura cuaternaria y localización subcelular de PEPCs de diversos orígenes.

Origen	Método de determinación	Peso Molecular	Estructura cuaternaria	Ubicación subcelular
Higado de cerdo(1)	Eq. de sedimentación	73000	Monómero	Citosol y Mitocondria
Higado de rata(2)	Andrews	74500	Monómero	Citosol
Higado de pollo(3)				
Mitocondria	Eq. de sed./SDS-PAGE	74500-75400	Monómero	Mitocondria
Citosol	Andrews/SDS-PAGE	68000-60000	Monómero	Citosol
Higado de conejo(4)	SDS-PAGE	65000	Monómero	Citosol y Mitocondria
Higado de <u>Squalus acanthias</u> (5)	SDS-PAGE	70000	Monómero	
Riñon de oveja(6)	Eq.de sed./SDS-PAGE	72000	Monómero	
Levadura de panadería (7)	Eq.de sed./SDS-PAGE	252000 64000	Tetramero	Citosol
<u>Ascaris suum</u> (8)	Andrews SDS-PAGE	75000-80000 83000	Monómero	
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> (9)	Andrews SDS-PAGE	261000 64300	Tetramero	
<u>Leishmania mexicana</u> (10)	Andrews SDS-PAGE	63100 65100	Monómero	Glicosoma
<u>Bacillus stearothermophilus</u> (11)	Andrews	130000	Dímero	
<u>Escherichia coli</u> (12)	Andrews/SDS-Page/ Eq. de sed.	53000	Monómero	
<u>Vibrio costicola</u> (13)	Eq. de sed.	62000	Monómero	
<u>Veillonella parvula</u> (14)	SDS-PAGE	35000	Monómero	

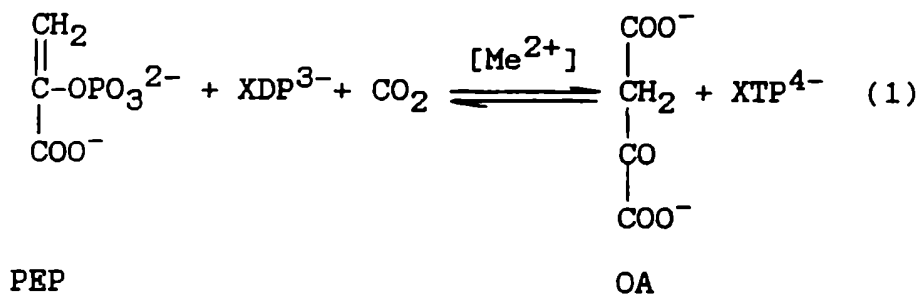
1.Chang y Lane (1966), Suratek y col. (1970); 2.Ballard y Hanson (1967,1969); 3.Lee y col. (1981), Sato y col. (1986) ; 4.Gallwitz y col. (1988), Nordlie y Lardie (1963); 5.Johnson y col. (1990); 6.Barns (1971); 7.Utter y Kolenbrander (1972), Cannata (1970); 8.Pietrzak Roher (1986); 9.Tortora y col. (1985); 10.Mottram y Coombs (1985); 11.Cannata y Flembaum (Resultados no publicados); 12.Goldie y Sanwal (1980); 13.Salvarrey y col. (1989); 14.Chau y Ng (1986).

3.2. Reacciones catalizadas por la PEPCK

3.2.1. Formación de oxaloacetato o fosfoenolpiruvato

La PEPCK (GTP:OA carboxilasa [transfosforilante]:EC

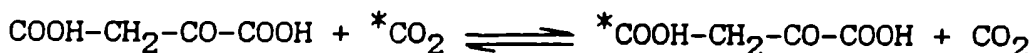
4.1.1.32) cataliza la siguiente reacción reversible:



donde XDP^{3-} es un nucleósido difosfato, XTP^{4-} es un nucleósido trifosfato y Me^{2+} es un catión divalente. Según evidencias experimentales la especie activa en la reacción es el CO_2 y no el bicarbonato (Cooper et al, 1968).

La enzima (a juzgar por los datos experimentales obtenidos con la aislada de animales superiores) es de 2 a 8 veces más activa en la dirección de formación de PEP que en la opuesta, dependiendo ello de las condiciones experimentales (Utter et al, 1953).

Dado que la enzima cataliza una reacción reversible en todo momento coexisten las reacciones de carboxilación y de decarboxilación. Esto permite que en presencia de oxaloacetato se incorpore $^{14}\text{CO}_2$ en este último metabolito en la denominada reacción de intercambio:

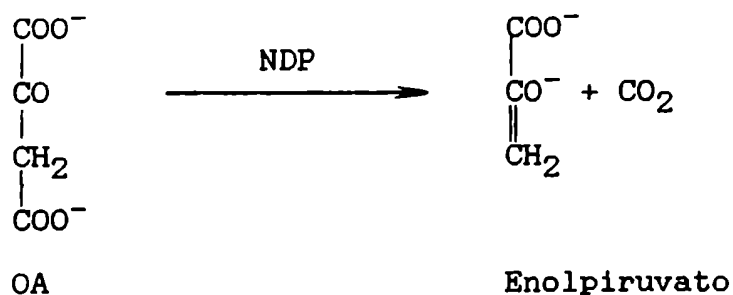


Esta reacción sólo ocurre en presencia de ATP y Mn^{2+} en el caso de levadura de panadería (Cannata y Stoppani, 1963) y de GTP y algún catión divalente como con la enzima aislada de mitocondrias de hígado de embrión de pollo (Satoh, 1986).

En levadura de panadería, preparaciones altamente purificadas de PEPCK presentaron una mínima actividad de piruvato quinasa que no pudo separarse por electroforesis de zona (Cannata et al, 1963) asumiéndose que es una actividad intrínseca de la enzima, lo que concuerda con el modelo de Rose (1960) según el cual el complejo PEP-ADP-enzima podría originar oxaloacetato o piruvato.

3.2.2. Formación de piruvato a partir de oxaloacetato

Aparentemente la PEPCK también puede catalizar la reacción irreversible de decarboxilación del oxaloacetato en presencia de concentraciones catalíticas de un nucleósido difosfato o monofosfato para dar piruvato de acuerdo a la reacción:



Esta reacción se estudió por primera vez con la enzima aislada de levaduras (Cannata et al, 1963).

Posteriormente Utter y col. (Utter et al, 1954b; Noce y Utter, 1975) encontraron que la PEPCK de hígado de pollo también era capaz de catalizar la mencionada reacción.

En el caso de la enzima purificada de levadura de panadería, la reacción requiere la presencia de AMP o ADP siendo este último el más efectivo, y en el caso de la enzima de hígado de pollo, de IDP o GDP.

Se descartó que esta actividad pudiera deberse a la acción conjunta de la PEPCK y de la piruvato quinasa dado que tanto en el caso de la levadura como en el de la enzima aislada de hígado de pollo la actividad oxaloacético decarboxilásica es inhibida por cationes divalentes, mientras que las enzimas mencionadas tienen requerimientos absolutos por Mn^{2+} y Mg^{2+} respectivamente. Por otra parte, la actividad piruvato quinasa no fue encontrada en todas las preparaciones estudiadas de hígado de pollo (Noce et al, 1975).

También es de destacar que la relación entre las actividades OD y PEPCK se mantuvo constante durante la purificación, lo cual parecería descartar una posible contaminación (Cannata et al, 1963).

A diferencia de lo ya mencionado, la actividad OD de la PEPCK aislada de hígado de cerdo tiene un aparente requerimiento por catión divalente (Chang et al, 1966).

Es de destacar que se han encontrado también actividades

oxaloacético decarboxilásicas no asociadas a la actividad de PEPCK en bacterias (Krampitz et al, 1941) y en mitocondrias de hígado de rata (Corwin, 1959).

La función de esta actividad oxaloacético decarboxilásica podría estar asociada al catabolismo de los esqueletos carbonados de aminoácidos para la obtención de energía como se discutirá más adelante en el transcurso de esta tesis. En la mayoría de los sistemas la enzima cataliza la decarboxilación del oxaloacetato en presencia de un nucleósido trifosfato y es reconocida como la enzima clave en la gluconeogénesis, pues interviene en una de las primeras etapas de dicho proceso siendo esencial para poder utilizar los precursores del PEP de tres y cuatro carbonos.

En cambio, en algunos casos, como en el de los helmintos parásitos (invertebrados), parece funcionar como enzima fijadora de CO₂ catalizando la carboxilación del PEP en presencia del correspondiente nucleósido difosfato para producir oxaloacetato (Simpson y Awapara, 1964, 1966; de Zwaan et al, 1976; Bryant, 1975). Este paso glicolítico en el metabolismo de estos parásitos es el primer paso divergente entre ellos y sus hospedadores.

3.3. Propiedades generales de las PEPCCK

3.3.1. Especificidad de nucleótido

Como ya se ha mencionado la enzima posee un requerimiento absoluto por un nucleósido difosfato que actúa como aceptor de fosfato en la conversión de PEP a OA y de nucleósido trifosfato, dador de fosfato en la síntesis de PEP.

Como regla general, se podría afirmar que en el caso de bacterias y plantas se utilizan los nucleótidos de adenina y en las especies más evolucionadas, los de inosina o guanina.

Algunas excepciones a esta regla son la enzima de Arthrobacter (Bridgeland et al, 1967) y algunas que tienen un comportamiento intermedio como por ejemplo la del protozoo Tetrahymena pyriformis (Shrago et al, 1966), la del Bacillus stearothermophilus (Cannata et al, resultados no publicados) y la de Vibrio costicola (Salvarrey et al, resultados no publicados) que si bien actúan preferentemente con adenina pueden utilizar algunos de los otros nucleótidos.

3.3.2. Requerimiento de catión divalente

La presencia de un catión divalente es un requerimiento absoluto de la enzima independientemente de su origen (Barns y Keech, 1972b; Meyuhas et al., 1971; Felicioli et al., 1970; Ballard, 1970 y Hammond y Balinsky, 1978; Urbina et al, 1989).

El catión de elección es preferentemente el Mn^{2+} pero otros como el Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} podrían sustituirlo aunque con menor grado de eficiencia.

Estudios cinéticos de la enzima de diferentes orígenes demostraron que la actividad catalítica es máxima cuando ambos cationes el Mn^{2+} y el Mg^{2+} se hallan presentes (Utter et al, 1972; Holten et al, 1965; Lee et al, 1982; Johnson et al, 1990 y Pietrzak Roher et al, 1986). Foster y col. (1967) demostraron que incrementos en la relación Mg^{2+}/Mn^{2+} aumentan la actividad de la enzima obteniéndose máxima actividad cuando se utilizan concentraciones micromolares de Mn^{2+} y milimolares de Mg^{2+} .

En general se requieren concentraciones milimolares de Mn^{2+} cuando éste es el único catión presente; con Mg^{2+} únicamente, la actividad es muy baja y existe un efecto sinérgico en presencia de concentraciones milimolares de magnesio y micromolares de manganeso.

La enzima de levadura de panadería es activada por Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} siendo la efectividad de los cationes dependiente del pH. La actividad con manganeso o magnesio es estimulada sinérgicamente por bajas concentraciones de cadmio (Cannata et al, 1974). Un efecto sinérgico similar entre el Mn^{2+} y el Cd^{2+} ha sido hallado con la enzima de Vibrio costicola (Salvarrey et al, resultados no publicados).

En cambio, la enzima aislada de riñón de oveja presenta

una inhibición débil de tipo mixto del Cd^{2+} con respecto al Mn^{2+} (Barns et al, 1972b).

En el caso de hígado de oveja ambas isoenzimas en presencia de concentraciones milimolares de Mg^{2+} se activan con bajas concentraciones de Fe^{2+} o Mn^{2+} (Kamada et al, 1988).

La enzima aislada de Escherichia coli es activada no solo por Mg^{2+} sino también por Ca^{2+} y Mn^{2+} y estos últimos aumentan la actividad enzimática aún cuando la enzima se encuentra saturada con Mg^{2+} . La enzima pudo desensibilizarse al efecto del Ca^{2+} por tratamiento con tripsina manteniendo sin embargo el efecto del Mn^{2+} en presencia de Mg^{2+} (Goldie et al, 1980).

Resumiendo los resultados obtenidos por diferentes autores podemos decir que: el Mn^{2+} en presencia de altas concentraciones de Mg^{2+} disminuye los K_m para oxaloacetato, fosfoenolpiruvato y magnesio y aumenta la V_{max} sin influir en las afinidades del ITP, IDP o HCO_3^- (Holten et al, 1965; Brinkworth et al, 1981; Colombo et al, 1981; Lee et al, 1981; Hebda et al, 1982 y Miller et al, 1968). Por otro lado el magnesio no afecta el K_m del oxaloacetato y del fosfoenolpiruvato (Lee et al, 1981) pero aumenta la afinidad del ITP o del manganeso por la enzima (Colombo et al, 1981).

El Cd^{2+} a su vez, en presencia de concentraciones milimolares de manganeso y fijas de ADP, aumenta la afinidad de la enzima por su sustrato Mn-ADP en la reacción de carboxilación y por Mg-ATP (en presencia de

concentraciones milimolares de magnesio y fijas de ATP) en la de decarboxilación (Cannata y Flombaum, 1974).

Estas evidencias experimentales sugieren una doble función para el catión, por un lado como parte del complejo catión-nucleótido, sustrato de la reacción (función que podría ser cumplida por el magnesio o por el manganeso) y por otra como catión libre (preferentemente un metal de transición) como efector alostérico.

3.3.3. Efecto de los reactivos de tioles

Todas las PEPCK estudiadas han requerido de la presencia de sulfhidrilos libres para presentar máxima actividad. Al estudiar el efecto de reactivos de tioles sobre la actividad enzimática se ha encontrado que en general los mercuriales orgánicos han sido inhibidores potentes para las enzimas de hígado de pollo (Utter y Kurahashi, 1954b), de hígado de cerdo (Chang y Lane, 1966), de levadura de panadería (Cannata y Stoppani, 1963), de Bacillus estearotermophilus (Resultados no publicados) y de Vibrio costicola (Salvarrey et al, 1989). También se ha informado de inhibición por otros reactivos como N-etilmaleimida (Utter y Kurahashi, 1954b; Barns, 1971; Salvarrey et al, 1989) y otros aunque de menor potencia.

Estas inhibiciones han podido ser revertidas, en algunos casos, por el agregado de beta-mercaptoetanol, glutatión o DTT (Noce y Utter, 1968; Chang y Lane, 1966; Cannata y

Stoppani, 1963; Cannata y Flombaum, resultados no publicados y Salvarrey et al, 1989) o prevenidas por la presencia de alguno de los sustratos de la enzima (Cannata y Stoppani, 1963; Barns, 1971).

Con un enfoque más profundo del problema se han estudiado los residuos de cisteína, determinando su número por titulación y su rol en el mecanismo de acción de la enzima (Barns y Keech, 1968,1972; Colombo et al, 1978; Makinen y Nowak, 1989).

Makinen y Nowak (1989) han estudiado la enzima de hígado de ave utilizando la técnica de EPR. Sus resultados han revelado una cisteína altamente reactiva que no está ubicada en el sitio activo de la enzima sino en sus proximidades. Sus resultados indican que el tiol debe estar libre y reducido para que la enzima exhiba máxima actividad. Los autores postulan que la modificación de este grupo evita un cambio conformacional que normalmente ocurre luego de la unión del ligando y que es necesario para el proceso catalítico.

3.3.4. Regulación

Dado que en la mayor parte de los sistemas la PEPCK cataliza la primera etapa irreversible de la gluconeogénesis se ha sugerido que ésta podría ser la etapa limitante en dicho proceso (Williamson, 1967).

La regulación de la enzima citosólica hepática se realiza mediante el mecanismo de inducción enzimática.

Tanto en el ayuno y diabetes como en presencia de glucagon o glucocorticoides exógenos (Foster et al, 1966; Lardy et al, 1965) hay un aumento de la síntesis de esta proteína.

En resumen, en el hígado la síntesis de la enzima es regulada por la concentración relativa de glucagón e insulina y por la concentración de catecolaminas. Todos estos factores aumentan la concentración intracelular de AMPc y se ha demostrado que este incremento provoca un aumento en la velocidad de transcripción del gen que codifica para la PEPCK (Meisner et al, 1983).

En el caso de la levadura de panadería se ha descrito la regulación por ATP y ADP compatible con el principio de control de la gluconeogénesis por carga energética (Cannata y Flombaum, 1974; Cannata y Stoppani, 1963). El mismo tipo de regulación ha sido encontrado en el Bacillus stearothermophilus (Amils y Cannata, resultados no publicados).

Ruiz Amil y colaboradores (1965) han encontrado que en algunas especies de levaduras (Rhodotorula glutinis y Hansenula anomala) los niveles de PEPCK dependen de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, cuando las levaduras se cultivaban en un medio con acetato, piruvato, malato o aspartato únicamente (condiciones que favorecen una gluconeogénesis activa) la actividad de PEPCK era alta. En cambio, disminuían en un medio con glucosa (glucólisis activa).

Células crecidas sobre glucosa o glucosa más aspartato mostraron niveles de PEPCK de 10 a 100 veces menores que aquellas que eran crecidas únicamente sobre aspartato (Torrontegui et al, 1966). Estos resultados señalan a la glucosa como represor de la síntesis de la enzima.

Un mecanismo de regulación diferente se descubrió cuando estudiando el efecto de metales como el Fe^{2+} en la actividad enzimática a concentraciones milimolares de Mg^{2+} se demostró que la activación que el metal producía se perdía cuando la enzima se purificaba. Se han identificado un número de factores, denominados ferroactivadores, que permiten que la enzima sea activada por el Fe^{2+} . Ferroactivadores de citosol de hígado de rata han sido purificados a homogeneidad y extensamente caracterizados (Bentle y Lardy, 1976; Merryfield et al, 1982). También se han encontrado en riñón, eritrocitos, tejido adiposo y cerebro. Punekar y Lardy (1987) analizando el efecto del Fe^{2+} sobre la actividad enzimática en presencia y ausencia del ferroactivador concluyen que en el transcurso de la reacción se produce una autooxidación de los grupos tioles de la enzima catalizada por el metal. Este, por lo tanto estaría cumpliendo un rol dual: por un lado activaría la enzima como el Mn^{2+} y por otro la autooxidación en presencia de Fe^{2+} produciría especies reactivas del oxígeno una de las cuales podría dañar a la enzima. Los autores identifican al H_2O_2 como la especie reactiva tóxica y postulan que todos los

Introducción

factores que lo destruyan podrían actuar como ferroactivadores. De hecho, éstos autores demuestran que un ferroactivador aislado y estudiado por ellos podría ser la enzima glutatión peroxidasa (Se).

MATERIALES Y METODOS

1. Organismo

Trypanosoma cruzi, cepa Tulahuén (Tul 0), cedido por el Dr J.J. Cazzulo (Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar).

2. Reactivos

2.1. Drogas

Fosfoenolpiruvato, oxaloacetato, todos los nucleótidos, Trizma (2-amino-2-hidroximetil-1-3-propanodiol)base, PCMB, CMS, DTNB, FMA, IBz, NEM, IAM, DTT, quinolinato y agarosa- N⁶ (aminohexil) carbamoil- metil- ATP fueron obtenidos de Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.

DEAE-celulosa (0.66mEq/g) de Serva Entwicklungslabor (Heidelberg).

Albúmina sérica bovina cristalina, se compró en Armour, mientras que la ovoalbúmina, quimotripsinógeno A de páncreas bovino, Azul Dextrano 2000 y Sephadex G-200 fueron reactivos de Pharmacia (Uppsala, Suecia). La gamaglobulina humana, el citocromo c de corazón de caballo y la mioglobina de ballena fueron de Mann.

El sulfato de amonio de grado analítico, libre de piridina fué de Mallinckrodt.

El NaH¹⁴CO₃ y el agua tritiada fueron obtenidos de The Radiochemical Centre, Amersham, England por cortesía de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

La hidroxilapatita se preparó según Tiselius y col. (1956).

Las sales y otros reactivos utilizados fueron de calidad pro-análisis del más alto grado de pureza disponible.

2.2. Enzimas

Las enzimas malato deshidrogenasa de corazón de cerdo, lactato deshidrogenasa de músculo de conejo y catalasa de hígado de vaca fueron obtenidas de Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.

La proteinasa (cruzipaina) del T.cruzi fué cedida por el Dr J.J. Cazzulo (I.I.B., F.C.).

3. Método de purificación

3.1. Cultivo del parásito

Para todos los estudios realizados se utilizó la cepa Tulahuén 0 (Tul 0) de T. cruzi en el estadio epimastigote.

El medio de cultivo utilizado contenía 33 g de infusión cerebro-corazón, 3 g de triptosa, 4 g de Na_2HPO_4 , 0.4 g de KCl, 0.3 g de glucosa y 20 mg de hemina (disueltos en 4 ml de trietanolamina y 4 ml de agua) por litro (pH 7.3-7.4).

Se esterilizó durante 20 minutos a 1 atm en botellas de Roux conteniendo 100 ml cada una o en erlenmeyers de 2 litros con 400 ml cada uno. Luego se agregó suero fetal bovino (10% v/v) inactivado por calor (45 minutos a 57 °C).

Se sembró en ellos un inóculo de un cultivo en crecimiento exponencial manteniéndose a 28°C durante 7 días con agitación continua.

Al término de ese período se cosecharon las células por centrifugación a 4000g durante 15 minutos lavándose el sedimento dos veces con una solución de NaCl 0.145 M. Se conservaron las células congeladas a -20°C hasta su posterior procesamiento.

3.2. Obtención del extracto crudo

Para una preparación utilizada para la purificación de la enzima se descongelaron 27 g de células (peso húmedo) y se resuspendieron en 3 volúmenes de amortiguador borato-bórico 0.05M pH 7.5, EDTA 0.1mM. Se sometieron a un tratamiento ultrasónico de tres pulsos de 20 segundos cada uno y 50 Watts (Sonifier Cell Disruptor. Model W 185, Heat Systems-Ultrasonic Inc. Plainview, I.L., N.Y.) y el extracto obtenido se centrifugó a 20000 g durante 20 minutos sometiéndose el sedimento a un nuevo tratamiento ultrasónico en las condiciones indicadas anteriormente. Los sobrenadantes de ambos tratamientos se reunieron y se utilizaron como fuente de enzima para la posterior purificación.

Los procedimientos antes mencionados y todos los que se relacionan con la purificación de la enzima se llevaron a cabo entre 0 y 4°C.

En otros experimentos las células se sometieron a dos ciclos de congelamiento y descongelamiento en presencia de amortiguador borato-bórico 0.05M EDTA 0.1mM pH 7.5 centrifugándose los extractos luego de cada ciclo a 20000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes de ambos tratamientos se utilizaron como fuente de enzima.

Posteriormente el sedimento de la centrifugación se resuspendió en el amortiguador mencionado y se sometió a dos tratamientos con ultrasonido en las condiciones descriptas anteriormente. Los extractos obtenidos luego

de cada tratamiento se centrifugaron a 40000 rpm (Rotor 65, Ultracentrífuga Beckman, Spinco L2 65B), durante 20 minutos y los sobrenadantes se utilizaron como fuente de enzima.

3.3. Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Se realizó una precipitación fraccionada de los extractos con sulfato de amonio sólido. La mayor parte de la actividad enzimática se localizó en la fracción que precipitó entre 45 y 70% de saturación. El precipitado obtenido por centrifugación a 20000 g durante 20 minutos correspondiente a este corte se resuspendió en amortiguador borato-bórico 0.05M pH 7.5, EDTA 0.1mM.

4. Determinación de la actividad enzimática de la PEPCK.

Se ha determinado la actividad enzimática utilizando la capacidad de la PEPCK de catalizar las siguientes reacciones:

- 4.1. Carboxilación de fosfoenolpiruvato para dar oxaloacetato.
- 4.2. Decarboxilación de oxaloacetato para dar fosfoenolpiruvato.
- 4.3. Intercambio de $^{14}\text{CO}_2$ con oxaloacetato.

4.1. Reacción de carboxilación

Se utilizó un método espectrofotométrico basado en la fijación de CO_2 sobre PEP y la conversión del oxaloacetato formado en malato por acción del sistema acoplado de la enzima málico deshidrogenasa con la concomitante oxidación de la coenzima NADH. Se midió la actividad enzimática en base a la determinación espectrofotométrica a 340 nm de la variación de la concentración de NADH.

Para las medidas de rutina la mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml amortiguador Tris-Acetato 0.05 M pH 5.7; MnCl_2 3 mM; NADH 0.1 mM; ADP 0.84 mM; PEP 1.76 mM; NaCO_3H 8.5 mM; MDH 7.6 unidades enzimáticas y DTT 5 mM. La reacción se inició con el agregado de la enzima. El compartimiento de las celdas del espectrofotómetro fue termostatzado de manera que la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo a 30°C. Para éstas determinaciones se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU equipado con un convertidor Gilford y un registrador Varian.

Se definió una unidad de PEPCCK como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de NADH/min en las condiciones de ensayo descriptas.

Se utilizó también un método radioquímico basado en la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ sobre PEP y la conversión del (^{14}C)-oxaloacetato en (^{14}C)-malato por acción de la enzima málico deshidrogenasa.

La mezcla de reacción fué similar a la descripta a excepción de que la concentración de NADH fue de 0.256 mM y de que se utilizó (^{14}C) NaCO_3H 8.53 mM (1.29 uCi/umol) en un volumen final de 0.5 ml. La reacción se inició con el agregado de la enzima, la mezcla se incubó durante 10 minutos a 30°C y la reacción se frenó con 50 ul de HClO_4 2 M. Se tomaron alícuotas de 0.2 ml que se colocaron sobre discos de papel de filtro en viales de conteo. Luego de secarlos se agregó 10 ml de mezcla centelleadora (2.5 g de 2,5-difeniloxazol y 0.05 g de 1,4-bis-[5-feniloxazolil] benceno en 1 litro de tolueno) y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS 233.

Se definió una unidad de PEPCCK como la cantidad de enzima que cataliza la carboxilación de 1 umol de PEP/min en las condiciones de ensayo descriptas.

4.2. Reacción de formación de PEP

Se utilizó un método fotolorimétrico basado en la determinación del ortofosfato liberado específicamente por el ion Hg_2^{2+} del fosfoenolpiruvato formado en la reacción de decarboxilación (Lohman y Meyerhof, 1934).

Este método elimina la necesidad de utilizar un sistema enzimático acoplado que en algunos casos podría interferir con la finalidad del experimento.

En un volumen final de 1 ml la mezcla contenía Tris-Acetato 0.05 M pH 8, ATP 2 mM, oxaloacetato 0.12 mM y MnCl_2 3 mM con algunas variantes que se detallan en cada

caso. La reacción se inició con el agregado de la enzima y se frenó con 100 ul de ácido tricloroacético 15%. La determinación del ortofosfato liberado se hizo según el método de Ernster y col. (1950).

Una unidad de PEPCK se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 umol de PEP/min en las condiciones de ensayo descriptas.

4.3. Reacción de intercambio

Se basa en el intercambio de $^{14}\text{CO}_2$ con oxaloacetato en presencia de ATP y Mn^{2+} .

La mezcla de reacción contenía amortiguador Tris-Acetato 0.05 M pH 5.4; MnCl_2 1.2 mM; MgCl_2 1.35 mM; ATP 1.22 mM; oxaloacetato 13.3 mM; $(^{14}\text{C})\text{NaCO}_3\text{H}$ 1.92 umol/ml (1.29 uCi/umol) y DTT 5 mM en un volumen final de 0.5 ml.

La reacción se inició con el agregado de la enzima incubándose la mezcla durante 10 minutos a 30°C. Se terminó la reacción con el agregado de 50 ul de HClO_4 2M colocándose la mezcla inmediatamente en baño de hielo.

Posteriormente se tomaron alícuotas de 0.2ml colocándose estas sobre discos de papel de filtro en viales. Los viales se dejaron secar al vacío en un desecador sobre $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{c})$ y con $\text{NaOH}(\text{s})$ (para tomar el exceso de $^{14}\text{CO}_2$) durante la noche a temperaturas de 0 a 5°C para evitar la decarboxilación espontánea del oxaloacetato.

Se define una unidad de PEPCK como la cantidad de enzima que cataliza el intercambio de 1 umol

de $^{14}\text{CO}_2$ con oxaloacetato/min en las condiciones de ensayo descriptas.

5. Determinación de la actividad oxaloacético decarboxilásica

La determinación de esta actividad se realizó por técnicas manométricas utilizando el aparato de Warburg. Se mide así el desprendimiento de CO_2 gaseoso proveniente de la decarboxilación del oxaloacetato.

La mezcla de reacción contenía amortiguador Tris-Acetato 0.05 M pH 5.4 y oxaloacetato 13 mM en un volumen de reacción de 1 ml. Luego de 5 minutos de equilibrado a 30°C se inició la reacción por el agregado de enzima desde el bulbo lateral del vaso de reacción y se realizaron lecturas cada 5 minutos. La solución de oxaloacetato se preparó inmediatamente antes de su uso y se corrigieron los valores de decarboxilación enzimática con los de decarboxilación espontánea medidos en mezclas de reacción sin enzima.

Cuando el pH de la mezcla fue mayor que 5.4 se utilizaron frascos de Warburg con dos bulbos laterales, uno conteniendo la enzima y el otro, 100 μl de H_2SO_4 36 N. Luego de 15 minutos de incubación la reacción se detuvo agregando el ácido al compartimiento central y se midió el desprendimiento de CO_2 en los 5 minutos subsiguientes. Se definió una unidad de actividad oxaloacético decarboxilásica como la cantidad de enzima

oxaloacético decarboxilásica como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de 1 μmol de CO_2/min a partir de oxaloacetato en las condiciones de ensayo indicadas.

6. Determinación de la concentración de proteínas

El perfil de elución proteico de las distintas columnas cromatográficas se determinó utilizando el método de Warburg y Christian (1941) que permite estimar la concentración proteica en cada fracción utilizando la relación de absorbancias de la misma a 260 y 280 nm.

En los otros casos se utilizó el método de Lowry y col. (1951) con las modificaciones introducidas por Bensadaun y Weinstein (1976) para eliminar las posibles interferencias.

Estas modificaciones consisten en llevar las muestras a 3 ml con agua destilada, agregar 25 μl de deoxicolato al 2% y agitar. Después de 15 minutos precipitar con 1ml de ácido tricloroacético 24%. Las muestras se centrifugan luego a 3000 rpm durante 30 minutos y se resuspenden en la mezcla cuproalcalina de Lowry procediéndose luego en la forma usual.

7. Determinación de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la PKPCK.

7.1. Coeficiente de Sedimentación (Método de Martin y Ames, 1961).

Para la determinación de este parámetro se utilizó la técnica de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.

Se prepararon gradientes de 5 a 20% (P/V) de sacarosa en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.6 en tubos de acetato de celulosa correspondientes al rotor SW 55 Ti (Beckman Ultracentrifuge L8-70M).

Se mantuvieron los gradientes durante 15 horas a 4°C y luego se depositó en la parte superior de cada tubo 120 ul de una mezcla que contenía la preparación enzimática (20 ul de un extracto proveniente del último paso del método de purificación ya descrito con 0.157 mg/ml de proteínas y 37.4 nmol/min/ml de actividad enzimática) y las siguientes proteínas marcadoras: 10 ul de catalasa de hígado bovino (5mg/ml); 5 ul de malato deshidrogenasa de corazón porcino (0.7mg/ml); 20 ul de citocromo c de corazón de caballo (2mg/ml); 25 ul de láctico deshidrogenasa de músculo de conejo (0.2 mg/ml) y 40 ul de agua destilada.

Las centrifugaciones se realizaron a 40000 rpm a 4°C durante 13 horas al cabo de las cuales se colectaron fracciones de 150 ul desde la parte superior del

gradiente inyectando en el fondo del tubo una solución de sacarosa 2 M en Tris-HCl 50 mM pH 7.6 con una cánula conectada a una bomba peristáltica.

Los coeficientes de sedimentación ($S_{20,w}$) de las proteínas marcadoras fueron: catalasa, 11.3S; láctico deshidrogenasa, 7.3S; málico deshidrogenasa, 4.3S y citocromo c, 1.7S (Haga, T. y col, 1977).

7.1.2. Determinación de la posición de las proteínas marcadoras en los gradientes de sacarosa

a) Malato deshidrogenasa: Se determinó su actividad espectrofotométricamente midiendo la desaparición de NADH en presencia de oxaloacetato por la disminución de absorbancia a 340nm (Bergmeyer et al, 1974).

b) catalasa: Se utilizó un método espectrofotométrico que se basa en la determinación de la disminución de absorbancia a 240nm debida al consumo de H_2O_2 (Chance, 1954).

c) citocromo c: Se determinó su presencia espectrofotométricamente basándose en que su espectro de absorción presenta una banda característica, denominada de Soret a 410 nm.

d) lactato deshidrogenasa: se determinó espectrofotométricamente por el consumo de NADH en presencia de piruvato (disminución de la absorbancia a 340nm) (Bergmeyer y Bernt, 1974).

7.2. Radio de Stokes y coeficiente de difusión libre
(Ackers, 1964). Peso molecular de la enzima nativa
(Andrews, 1965).

A partir de los patrones de elución obtenidos por cromatografía en Sephadex G-200 de una preparación enzimática proveniente del último paso de la purificación (ATP-agarosa) y de una serie de proteínas marcadoras se pudieron determinar:

- el peso molecular de la holoenzima por el método de Andrews (1965).
- el radio de Stokes (a) por el método de Ackers (1964)
- el coeficiente de difusión libre, conociendo el radio de Stokes por aplicación de la ecuación de Stokes-Einstein.

Se utilizó con este fin una columna de Sephadex G-200 ([65.5 x 2]cm) equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.2 M, EDTA 0.1 mM y sulfato de amonio 5.1% pH 6.8 corrida en sentido ascendente a un flujo de 20 ml/hora. Se sembraron en ella 0.5 ml de muestra recolectándose fracciones de 1 ml.

La preparación de PEPCK utilizada contenía, en 0.5 ml de amortiguador de equilibrado, 34.5 unidades enzimáticas (método radioquímico) con una concentración proteica de 0.011 mg/ml y de sacarosa de 100 mg/ml.

El método de Andrews permite calcular el peso molecular aproximado de una proteína teniendo en cuenta el volumen

de elución de la misma y de una serie de proteínas marcadoras en una columna de filtración molecular. El método se basa en la relación lineal que existe entre el volumen de elución (v_e/v_o , normalizado con el volumen vacío) y el logaritmo del peso molecular.

El método de Ackers permite calcular el radio de Stokes de una molécula (a) a partir de su volumen de elución (V_e), del volumen interno de la columna (V_i), del volumen vacío (V_o) y del radio efectivo del poro del gel (r) por medio de la ecuación:

$$\frac{(V_e - V_o)}{V_i} = (1 - a/r)^2 [1 - 2.104 a/r + 2.09 (a/r)^3 - 0.95 (a/r)^5]$$

y de la Tabla III que figura en la publicación de Ackers en la cual se han calculado los valores de a/r para una serie de valores posibles de $(V_e - V_o)/V_i$.

Utilizando dicha tabla se han obtenido los valores de a/r a partir de valores experimentales de $(V_e - V_o)/V_i$.

Para la determinación del volumen vacío (V_o) del gel se utilizó azul dextrano 2000 que es totalmente excluido del mismo.

El volumen total (V_t) de la columna se determinó utilizando agua tritiada, que ocupa ambas fases, interna y externa del gel. La diferencia entre el volumen total y el volumen vacío es el volumen interno del gel (V_i).

El radio efectivo del poro del gel (r) fue calculado a

partir de los valores de $(V_e - V_o)/V_i$ obtenidos con una serie de proteínas con radio de Stokes conocido. Con estos datos y la mencionada Tabla III se obtuvieron los valores de a/r para las proteínas marcadoras y de éstos se calculó r .

Conocido el radio del poro del gel y la relación $(V_e - V_o)/V_i$ para la PEPCCK se calculó el radio de Stokes correspondiente a la enzima.

El coeficiente de difusión libre (D) se calculó a partir del radio de Stokes utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_{20,w} = \frac{k T}{6 \pi \eta a}$$

donde k es la constante de Boltzmann ($k = 1.38047$ J/mol/°K), T es la temperatura absoluta (293°K) y $\eta_{20,w}$ es la viscosidad del agua a 20°C ($1.1 \cdot 10^{-2}$ g/cm/seg).

7.3. Análisis de aminoácidos

Una muestra de enzima purificada a homogeneidad se dializó exhaustivamente contra 1000 volúmenes de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 10 mM pH 7 durante 3 días a 4 °C, con agitación. Las muestras se transfirieron a tubos de hidrólisis, se evaporaron e hidrolizaron en HCl (6M)/fenol (1 mg/ml) durante 24, 48 y 72 horas luego de sellarse al vacío. Los hidrolizados se secaron al vacío, se disolvieron en HCl 0.12 M y se analizaron en un analizador automático de aminoácidos Beckman 119CL con el procedimiento de González Cadavid y Paladini (1964). Los valores mostrados en la Tabla V, a menos que se indique especialmente, son los valores enteros correspondientes al promedio de los obtenidos para cada período de hidrólisis. Los valores para serina y treonina fueron extrapolados a tiempo cero. Para valina e isoleucina se utilizaron los mayores valores obtenidos. El número total de residuos de medias cistinas se determinó en el analizador de aminoácidos como ácido cisteico, luego de la oxidación con ácido perfórmico e hidrólisis de la proteína (Moore, 1963). La relación tirosina/triptofano se obtuvo del espectro ultravioleta de la enzima en NaOH 0.1 M (Beaven y Holiday, 1952). El contenido de triptofano se calculó a partir de esa relación suponiendo que los valores de tirosina obtenidos del análisis de aminoácidos era correcto.

7.4. Composición en aminoácidos y Volumen parcial específico

El valor de \bar{V} para la PEPCK purificada se calculó a partir de su composición en aminoácidos y del volumen parcial específico de los residuos de aminoácidos por el método de Cohn y Edsall (1943).

7.5. Peso molecular de la enzima nativa (Ec. de Svedberg) y cociente friccional.

Se calculó un valor más exacto del peso molecular de la enzima nativa (que el obtenido por el método de Andrews ya descrito), utilizando los valores de $S_{20,w}$, $D_{20,w}$ y \bar{V} , aplicando la ecuación de Svedberg:

$$M_r = \frac{S}{D} \cdot \frac{R T}{(1 - V_p)}$$

donde R es la constante de los gases y p es la densidad del solvente (densidad del agua a 20°C, $p_{20,w} = 0.998203 \text{ g/cm}^3$).

El cociente friccional se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$f/f_0 = a / (3 \cdot \bar{V} \cdot M / 4 \cdot \pi \cdot N)^{1/3}$$

donde N es el número de Avogadro, a es el radio de Stokes, \bar{V} es el volumen parcial específico y M es el peso molecular.

8. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La composición proteica de las preparaciones enzimáticas se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida. En condiciones no desnaturizantes, mediante el procedimiento descrito por Davis (1964) para geles en tubo que utiliza un gel de poro fino conteniendo 7.5% (P/V) de acrilamida. La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS se realizó utilizando el método de Laemmli (1970) en geles con igual grado de entrecruzamiento. En este último caso las muestras se desnaturizaron por calentamiento durante 2 minutos a 100 °C en una solución que contenía SDS 1% (P/V) y DTT 0.1 M. Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente hasta que el colorante marcador, azul de bromofenol migrara hasta el extremo inferior de la columna de gel.

Durante la corrida se mantuvo la intensidad de la corriente constante en 2.5 mA por tubo.

Los geles se fijaron y tificaron con el colorante Coomassie Brilliant Blue R 0.25% en ácido acético 9% (V/V), metanol 45% (V/V) y 46% de agua y se destiñeron por lavados repetidos en ácido acético 7%, metanol 5% y agua.

En algunos casos se utilizó la técnica de tinción con plata (Oakley et al, 1980).

El método de Weber y Osborn (1969) permitió determinar el peso molecular de la subunidad por comparación con

el comportamiento de proteínas marcadoras. Se utilizaron a tal fin: fosforilasa b (94 kD), albúmina (67 kD), ovoalbúmina (43 kD), anhidrasa carbónica (30 kD), inhibidor de tripsina (20 kD) y alfa-lactalbúmina (14.4 kD) (Manual de electroforesis en geles de poliacrilamida, Pharmacia, LKB).

En algunos casos se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y en condiciones reductoras con un sistema discontinuo para geles en placa.

Los geles de corrida fueron en ese caso de 7.5% de acrilamida y los separadores de 5%. El tratamiento de las muestras y las condiciones de corrida fueron como antes.

Las electroforesis en placa se hicieron en minigeles (aproximadamente 9.5 x 8 cm) en una cuba Mighty Small II, SE 250 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) con flujo de agua constante. La intensidad de la corriente se mantuvo durante la corrida a 10 mA por gel mientras las muestras permanecían en el gel separador elevándose a 15 mA al pasar al gel de corrida. El revelado de las bandas proteicas se hizo por tinción con plata (Oakley et al, 1980).

En todos los casos las muestras fueron dializadas exhaustivamente contra un amortiguador de baja fuerza iónica en presencia o ausencia de SDS.

9. Cromatofocado

Se preparó una columna de (7.2 x 1.5) cm con gel PBE 94 equilibrado con amortiguador Tris-Acetato 0.025M pH 8.3. Para este experimento se utilizó un extracto proveniente de la segunda etapa del método de purificación (precipitación fraccionada con sulfato de amonio, corte entre 45 y 70% de saturación) dializado previamente contra el amortiguador de equilibrio de la columna.

La elución de la misma se realizó con una mezcla de Polybuffer 96 (30%) y Polybuffer 74 (70%) que había sido ajustada a pH 5 con ácido acético diluido (1/10) recolectándose fracciones de 2 ml. En cada una se determinó el pH, la absorbancia a 280 nm y la actividad enzimática por el método radioquímico.

10. Cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC)

Para estos experimentos se utilizó un equipo de FPLC de Pharmacia (Uppsala, Suecia) con una columna de intercambio aniónico MonoQ.

En un experimento de rutina 2 ml de un extracto obtenido por precipitación con sulfato de amonio a 80% de saturación y resuspendidos en amortiguador borato-bórico 0.05M EDTA 0.1mM pH 7.5 se dializaron contra 1 litro de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.6 EDTA 0.1 mM durante 15 horas entre 0 y 5°C.

Finalizada la diálisis el extracto se centrifugó a 40000 rpm (Rotor 65, Ultracentrifuga Beckman, Spinco L2 65B)

durante 20 minutos para eliminar partículas que pudieran ocluir la columna. La concentración de proteínas en el extracto dializado fue de 7.5 mg/ml. De éste se sembraron 2.6 ml y luego de un lavado de la columna con Tris-HCl 20 mM EDTA 0.1 mM pH 7.6 para eluir el material no retenido se comenzó la elución con un gradiente continuo de NaCl hasta 0.2 M (0.3 M en algunos experimentos) en el mismo amortiguador. Terminado el gradiente se llevó la concentración de NaCl a 1 M. Se colectaron fracciones de 0.5 ml determinando su absorbancia 280 nm a la salida de la columna. En cada fracción se determinó la actividad carboxiquinásica de intercambio y en algunos casos también la actividad oxaloacético decarboxilásica según se describe en este capítulo.

11. Determinación de la actividad proteolítica

El método de determinación se basa en la posibilidad de separar cuantitativamente un sustrato proteico no degradado de los fragmentos producidos durante la proteólisis y la cuantificación de éstos en los sobrenadantes.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 40 ul: amortiguador Tris-Ac 0.075 M pH 6; 5 o 10 ul de (^{14}C)Hemoglobina 0.075 mg/ml (6.53 uCi/ug), 10 ul de una preparación enzimática de PEPCK proveniente del último paso de la purificación (1.8 U/mg) y en algunos casos

beta-mercaptoetanol 0.03 M.

La incubación se realizó durante 1 hora a 30°C o 50 minutos a 37°C. Finalizada ésta se agregó 50 ul de caseína (5 mg/ml) manteniéndose a 0°C durante 30 minutos.

La proteína no degradada se precipitó entonces con 100 ul de TCA 15%. Se centrifugó la mezcla durante 5 minutos en centrífuga Eppendorf y se tomaron 150 ul del sobrenadante colocándose los sobre 5 ml de la mezcla centelladora de Bray (60 g de naftaleno, 4 g de PPO, 0.2 g de POPOP, metanol abs. 100 ml, 20 ml de etilen glicol y dioxano c.s.p. 1 litro). La radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Tracor Analytic-Delta 300 (6891).

12. Cálculo de las concentraciones reales del complejo catión-nucleótido, nucleótido libre y catión libre

Para realizar estos cálculos se plantearon las ecuaciones que vinculan a las distintas especies presentes en las mezclas de reacción teniendo en cuenta que a los pHs utilizados sólo las especies que se indican existen en cantidades significativas.

Se consideró:

a= la concentración total de nucleótido presente

b= la concentración total de metal presente

x= la concentración del nucleótido libre

y= la concentración del nucleótido protonado libre

z= la concentración del complejo metal-nucleótido

w= la concentración del complejo metal-nucleótido
protonado

m= la concentración del metal libre

Las ecuaciones de balance de masa para cada especie son:

$$a = y + x + w + z \quad (1)$$

$$b = m + w + z \quad (2)$$

La constante de disociación del nucleótido está dada por la siguiente expresión:

$$K_a = (H^+) \cdot x / y$$

y, llamando a la relación $x / y = k$ (3) se puede deducir que:

$$-\log k = pK_a - pH$$

Las constantes de formación de los complejos metal-nucleótido y metal-nucleótido protonado pueden expresarse de la siguiente manera:

$$K_1 = z / x \cdot m \quad (4)$$

$$K_2 = w / y \cdot m \quad (5)$$

La resolución del sistema de ecuaciones 1, 2, 3, 4 y 5 permite llegar a una ecuación de segundo grado :

$$(k / K_1 \cdot o + o / K_2) z^2 - (o \cdot a / K_2 + (k+1) / K_1 \cdot K_2 + k \cdot b / K_1 + b / K_2) z + a \cdot b / K_2 = 0$$

$$\text{donde } o = k \cdot (K_2 / K_1) + 1$$

Si llamamos A al coeficiente de z^2 , B al de z y C al restante término la resolvente de la ecuación arriba mencionada será:

$$z = \frac{-B \pm (B^2 - 4AC)^{1/2}}{2.A}$$

y conociendo z se podrán conocer las concentraciones de las otras especies reemplazando en las ecuaciones correspondientes.

Los valores de las constantes utilizados fueron los siguientes:

$pK_a (\text{ATPH}^{3-}) = 6.97$; $K_f (\text{MnATP}^{2-}) = 56.2 \text{ mM}^{-1}$;
 $K_f (\text{MnATPH}^{1-}) = 0.246 \text{ mM}^{-1}$ (O'Sullivan y Perrin, 1964; Walaas, 1958 y Kahn y Martell, 1962).

Cada punto experimental se determinó por duplicado. Los parámetros de los sistemas con cinética hiperbólica se determinaron de los gráficos de Lineweaver-Burk y en los casos de cinéticas sigmoideas se determinaron el $S_{0.5}$ y el coeficiente de cooperatividad de los gráficos de Hill.

Todos los cálculos se hicieron por el método de cuadrados mínimos.

RESULTADOS

1. Método de purificación

Para la purificación de la enzima las células se sometieron al tratamiento con ultrasonido (dos ciclos) utilizándose los sobrenadantes de las centrifugaciones de los extractos como fuente de enzima (Ver Materiales y Métodos).

Dichos sobrenadantes se sometieron a la precipitación fraccionada con sulfato de amonio (corte entre 45 y 70% de saturación) resuspendiéndose el sedimento de la centrifugación en amortiguador borato-bórico 0.05 M pH 7.5 EDTA 0.1 mM (Ver Materiales y Métodos).

1.1. Cromatografía en columna de Sephadex G-200

El extracto obtenido de la precipitación fraccionada se sembró en una columna de Sephadex G-200 (4 x 40) cm equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.2M EDTA 0.1mM y sulfato de amonio 5.1% ajustado a pH 6.8.

Se eluyó la columna con el mismo amortiguador y se recogieron fracciones de aproximadamente 10 ml.

La concentración de proteínas en cada fracción se estimó por el método de Christian y Warburg (1941) según se detalla en Materiales y Métodos.

La actividad enzimática se determinó por el método radioquímico de intercambio (figura 9), se juntaron las fracciones con mayor actividad específica y se precipitó la proteína con sulfato de amonio (80% de

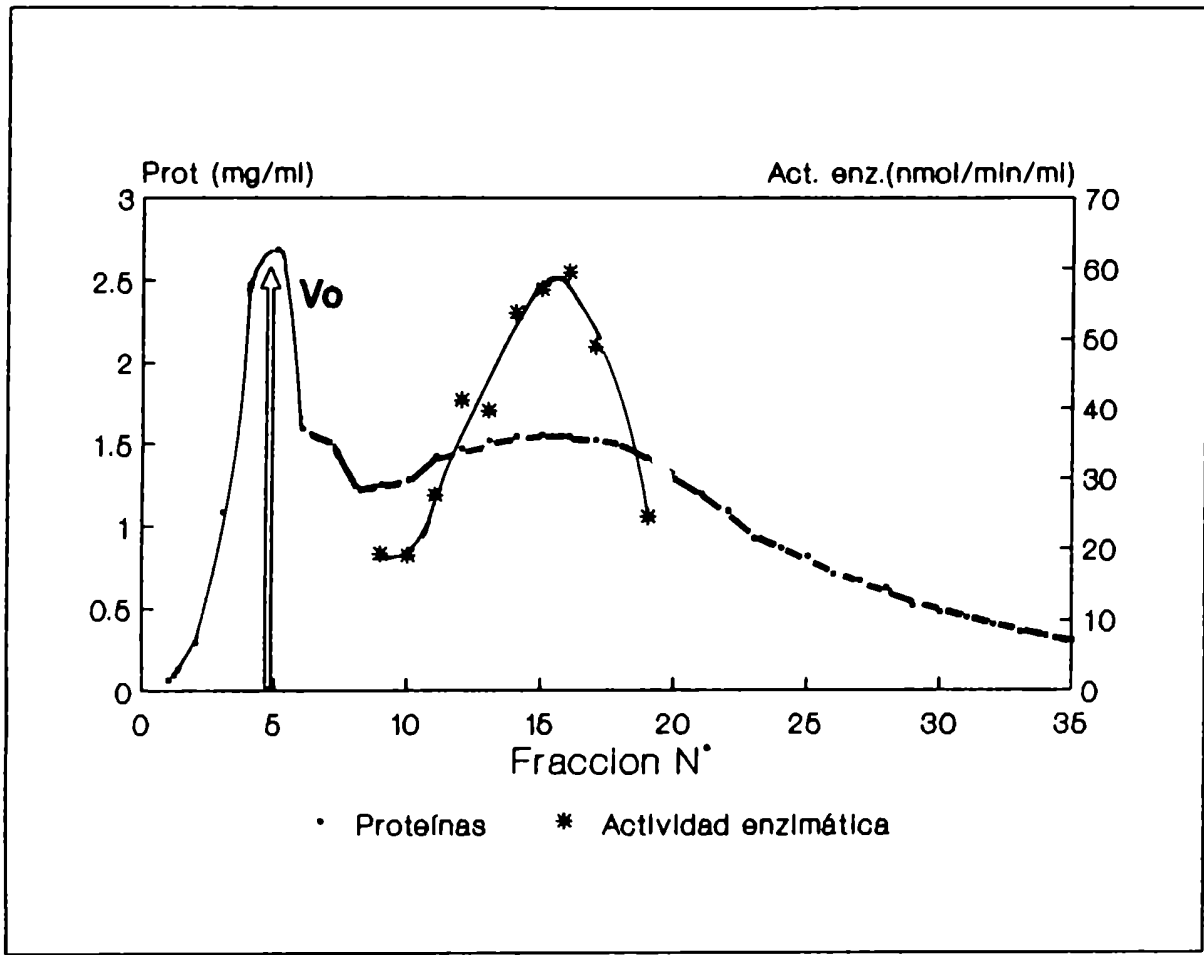


Figura 9: Perfil de elución típico de una columna de Sephadex G-200 (Cromatografía de filtración en geles).

En este experimento se sembraron 5 ml (135mg de proteínas) de una preparación proveniente de la precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en una columna de 4 x 40 cm equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.2M, EDTA 0.1 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.1% pH 6.8. El volumen de cada fracción fué de 10ml.

La calibración de la columna con azul dextrano indicó un volumen de exclusión (V_o) de 69 ml.

Otras condiciones fueron similares a las detalladas en el texto.

saturación) manteniéndose el pH neutro por agregado de hidróxido de amonio concentrado. El precipitado obtenido por centrifugación a 8000g durante 25 minutos se resuspendió en amortiguador de fosfatos 0.01 M EDTA 0.1 mM pH 6.8.

En varias ocasiones se obtuvo una recuperación de la actividad enzimática mayor al 100% de la actividad sembrada en la columna de Sephadex G-200 (Tabla II). Este efecto no se observó cuando se utilizaron preparaciones de mayor grado de purificación (5° etapa del método de purificación: cromatografía en hidroxilapatita). Estos resultados podrían sugerir la presencia de un inhibidor endógeno de la enzima en los extractos crudos, aún no identificado, que es eliminado durante el proceso de filtración a través del gel.

1.2. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa

El extracto obtenido en el paso anterior se dializó contra amortiguador de fosfatos 0.01M EDTA 0.1mM pH 6.8 durante toda la noche y se sembró en una columna de DEAE-celulosa ([2.5 x 16]cm) previamente equilibrada con el mismo amortiguador de la diálisis.

La columna se eluyó aumentando la concentración de fosfato en etapas: 0.01, 0.02 y 0.05M respectivamente recogiendo fracciones de 6 ml. Las fracciones de mayor actividad específica eluyeron con 0.02 M de fosfato (figura 10).

Resultados

Tabla II: Activación de la PEPCCK por filtración a través de una columna de Sephadex 6-200.

Etapa de purificación de la cuál proviene la preparación utilizada	% de recuperación de la actividad total sembrada					
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6
Fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	145	304	235	138	194	
Cromatografía en hidroxilapatita						62

Los exp. 1, 2 y 3 corresponden a una misma preparación, ídem para 4 y 5.

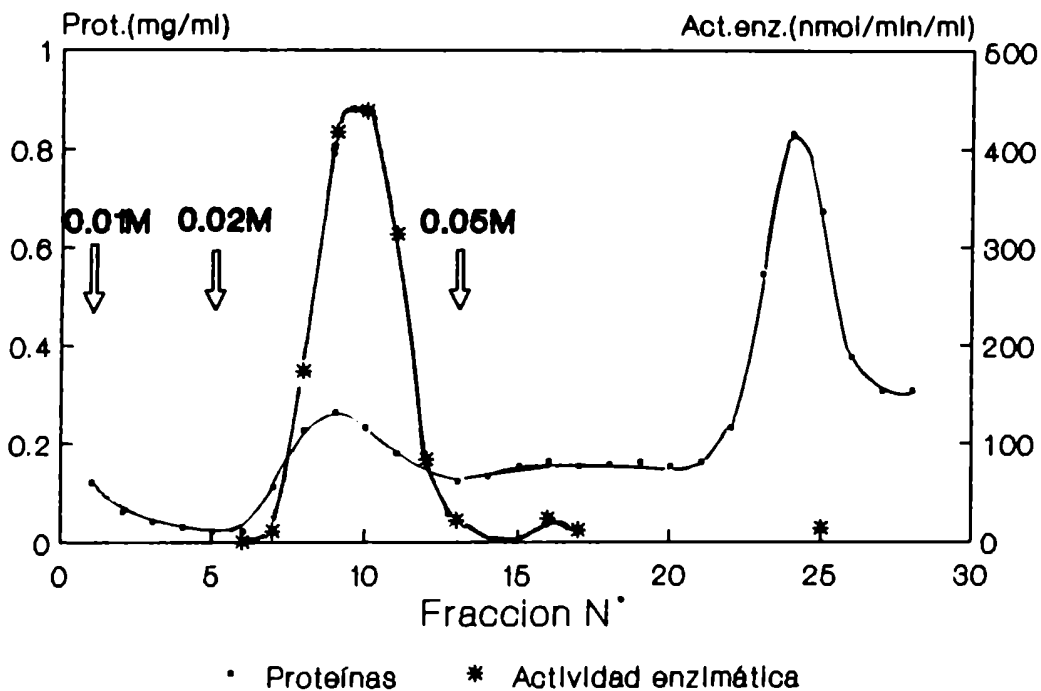


Figura 10: Diagrama de elución de una columna de DEAE-celulosa.

En este experimento se utilizó una preparación proveniente de la etapa de filtración en geles sembrándose 13.2ml de muestra (272mg de proteínas) en una columna de 2.5 x 16cm previamente equilibrada en amortiguador de fosfatos 0.01M EDTA 0.1mM pH 6.8.

La elución se realizó aumentándose la concentración del amortiguador de fosfatos por etapas (0.01M, 0.02M y 0.05M) y el volumen de cada fracción fué de 6 ml.

Otras condiciones experimentales se detallan en el texto.

La concentración de proteínas se estimó como ya se ha descrito y la actividad enzimática utilizando el método espectrofotométrico (reacción de carboxilación).

1.3. Cromatografía en columna de hidroxilapatita

El conjunto de fracciones con mayor actividad específica eluidas de la columna de DEAE-celulosa se sembró en una columna de hidroxilapatita ([2 x 5] cm) equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.01 M EDTA 0.1 mM pH 6.8. La elución de la columna se realizó en etapas elevando sucesivamente la concentración de fosfatos primero a 0.15 M y luego a 0.2 M. Se juntaron fracciones de 3 ml (figura 11).

La concentración proteica de cada fracción se estimó como se describió anteriormente y la actividad enzimática por el método de intercambio.

Se reunieron las fracciones de mayor actividad específica eluidas con el amortiguador 0.2 M y la mezcla se dializó contra una solución saturada de sulfato de amonio en amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5 durante tres días. El precipitado obtenido se centrifugó a 25000rpm (rotor 65, centrifuga Beckman, Spinco, L2 65B) durante 30 minutos y se resuspendió en amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5.

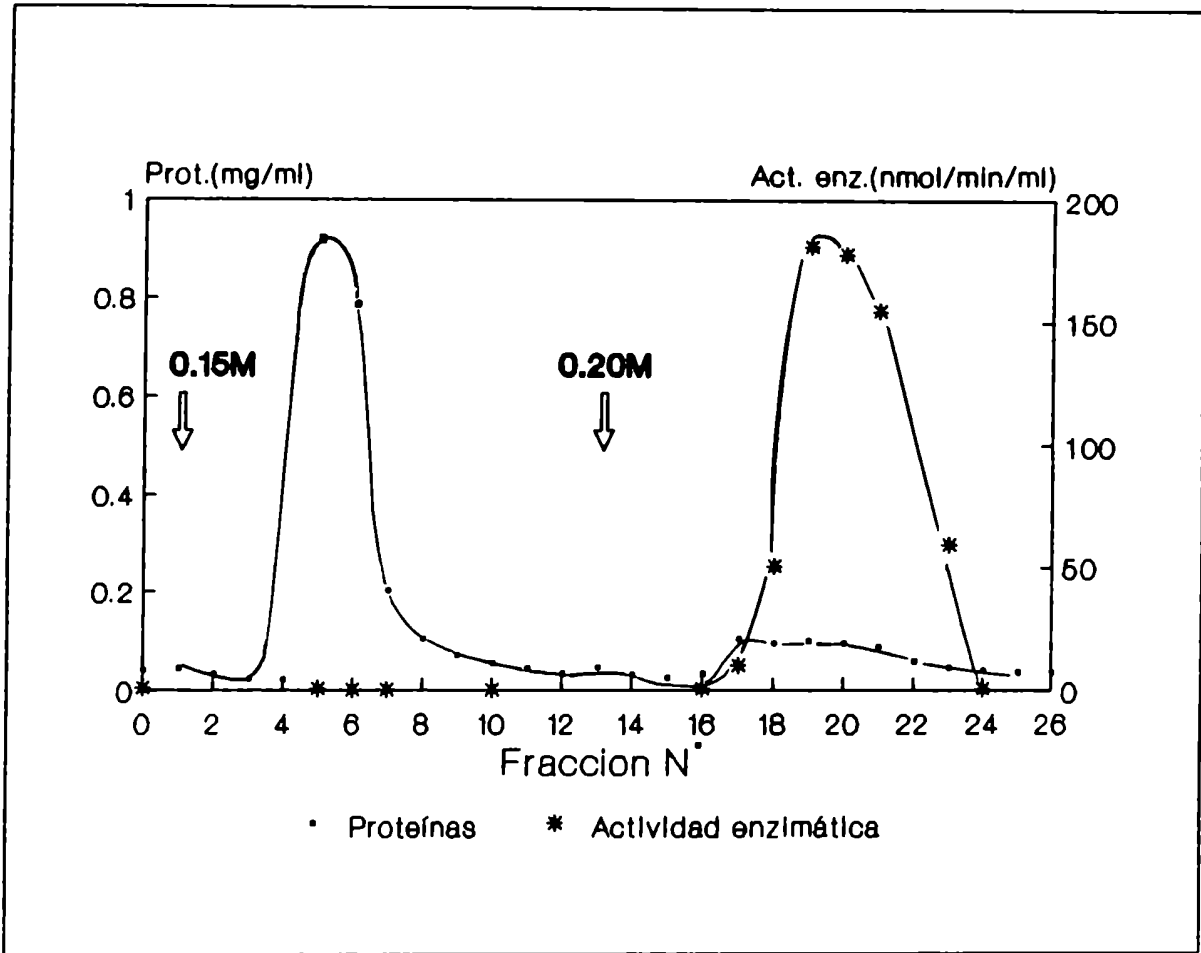


Figura 11: Cromatografía en columna de hidroxilapatita.

Diagrama de elución típico de una columna de hidroxilapatita de 2 x 5cm equilibrada en amortiguador de fosfatos 0.01M EDTA 0.1mM pH 6.8 en la que se ha sembrado una preparación proveniente de la etapa de DEAE-celulosa.

El volumen sembrado fué de 148 ml (10.5 mg de proteínas) y la elución se realizó elevando sucesivamente la concentración de fosfatos primero a 0.15M y luego a 0.20M. El volumen de cada fracción fué de 3ml.

Otras condiciones experimentales se describen en el texto.

1.4. Cromatografía en columna de ATP-agarosa

Se dializó el extracto proveniente de la etapa anterior contra amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.6 EDTA 0.1 mM durante toda la noche. Se agregó $MnCl_2$, $MgCl_2$ y DTT hasta una concentración final de 2, 1 y 0.1 mM respectivamente y se sembró en una columna de ATP-agarosa ([0.8 x 2.5]cm) equilibrada con el mismo amortiguador que el utilizado en la diálisis pero con el agregado de DTT, $MnCl_2$ y $MgCl_2$ en idénticas concentraciones que la muestra. La elución se llevó a cabo en dos etapas: en la primera se utilizó el mismo amortiguador pero con una concentración de EDTA de 4 mM y en la segunda, amortiguador de fosfatos 0.2 M conteniendo sulfato de amonio 5.1% y EDTA 4 mM, colectándose fracciones de 1.4 ml.

Se determinó la actividad en las fracciones por el método radioquímico de intercambio. Las fracciones con mayor actividad específica eluyeron en la segunda etapa (figura 12) y se reunieron y concentraron por diálisis contra amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5 saturado con sulfato de amonio. Se centrifugó el extracto a 25000rpm (rotor 65, ultracentrífuga Beckman, Spinco, L2 65B) durante 30 minutos y se resuspendió el precipitado en amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH7.5.

Los resultados de una purificación típica se incluyen en la Tabla III.

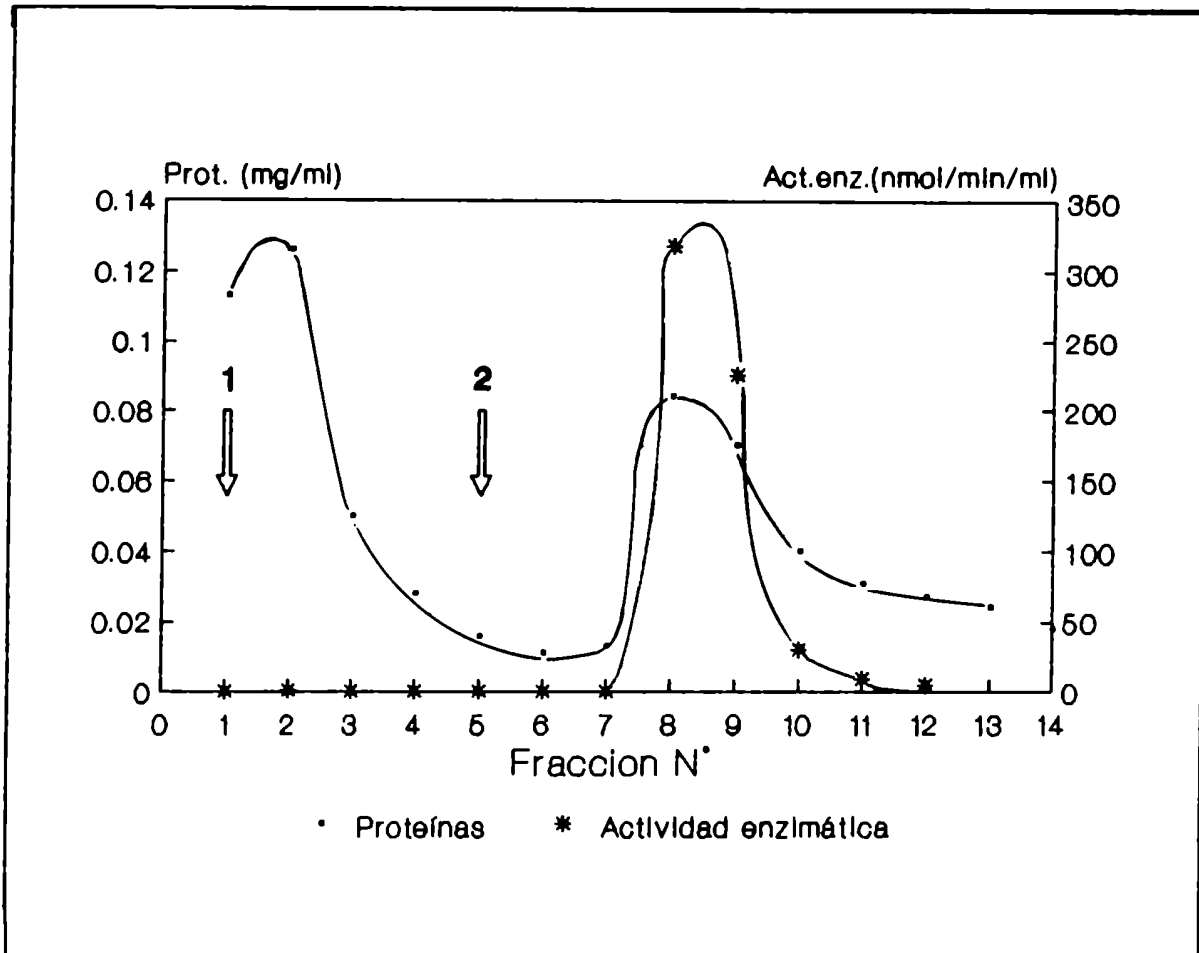


Figura 12: Diagrama de elución de una columna de ATP-agarosa.

En este experimento se sembraron 2.6ml (1.3mg de proteínas) de un extracto dializado proveniente de la cromatografía en hidroxilapatita según se detalla en el texto. La elución de la columna (0.8 x 2.5cm) se realizó en dos etapas:

- 1) Tris-HCl 20mM pH 7.6, EDTA 4mM, DTT 0.1mM.
- 2) Fosfatos 0.2M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.1%, EDTA 4mM.

El volumen de cada fracción fué de 1.4ml.

Tabla III: Cuadro de purificación

Etapa de purificación	Protelna total ^{¶¶} (mg)	Actividad Especifica [¶] (nmol/min/mg)	Purificación (veces)	Actividad Total [¶] (nmol/min)	Recuperación (%)
1.Extracto crudo	1394.0	12.82	1.0	17939	100.0
2.Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ . Corte entre 45 y 70%.	490.3	42.32	3.3	20754	116.0
3.Sephadex 6-200	111.6	158.08	12.3	17642	98.3
4.DEAE-celulosa	23.4	262.09	20.4	6129	34.2
5.Hidroxilapatita	1.7	1839.04	143.5		17.6
6.ATP-agarosa	0.2	6254.08	487.8	1287	7.2

(¶) La actividad enzimática se determinó por el método radioquímico de intercambio (Mat. y Met.)

(¶¶) La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. modificado (Mat. y Met.)

1.5. Criterio de pureza

Para evaluar el grado de purificación obtenido en cada paso del método antes descrito y como control de la homogeneidad proteica alcanzada luego de la última etapa, las muestras provenientes de los distintos pasos fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando la técnica de Davis o de Laemmli para geles en tubo según se describe en Materiales y Métodos (figura 13).

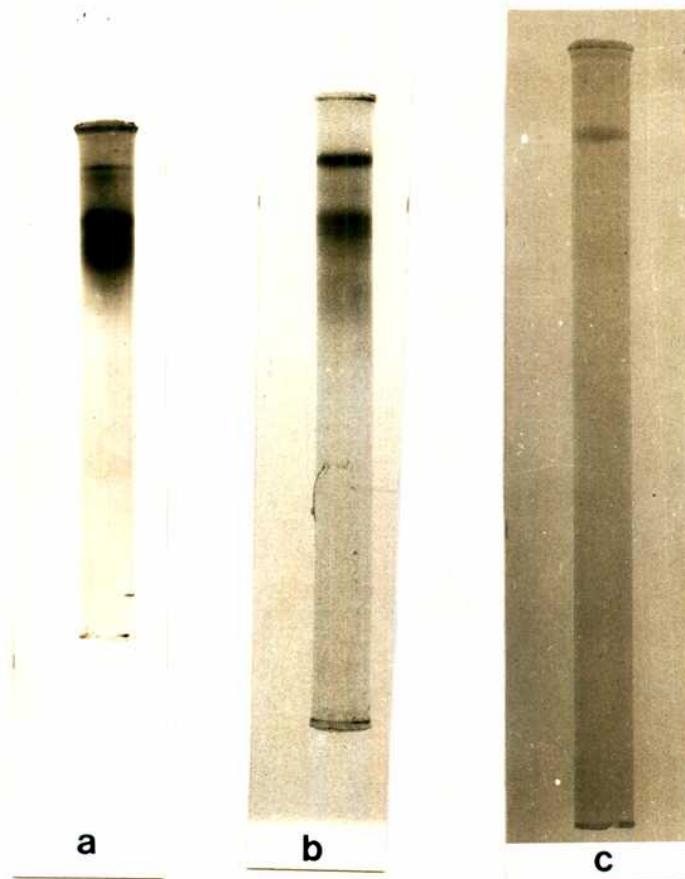


Figura 13: Electroforesis en geles de poliacrilamida de preparaciones de PEPCK provenientes de distintas etapas de la purificación.

Las electroforesis se realizaron en geles en tubo de 7.5% de acrilamida según lo descrito en Materiales y Métodos.

a) preparación proveniente de la etapa de cromatografía en DEAE-celulosa.

b) idem de hidroxilapatita.

c) idem de ATP-agarosa.

a y b : electroforesis en condiciones no disociantes

c: electroforesis en presencia de SDS

2. Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la PEPCCK

2.1. Coeficiente de Sedimentación (Método de Martin y Ames)

Una preparación enzimática proveniente de la última etapa de la purificación sedimentó formando un pico simétrico en una centrifugación en gradiente de sacarosa.

En la figura 14 se representa la distancia recorrida por cada proteína marcadora desde el borde superior del gradiente hasta la posición alcanzada al finalizar la centrifugación (r), en función de su coeficiente de sedimentación.

De estos experimentos se deduce que el coeficiente de sedimentación correspondiente a la PEPCCK es de $6.7 \cdot 10^{-13}$ seg.

2.2. Radio de Stokes y coeficiente de difusión libre (Método de Ackers). Peso molecular de la enzima nativa (Método de Andrews)

En la tabla IV se muestran los volúmenes de elución correspondientes a las proteínas marcadoras y a la PEPCCK en la columna de Sephadex G-200 corrida según se describe en Materiales y Métodos. También se incluyen los valores obtenidos con azul dextrano y agua tritiada que permitieron determinar los parámetros de la columna. De acuerdo con estos valores y conocidos los radios de

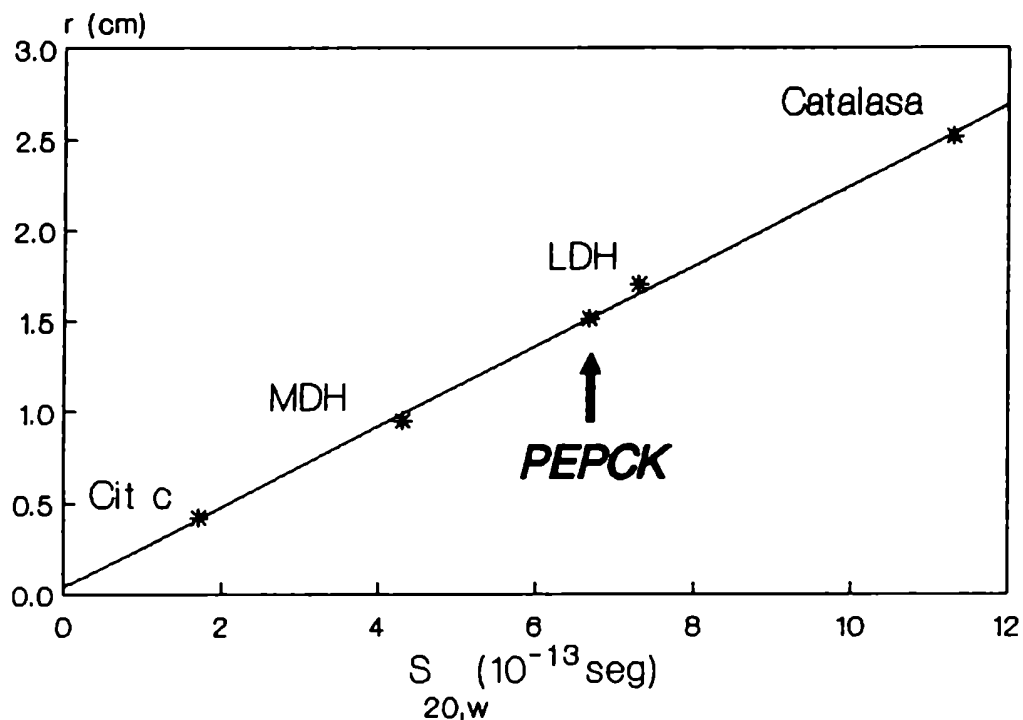


Figura 14: Determinación del coeficiente de sedimentación de la PEPCK por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. En la figura se representa la distancia recorrida por cada proteína marcadora en el gradiente en función de su coeficiente de sedimentación y se indica el coeficiente de sedimentación correspondiente a la PEPCK. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los coeficientes de sedimentación correspondientes a las proteínas marcadoras fueron: citocromo c, $1.7 \cdot 10^{-13}$ seg; Máfico Deshidrogenasa, $4.3 \cdot 10^{-13}$ seg; Láctico Deshidrogenasa, $7.3 \cdot 10^{-13}$ seg y catalasa, $11.3 \cdot 10^{-13}$ seg (Haga et al, 1977).

Tabla IV: Calibración de la columna de Sephadex 6-200

Especie molecular	Volumen de elución (ml)	Radio de Stokes‡ (Å)	Radio del poro del gel (Å)
Azul Dextrano	42.27		
Gamma globulina	56.00	55.8	164
Albúmina Bovina	77.50	35.5	188
Ovoalbúmina	88.80	30.5	224
Quimotripsinógeno A	95.50	20.9	192
Aldolasa	64.50	48.1	180
Agua Tritiada	129.00		
PEPCK	69.70	44.56	190

‡ Los radios de Stokes correspondientes a las proteínas marcadoras se obtuvieron del prospecto correspondiente al kit de proteínas marcadoras para cromatografía de filtración en geles de Pharmacia, LKB.

Stokes de las proteínas marcadoras se calculó el radio promedio del poro del gel que resultó ser de 190 \AA y con éste el radio de Stokes de la PEPCK por el método de Ackers (1964) (según se describe en Materiales y Métodos) que fue de 44.56 \AA .

Utilizando la ecuación de Stokes-Einstein se calculó el coeficiente de difusión libre el cual resultó ser de $4.90 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$.

Se determinó también el peso molecular de la enzima nativa utilizando el método de Andrews (1965) descrito en Materiales y Métodos.

En la figura 15 se representa el peso molecular en función del volumen de elución normalizado para las proteínas marcadoras utilizadas en la corrida y para la PEPCK. De este gráfico se deduce un peso molecular para la PEPCK de 116.000 Da.

2.3. Composición en aminoácidos y volumen parcial específico

La composición en aminoácidos de la PEPCK del T. cruzi determinada como se describe en Materiales y Métodos se muestra en la Tabla V. A partir de ésta se calculó un volumen parcial específico, \bar{V} , de $0.730 \text{ cm}^3/\text{g}$ utilizando el método de Cohn y Edsall (1943).

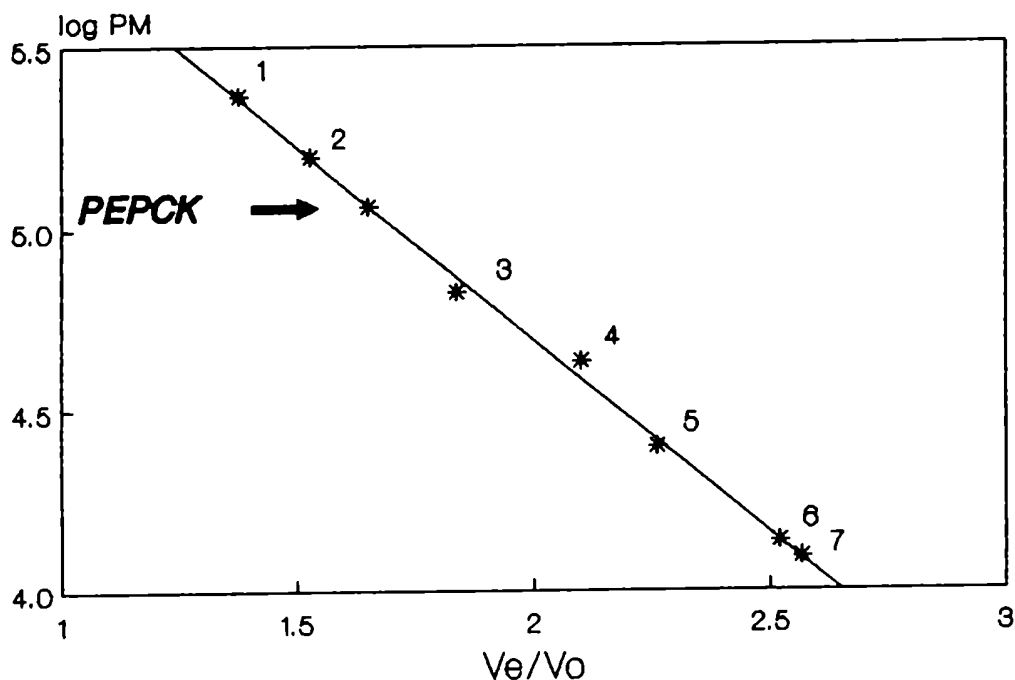


Figura 15: Determinación del peso molecular de la enzima nativa por el método de Andrews.

Representación del logaritmo del peso molecular (log PM) de las proteínas marcadoras en función del volumen de elución normalizado (V_e/V_o) correspondiente. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

1. Catalasa (232 kDa); 2. Aldolasa (158 kDa);
 3. Albúmina (67 kDa); 4. Ovoalbúmina (43 kDa);
 5. Quimotripsinógeno (25 kDa); 6. Ribonucleasa A (13.7 kDa);
 7. Citocromo c (12.4 kDa).

Los valores de peso molecular correspondientes a las proteínas marcadoras se obtuvieron del folleto correspondiente al kit de proteínas para calibración de columnas de filtración en geles de Pharmacia, LKB.

Tabla V: Composición de aminoácidos de la PEPCK del T.cruzi

Aminoácido	Cantidad de aminoácido luego de una hidrólisis de			Valor tomado [b]	Residuos integrales	
	24 hrs	48 hrs	72 hrs		Subunidad	Dímero
	(número de residuos)[a]					
Lisina	28.4	39.2	43.8	41.5 [c]	42	84
Arginina	28.6	25.9	33.5	29.3	29	58
Aspartato	52.1	60.3	60.9	57.5	58	116
Treonina	40.0	38.0	33.5	43.7 [d]	44	88
Serina	37.7	33.4	28.6	42.3 [d]	42	84
Glutamato	41.0	56.9	29.6	42.5	43	86
Prolina	4.0	16.4	16.6	16.5 [c]	17	34
Glicina	54.4	45.9	57.2	52.5	53	106
Alanina	46.4	49.2	52.3	49.3	49	98
Valina	33.9	41.9	39.4	40.7 [c]	41	82
Isoleucina	23.1	21.4	29.3	29.3 [e]	29	58
Leucina	43.0	45.8	47.3	45.4	46	92
Tirosina	14.4	15.9	13.5	14.6	15	30
Fenilalanina	46.8	21.4	22.9	22.2 [c]	22	44
Histidina	12.0	19.7	20.6	20.3	20	40
Media Cisteína				21.7 [f]	22	44
Metionina		1.5	1.7	1.6	2	4
Triptofano				2.4 [g]	2	4

[a]: El número de residuos de cada aminoácido se obtuvo considerando un peso molecular para la subunidad de 61000 Da.

[b]: El valor indicado es, salvo indicación, el promedio de los valores obtenidos con los tres tiempos de hidrólisis.

[c]: Los valores indicados son el promedio de los obtenidos a las 48 y 72 horas de hidrólisis.

[d]: Los valores indicados son los obtenidos por extrapolación a t=0 de hidrólisis.

[e]: El valor indicado es el máximo valor obtenido.

[f]: Se determinó como ácido cisteico según se indica en Materiales y Métodos.

[g]: Se obtuvo por el método espectrofotométrico según se indica en Materiales y Métodos.

2.4. Determinación del peso molecular de la enzima nativa utilizando el volumen parcial específico, el coeficiente de sedimentación y el coeficiente de difusión libre (Kc. de Svedberg). Cociente friccional.

Se calculó un valor más preciso del peso molecular de la enzima nativa mediante la ecuación de Svedberg según se describe en Materiales y Métodos. De esta forma el peso molecular de la PEPCK fue estimado en 123 kDa, valor que concuerda, dentro del error experimental con el obtenido por el método de Andrews.

El cociente friccional f/f_0 calculado según se indica en Materiales y Métodos fue de 1.36 lo que sugiere una molécula ligeramente asimétrica.

2.5. Determinación del peso molecular de la subunidad

Se determinó este parámetro mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes según se detalló en Materiales y Métodos.

Con este fin se corrieron paralelamente dos geles sembrando en uno la muestra y en el otro las proteínas marcadoras de pesos moleculares conocidos (Manual Electroforesis en geles de poliacrilamida, Pharmacia).

Se construyó la curva de calibración graficando el log del peso molecular vs el R_f , donde R_f es la relación entre la distancia recorrida por la correspondiente banda proteica y la recorrida por el colorante marcador.

En base al Rf de la enzima se pudo calcular un valor del peso molecular de la subunidad de 61 kDa (figura 16).

2.6. Determinación del punto isoeléctrico

Los resultados de un experimento de cromatofocado se muestran en la figura 17 . El valor de pI se consideró como el del pH correspondiente a la fracción de máxima actividad enzimática (determinado por triangulación del pico de actividad enzimática).

El punto isoeléctrico de la PEPCK determinado por éstos experimentos fue de 7.3 .

En la Tabla VI se resumen los parámetros fisicoquímicos de la PEPCK purificada de T. cruzi.

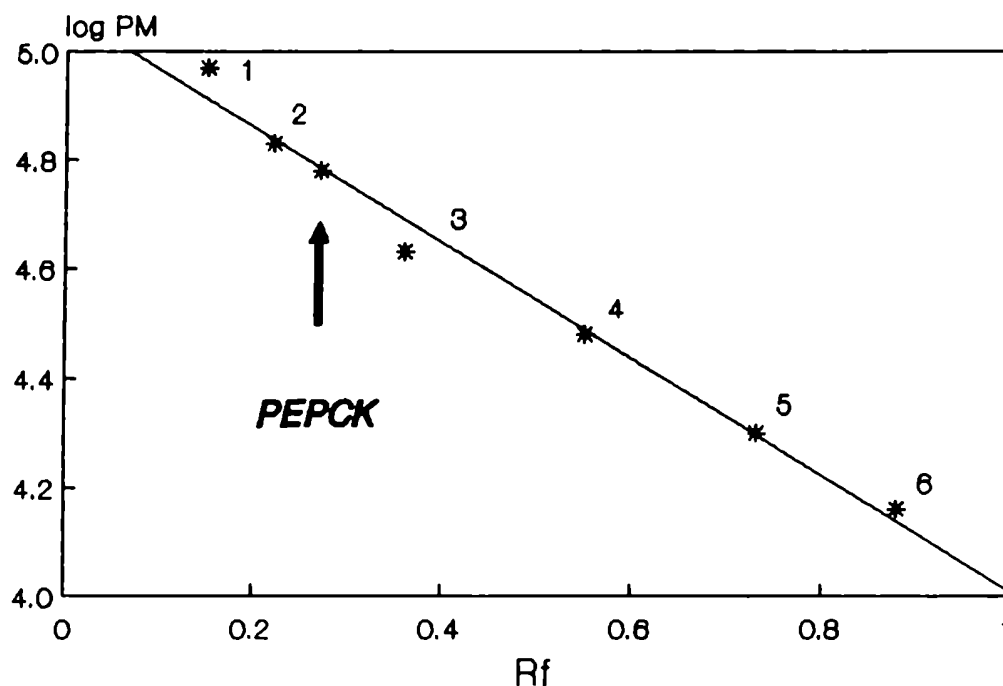


Figura 16: Determinación del peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Las electroforesis se realizaron utilizando el sistema discontinuo de Laemmli en geles disociantes según se describe en Materiales y Métodos. En la figura se representa el log PM vs el Rf (distancia recorrida por cada banda en relación a la distancia recorrida por el frente) para las proteínas marcadoras y se indica el PM correspondiente a la PEPCK.

1. Fosforilasa b (PM subunidad 94 kDa); 2. Albúmina (67 kDa); 3. Ovoalbúmina (43 kDa); 4. Anhidrasa Carbónica (30 kDa); 5. Inhibidor de Tripsina (20 kDa); 6. alfa-Lactalbúmina (14.4 kDa). Los valores de peso molecular de las proteínas marcadoras se obtuvieron del folleto correspondiente al kit de proteínas para electroforesis en condiciones disociantes de Pharmacia, LKB.

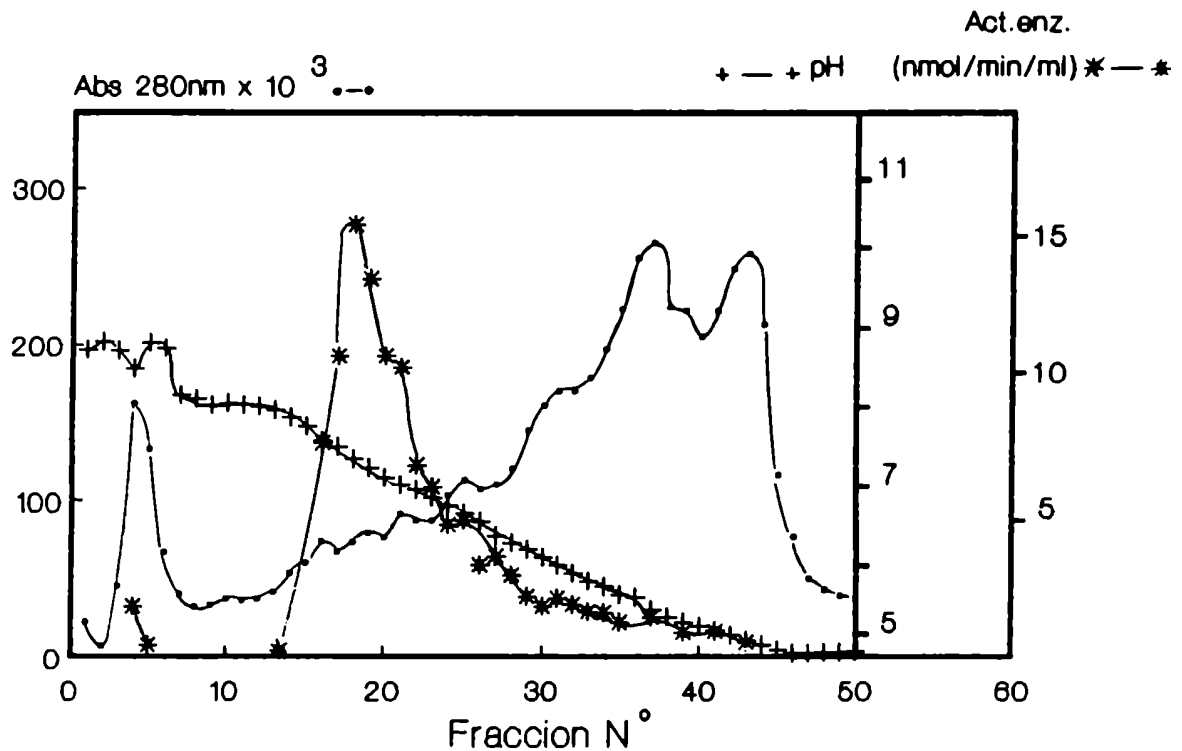


Figura 17: Experimento de cromatofocado de un extracto obtenido de la segunda etapa del método de purificación (precipitación fraccionada con sulfato de amonio).

Se dializaron 2 ml de extracto (54.6 mg de proteínas) contra 500 ml de amortiguador Tris-Ac 0.025 M pH 8.3 durante 20 horas (Volumen final= 3 ml).

La muestra se sembró en una columna de gel PBE 94 (7.1 x 1.5 cm) equilibrada con Tris-Ac 0.025 M pH 8.3 y se eluyó con una mezcla de polybuffer 96 (30%) y polybuffer 74 (70%) ajustada a pH 5 con ácido acético. Se juntaron fracciones de 2 ml. Otras condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

Tabla VI: Parámetros hidrodinámicos de la PEPCK de T. cruzi.

Parámetros	Método	Valor
Coefficiente de sedimentación ($S_{20,w}$)	Velocidad de sedimentación (Método de Martin y Ames)	$6.7 \cdot 10^{-13}$ seg
Radio de Stokes (a)	Filtración por gel (Método de Ackers)	44.56 Å
Coefficiente de difusión libre ($D_{20,w}$)	A partir del radio de Stokes (Ec. de Stokes-Einstein).	$4.9 \cdot 10^{-7}$ cm ² seg ⁻¹
Volumen parcial específico (\bar{V})	A partir de la composición de aminoácidos.	0.730 cm ³ /g
Peso molecular (M)	A partir de los datos de $D_{20,w}$, $S_{20,w}$ y \bar{V} .	123000 Da
	Filtración por gel (Método de Andrews)	116000 Da
Peso molecular de la subunidad	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.	61000 Da
Cociente Friccional	A partir de los datos de \bar{V} y M.	1.36
Punto isoeléctrico	Cromatofocado	7.3

3. Características cinéticas

3.1. Dependencia de la actividad enzimática con el pH

La PEPCK aislada de T. cruzi muestra un comportamiento distinto de la actividad enzimática con respecto al pH según se trate de la reacción de carboxilación, decarboxilación (formación de PEP) o intercambio. Con una preparación proveniente del último paso del método de purificación descrito oportunamente (ATP-agarosa) se ensayó la actividad enzimática en función del pH para las tres reacciones catalizadas por la enzima. Los resultados, según se muestra en la figura 18, indican que el pH óptimo para las reacciones de carboxilación, decarboxilación e intercambio son respectivamente 6.55; 7.76 y 6.48.

Los pH indicados corresponden a los pH reales medidos en mezclas de reacción simuladas en las que se ha reemplazado la enzima por el amortiguador en el que ésta se encuentra.

Se determinó también la actividad enzimática para las tres reacciones a sus pHs óptimos y a un pH intermedio de 7.

En ambos casos la actividad de formación de PEP es alrededor de 10 veces mayor que la de carboxilación y ésta última es al menos el doble de la actividad de intercambio (Tabla VII).

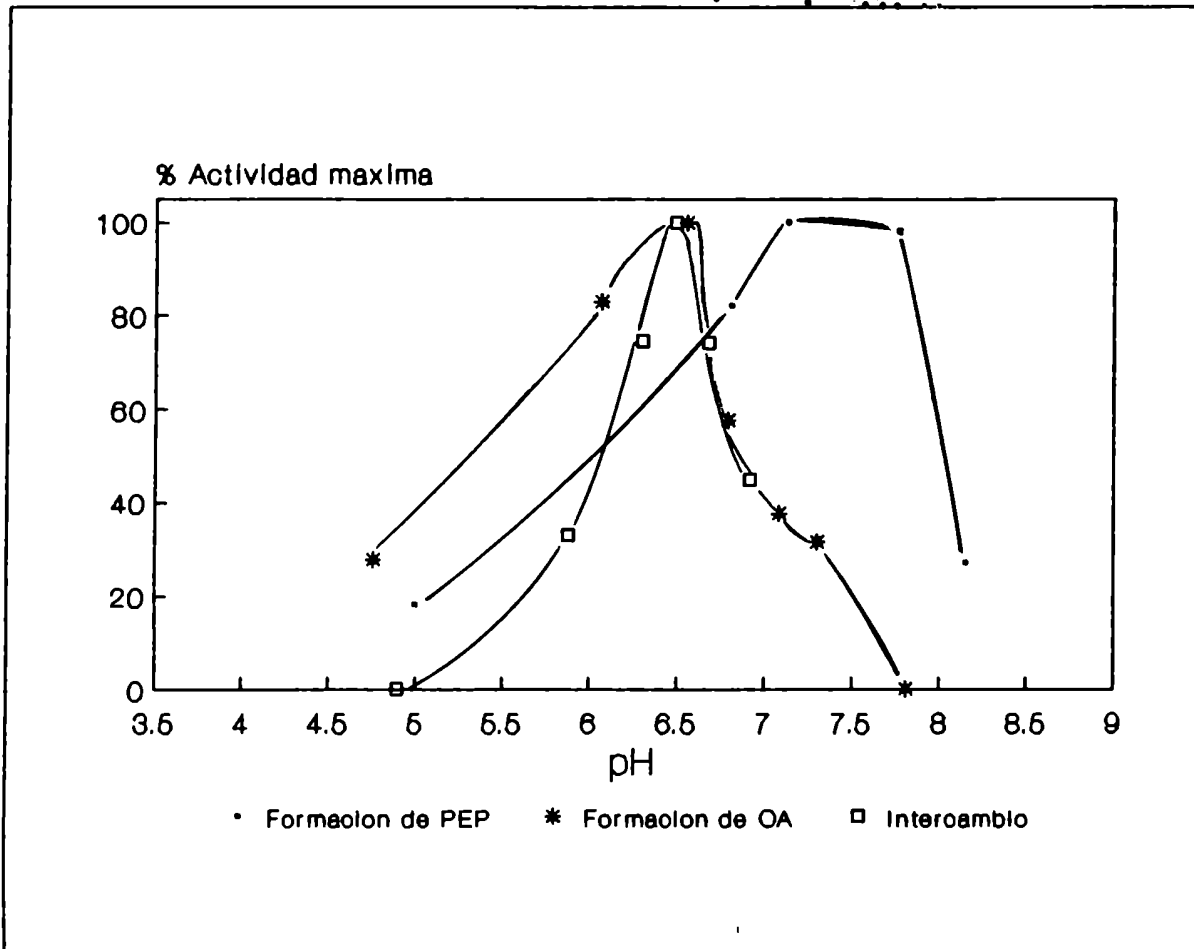


Figura 18: Variación de la actividad enzimática con el pH.

En la figura se representa la actividad enzimática relativa a la actividad máxima para cada una de las reacciones que cataliza la PEPCK en función del pH de la mezcla de reacción. En todos los casos dichas mezclas fueron como se describe en Materiales y Métodos variando el pH del amortiguador (Tris-Ac 50 mM). Se determinó el pH real en cada mezcla de reacción reemplazando la preparación enzimática por igual volumen de amortiguador borato-bórico 0.05M pH 7.5 EDTA 0.1 mM.

Tabla VII: Comparación de la actividad enzimática para las tres reacciones catalizadas por la PEPCK

Reacción estudiada	Actividad enzimática ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$)	
	pH óptimo	pH 7
Formación de PEP	32.10	19.60
Carboxilación	3.20	1.49
Intercambio	0.97	0.76

La actividad enzimática se determinó según se describe en Materiales y Métodos utilizando en cada caso mezclas de reacción con el pH óptimo para cada reacción (figura 18) y con un pH intermedio de 7. Para estas determinaciones se utilizó una preparación enzimática proveniente de la última etapa del método de purificación (Cromatografía en ATP-agarosa) con una concentración proteica de 0.115 mg/ml.

3.2. Acción de los nucleótidos

3.2.1. Especificidad

Se estudió la especificidad de nucleótidos para las tres reacciones catalizadas por la PEPCK con una preparación obtenida del último paso de la purificación. Los resultados sugieren una alta especificidad por el nucleótido de adenina para la reacción de carboxilación (Tabla VIII). En cambio, para las otras dos reacciones si bien la enzima muestra mayor actividad en presencia de ATP, también muestra una actividad significativa en presencia de los otros nucleótidos. En ambos casos la enzima es significativamente más activa con los nucleótidos de bases púricas que con las pirimidínicas (Tablas IX y X).

3.2.2. Efecto inhibitorio

En trabajos previos, realizados con esta enzima, se había descrito un efecto inhibitorio del ATP sobre la reacción de formación de PEP a concentraciones de ATP-Mg mayores a 500 μ M, y sobre la reacción de carboxilación con ADP como sustrato (Urbina, 1987).

De acuerdo a esto, fue de interés estudiar el efecto de los nucleótidos en las distintas reacciones catalizadas por la enzima.

Los resultados, que se indican en la Tabla XI para la reacción de carboxilación muestran que los nucleósidos

Tabla VIII: Especificidad de nucleótidos en la reacción de carboxilación (Método espectrofotométrico)

Nucleósido difosfato	% de actividad
ADP 0.14 mM	100
GDP 0.11 mM	0
IDP 0.12 mM	0
CDP 0.10 mM	0
UDP 0.09 mM	4
TDP 0.12 mM	0

La mezcla de reacción contenía: Tris-Ac 0.05 M pH 5.7; $MnCl_2$ 0.6 mM; NADH 0.1 mM; PEP 1.76 mM; $NaHCO_3$ 8.5 mM; MDH 7.6 UE/ml; DTT 5mM. La preparación enzimática (la misma que se utilizó para el experimento descrito en la Tabla VI) se diluyó en amortiguador borato-bórico 0.05M EDTA 0.1 mM pH 7.5 (1/5) preincubándose durante 15 minutos a 0°C.

Tabla IX: Especificidad de nucleótidos en la reacción de formación de PEP (Método fotocolorimétrico).

Nucleósido trifosfato (1mM)	% de actividad
ATP	100
GTP	52
ITP	36
CTP	15
UTP	20
TTP	16

La mezcla de reacción contenía: Tris-Ac 0.05M pH 8; $MnCl_2$ 1.5 mM; oxaloacetato 25 uM. Para estos experimentos se utilizó una preparación enzimática (idea Tabla VIII) diluida en amortiguador borato-bórico 0.05M; EDTA 0.1mM pH 7.5 (1/10) y preincubada durante 15 minutos a 0°C.

Tabla X: Especificidad de nucleótidos en la reacción de intercambio (Método radioquímico).

Nucleósido trifosfato (1 mM)	% de actividad
ATP	100
GTP	84
ITP	54
CTP	37
UTP	33
TTP	30

La mezcla de reacción contenía: Tris-Ac 0.05 M pH 5.7; DTT 5 mM; oxaloacetato 0.12 mM; $MnCl_2$ 1.5 mM; $NaH^{14}CO_3$ 1.92 μ mol/ml (1.29 uCi/ μ mol). La preparación enzimática (idem Tabla VII) se diluyó en amortiguador borato-bórico 0.05 M; EDTA 0.1 mM pH 7.5 (1/10) preincubándose durante 15 minutos a 0°C.

Tabla XI: Efecto de los nucleótidos púricos sobre la reacción de carboxilación (Método espectrofotométrico)

Nucleósido trifosfato	% de inhibición
	0
ATP 1 mM	22
ATP 2 mM	34
GTP 1 mM	7
GTP 2 mM	20
ITP 1 mM	18
ITP 2 mM	18

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: Tris-Ac 50 mM pH 5.7; $MnCl_2$ 3 mM; NADH 0.1 mM; ADP 1 mM; PEP 0.88 mM; $NaHCO_3$ 10 mM; MDH 7.6 UE; DTT 5 mM. La preparación enzimática (idem Tabla VIII) se diluyó en amortiguador borato-bórico 50 mM; EDTA 0.1 mM pH 7.5 preincubándose a 0°C durante 15 minutos.

Tabla XII: Efecto de nucleótidos en la reacción de formación de PEP (Método fotocolorimétrico)

Nucleósido difosfato (1 mM)	Sustrato:	% de inhibición	
		ATP (1 mM)	GTP (1 mM)
		0	0
ADP		12	60
GDP		0	73
IDP		17	100
CDP		10	83
TDP		15	64
UDP		11	52

La mezcla de reacción contenía en un volumen de 1 ml: Tris-Ac 50 mM pH 8 y oxaloacetato 0.246 mM. La preparación enzimática se trató en las condiciones descritas en la leyenda de la Tabla XI.

trifosfato de bases púricas ejercieron un ligero efecto inhibitorio, siendo en ese sentido el ATP el más efectivo.

En la reacción de formación de PEP utilizando ATP como sustrato tampoco se observa una inhibición significativa, en este caso por nucleósidos difosfato, (Tabla XII, primera columna). Sin embargo, cuando el sustrato era GTP todos los nucleótidos ensayados ejercieron un efecto inhibitorio importante, obteniéndose con IDP inhibición total de la actividad (Tabla XII, segunda columna).

Con respecto a la reacción de intercambio, tanto el ADP como el GDP presentaron un ligero efecto inhibitorio, cuando el ATP era el sustrato de la reacción, siendo la inhibición por nucleótidos de pirimidinas más importante. Cuando se utilizó GTP la inhibición fue similar con todos los nucleótidos estudiados (Tabla XIII). En ambos casos la inhibición por IDP fué mayor que por ADP o GDP.

Sin embargo, el IDP no ejerció efecto significativo sobre la reacción de carboxilación con ADP como sustrato y el ITP tampoco lo hizo sobre la reacción de formación de PEP con ATP como sustrato (Tabla XIV).

Es necesario destacar que todas las medidas se realizaron en presencia de un exceso de metal con respecto a los nucleótidos para descartar la posibilidad de que el efecto inhibitorio se debiera a quelación del metal.

Tabla XIII: Efecto de los nucleósidos difosfato en la reacción de intercambio (Método radioquímico)

Nucleósido difosfato (1 mM)	% de inhibición	
	Sustrato: ATP (1 mM)	GTP (1 mM)
	0	0
ADP	27	44
GDP	23	24
IDP	59	60
UDP	49	51
CDP	43	50
TDP	59	43

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 0.5 ml: Tris-Ac 50 mM pH 6; DTT 5 mM; oxaloacetato 13.2 mM; $MnCl_2$ 2.5 mM; $NaH^{14}CO_3$ 1.92 μ mol/ml (1.29 μ Ci/ μ mol). Otras condiciones experimentales son similares a las descritas en la leyenda de la Tabla XI.

Tabla XIV: Efecto de los nucleótidos de inosina

	Formación de oxaloacetato	Formación de PEP
	% de actividad relativo a un control con ADP 1 mM	% de actividad relativo a un control con ATP 1 mM
	100	100
IDP 1 mM	105	
ITP 1 mM		114

Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en las leyendas de las Tablas XI y XII.

3.3. Requerimiento de catión divalente

La PEPCK aislada del T. cruzi al igual que la proveniente de otras especies muestra un requerimiento absoluto de metal divalente para su actividad.

Se determinó la efectividad de algunos cationes divalentes sobre la reacción de intercambio. Los resultados que se muestran en la Tabla XV indican que se logra la mayor activación con $MnCl_2$ mientras que a la misma concentración con $CdCl_2$ sólo se alcanza el 23% de dicha actividad. Sin embargo, a una concentración 0.6mM se logra un 52% de la actividad obtenida con $MnCl_2$. El $MgCl_2$ sólo sustituye en un 8% al $MnCl_2$ y con el resto de los cationes divalentes ensayados no se logra una actividad enzimática significativa.

En la figura 19 se muestra el efecto de concentraciones variables de $MnCl_2$ sobre la actividad de PEPCK, determinada por el método radioquímico, para una concentración fija de ATP. El máximo de activación se obtuvo cuando la relación catión-nucleótido tiene un valor de 1.8. A valores mayores se observa inhibición.

En la misma figura se muestra el efecto de concentraciones variables de $CdCl_2$ y $MgCl_2$ sobre la actividad de intercambio de la PEPCK a concentraciones fijas de ATP.

En el caso del $CdCl_2$ se alcanza la máxima actividad cuando la concentración del metal es de 0.6 mM (relación catión-nucleótido= 0.5), observándose inhibición cuando

Tabla XV: Efecto de los cationes divalentes sobre la reacción de intercambio catalizada por la PEPCK
(Método radioquímico)

	Concentración (mM)	Actividad enzimática (nmoles/min/mg)	Actividad enzimática relativa (%)
MnCl ₂	2.2	195.50	100.0
CdCl ₂	0.6	101.70	52.0
CdCl ₂	2.2	44.97	23.0
MgCl ₂	1.0	5.87	3.0
MgCl ₂	2.2	16.60	8.5
ZnCl ₂	2.2	5.47	2.8
CaCl ₂	2.2	1.96	1.0
SrCl ₂	2.2	0.00	0.0
		0.00	0.0

La actividad enzimática se determinó según se describe en Materiales y Métodos utilizando mezclas de reacción donde el único catión divalente presente es el que se indica en la tabla. Para éstas determinaciones se utilizó una preparación enzimática proveniente de la cromatografía en columna de hidroxilapatita (1.05 mg/ml) previamente diluida en amortiguador borato-bórico 50 mM; EDTA 0.1 mM pH 7.5 (1/10) e incubada durante 15 minutos a 0°C.

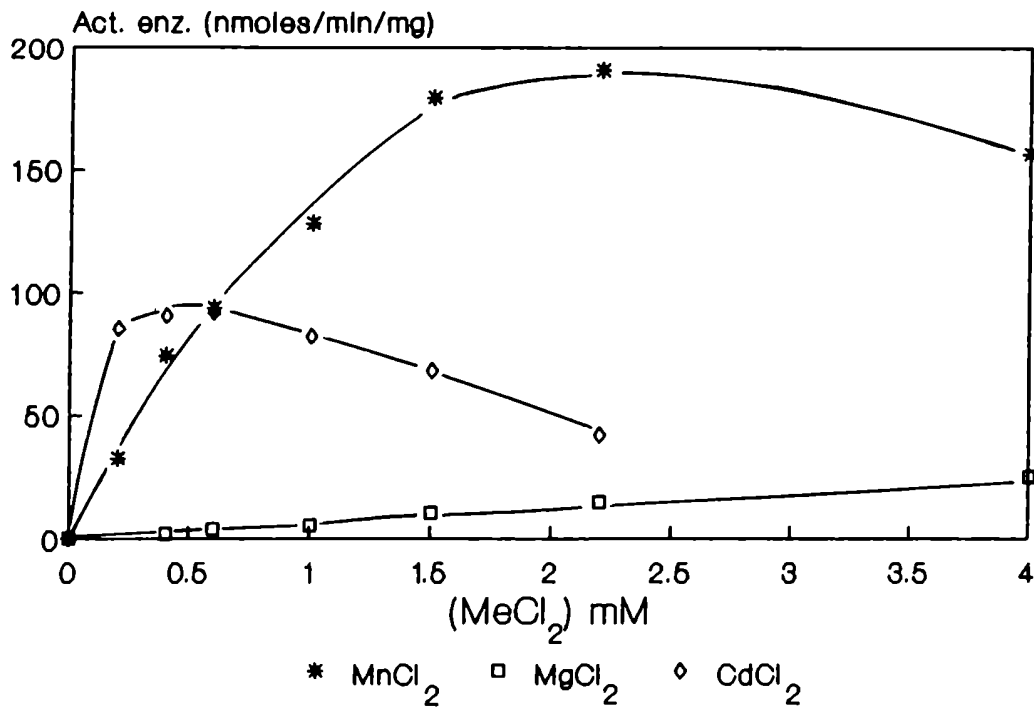


Figura 19: Efecto de concentraciones variables de cationes divalentes sobre la actividad carboxiquinásica de intercambio. La mezcla de reacción fué como se describió en Materiales y Métodos, pero se omitió el DTT. La concentración de ATP fué de 1.22 mM.

la concentración es mayor.

El MgCl_2 sustituye pobremente al MnCl_2 según se observa en la figura y aún con concentraciones de 4 mM la actividad obtenida sólo representa un 14% de la máxima obtenida con MnCl_2 .

Los datos se graficaron de acuerdo al método de Lineweaver-Burk y con los valores de V_{max} así obtenidos se calcularon los coeficientes de Hill (figura 20).

Los valores obtenidos para los coeficientes de Hill en los tres casos son aproximadamente iguales a uno por lo que no existe una cooperatividad significativa.

Tanto el MgCl_2 como el CdCl_2 ejercen un efecto sinérgico con el MnCl_2 tal como puede observarse en la figura 21.A. siendo en ese sentido el CdCl_2 mucho más efectivo que el MgCl_2 pues con una concentración de CdCl_2 100 veces menor que la de MgCl_2 se obtiene una activación similar.

Se calcularon los parámetros cinéticos para ambos casos. Los gráficos dobles recíprocos son bifásicos y de acuerdo a éstos en ambos casos la afinidad de la enzima por el MnCl_2 es mayor cuando la concentración de MnCl_2 es mayor que 0.1 mM (figura 21.B.).

Concentraciones de MnCl_2 superiores a 0.6 mM en presencia de MgCl_2 1 mM o CdCl_2 0.01 mM presentan un marcado efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima, tal como se observa en la figura 22.

Se estudió también el efecto del MnCl_2 sobre la reacción de carboxilación (método espectrofotométrico) en

Figura 20

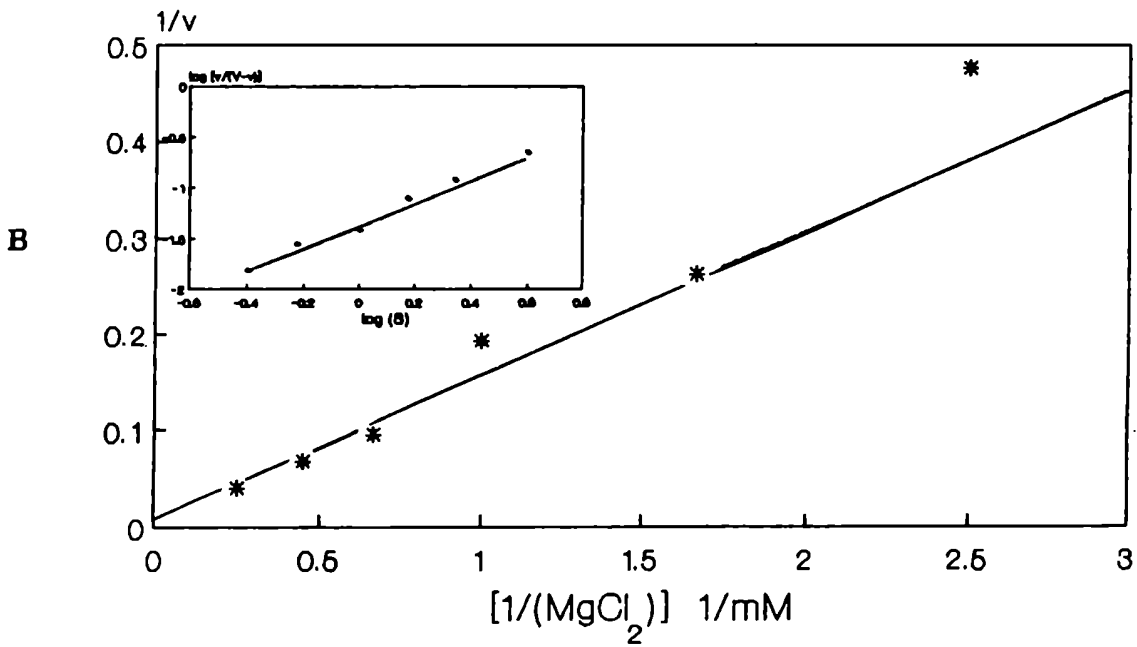
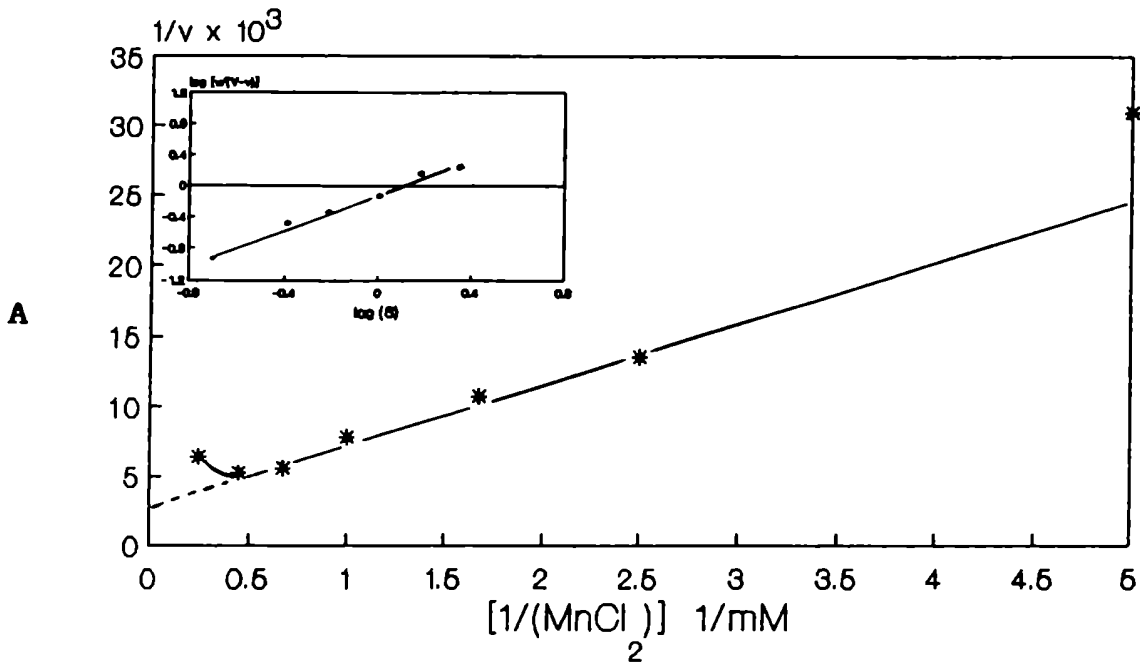


Figura 20

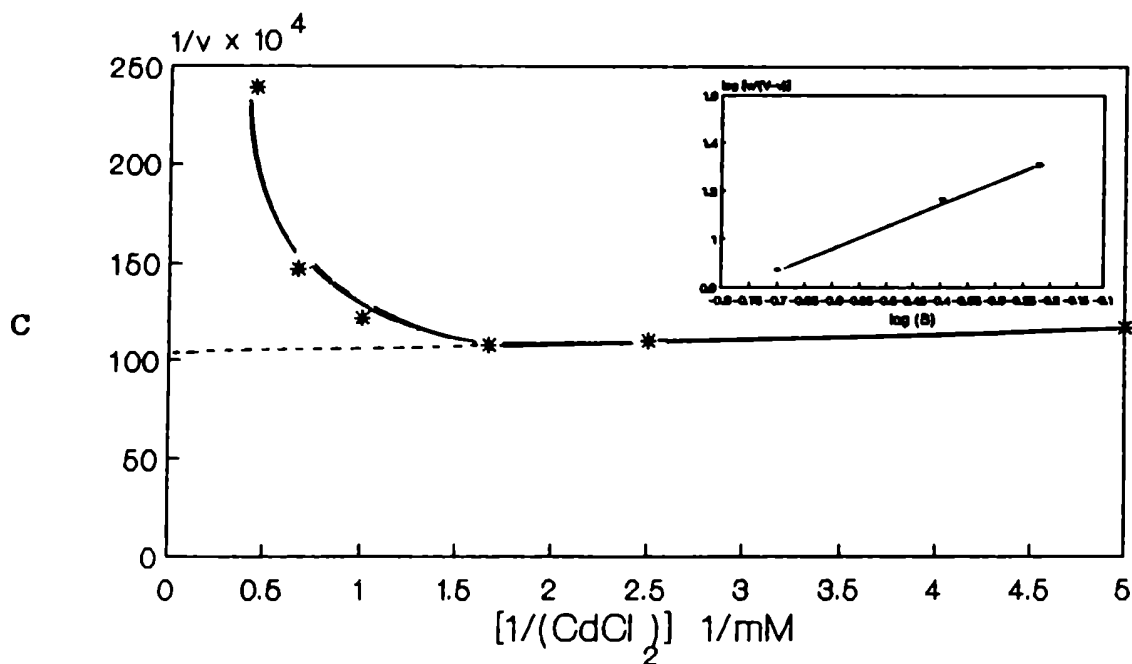


Figura 20: Representaciones dobles recíprocas correspondientes a los experimentos de la Figura 19. En los recuadros se muestran los gráficos de Hill correspondientes.

Parámetros cinéticos:

A: MnCl_2 : $V_{\text{max}}= 305 \text{ mU/mg}$; $K_m= 1.28 \text{ mM}$; $n_H= 1.1$

B: MgCl_2 : $V_{\text{max}}= 140 \text{ mU/mg}$; $K_m= 18.6 \text{ mM}$; $n_H= 1.2$

C: CdCl_2 : $V_{\text{max}}= 97 \text{ mU/mg}$; $K_m= 0.026 \text{ mM}$; $n_H= 0.9$

Figura 21

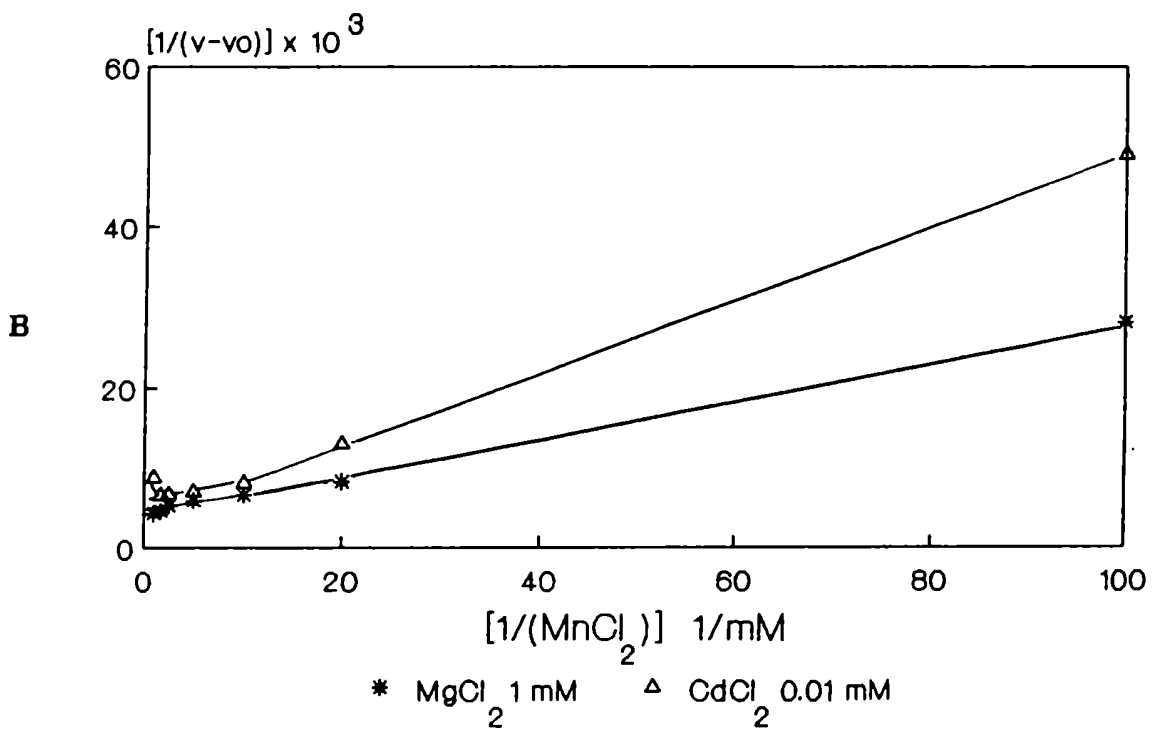
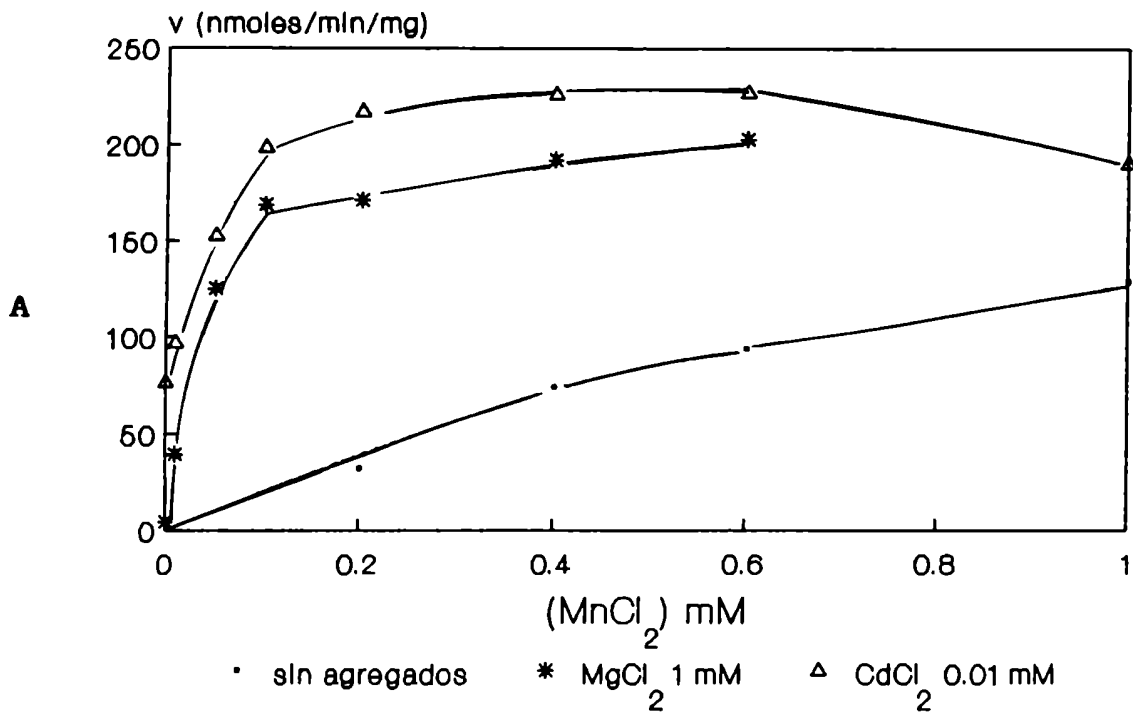


Figura 21: Efecto de la variación en la concentración de MnCl_2 sobre la actividad carboxiquinásica de intercambio en ausencia o presencia de MgCl_2 o de CdCl_2 .

A: Gráfico directo: En cada punto se resta el valor de velocidad enzimática obtenido sin MnCl_2 .

La mezcla de reacción fué como se describe en Materiales y Métodos. La concentración de ATP fué de 1.2 mM.

B: Gráficos dobles recíprocos: Parámetros cinéticos:

MgCl_2 :

$V_o = 4.2 \text{ mU/mg}$

si (MnCl_2) es menor de 0.1 mM: $K_m = 0.074 \text{ mM}$; $(V - V_o)_{\text{max}} = 299 \text{ mU/mg}$.

si (MnCl_2) es mayor de 0.1 mM: $K_m = 0.041 \text{ mM}$; $(V - V_o)_{\text{max}} = 220 \text{ mU/mg}$.

CdCl_2 :

$V_o = 76.7 \text{ mU/mg}$

si (MnCl_2) es menor de 0.1 mM: $K_m = 0.119 \text{ mM}$; $(V - V_o)_{\text{max}} = 263 \text{ mU/mg}$.

si (MnCl_2) es mayor de 0.1 mM: $K_m = 0.030 \text{ mM}$; $(V - V_o)_{\text{max}} = 160 \text{ mU/mg}$

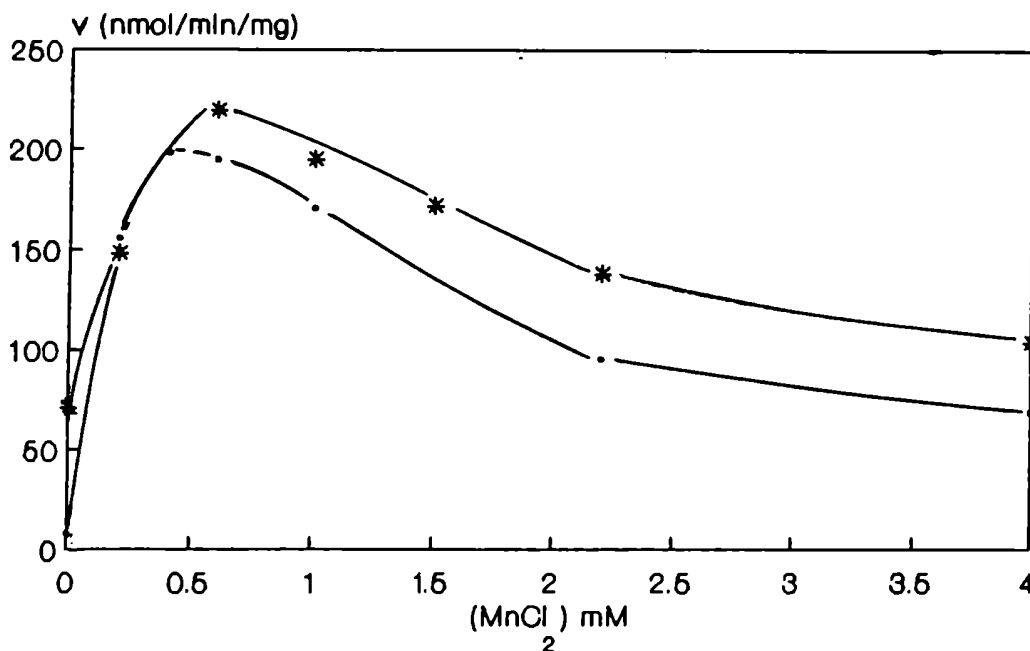


Figura 22: Efecto del CdCl_2 0.01 mM (*--*) y del MgCl_2 1 mM (.__.) sobre la reacción de intercambio en presencia de concentraciones variables de MnCl_2 (Se utilizaron concentraciones de MnCl_2 superiores a las utilizadas en el experimento de la figura 21). La concentración de ATP fué de 1.2 mM. Otras condiciones experimentales fueron como se describe en Materiales y Métodos.

ausencia o presencia de $MgCl_2$ 0.5 mM como segundo catión a concentraciones fijas de ATP (figura 23.A).

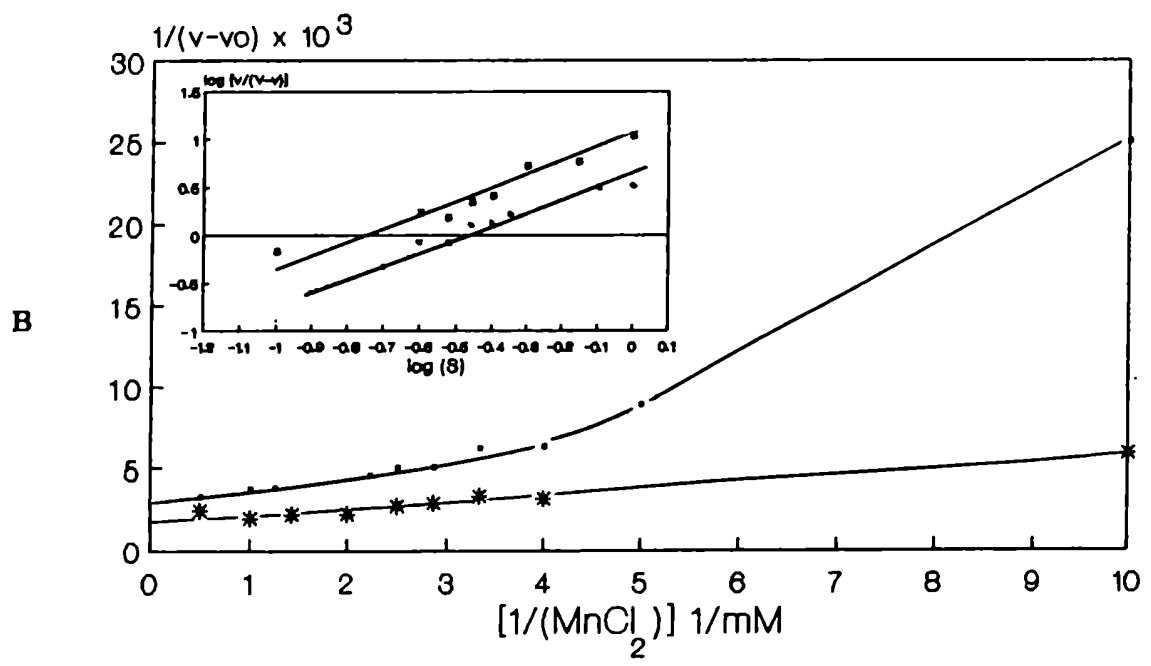
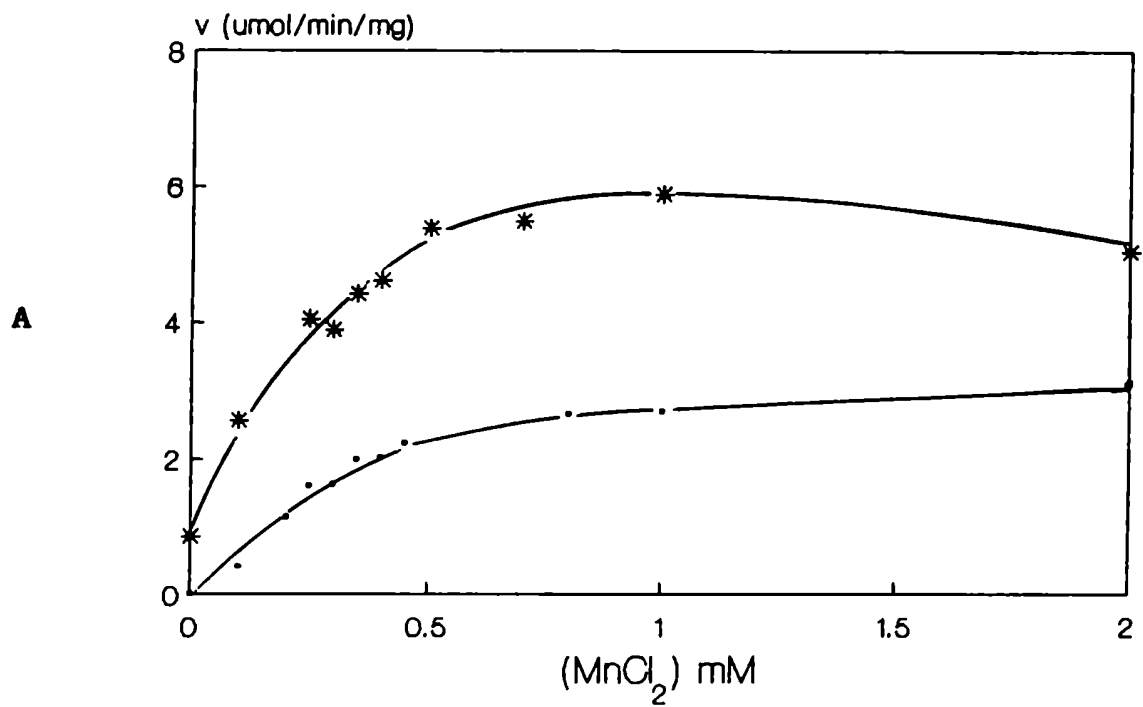
De los gráficos dobles recíprocos (figura 23.B.) se calcularon los parámetros cinéticos y con estos se graficaron los datos de acuerdo al método de Hill (figura 23, inserto). En ambos casos se obtuvieron K_m s similares y el coeficientes de Hill fue, para el $MnCl_2$ sólo, de 1.3 y en presencia de $MgCl_2$ de 1.2.

Los experimentos arriba descritos fueron realizados con una preparación proveniente de una columna de hidroxilapatita (5° paso del método de purificación) llevada a 70% de saturación con sulfato de amonio, centrifugada a 20000g durante 20 minutos y resuspendida en amortiguador borato-bórico 0.05M pH 7.5 EDTA 0.1mM. En todos los casos se utilizó para las determinaciones una alícuota de esa preparación que fue diluida en borato-bórico por lo menos 15 minutos antes de ser utilizada.

Cuando los mismos experimentos se realizaron utilizando una preparación enzimática sin diluir previamente se obtuvieron curvas sigmoideas con gráficos dobles recíprocos bifásicos y con un coeficiente de Hill mayor que dos (figura 24, A., B., inserto).

El mismo comportamiento se observó utilizando como método de medida el radioquímico de intercambio (figura 25, A.,B., inserto).

Figura 23



Resultados

Figura 23: Efecto de concentraciones variables de MnCl_2 sobre la reacción de carboxilación en ausencia (—) o presencia (*--*) de MgCl_2 0.5 mM.

A: Representación directa.

B: Representación de dobles recíprocos.

Inserto: Representación de Hill.

Parámetros cinéticos:

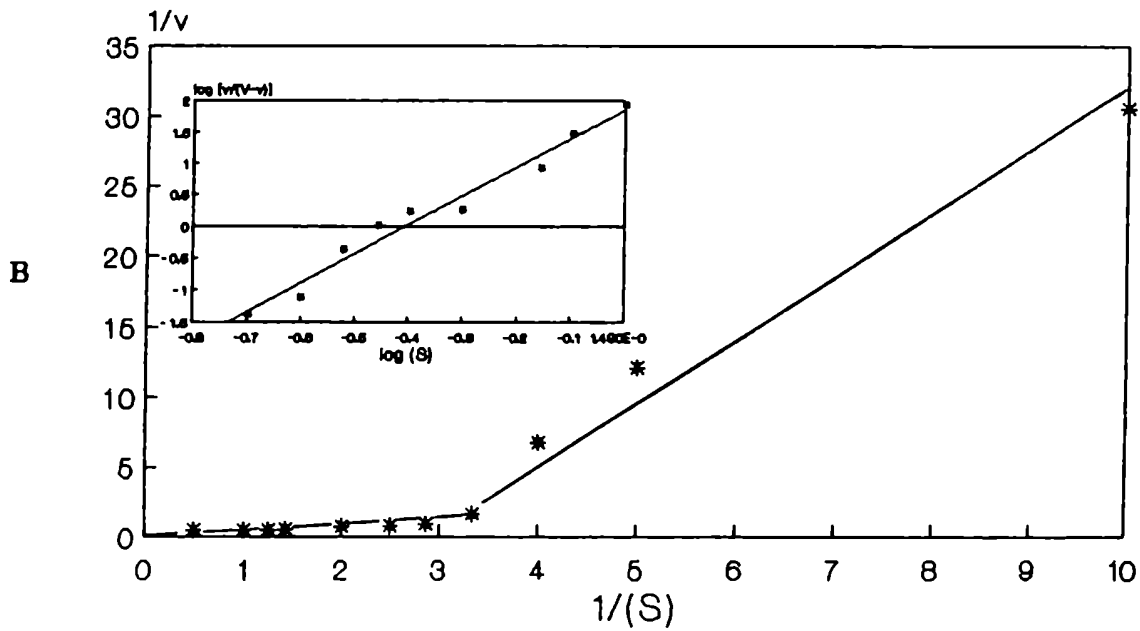
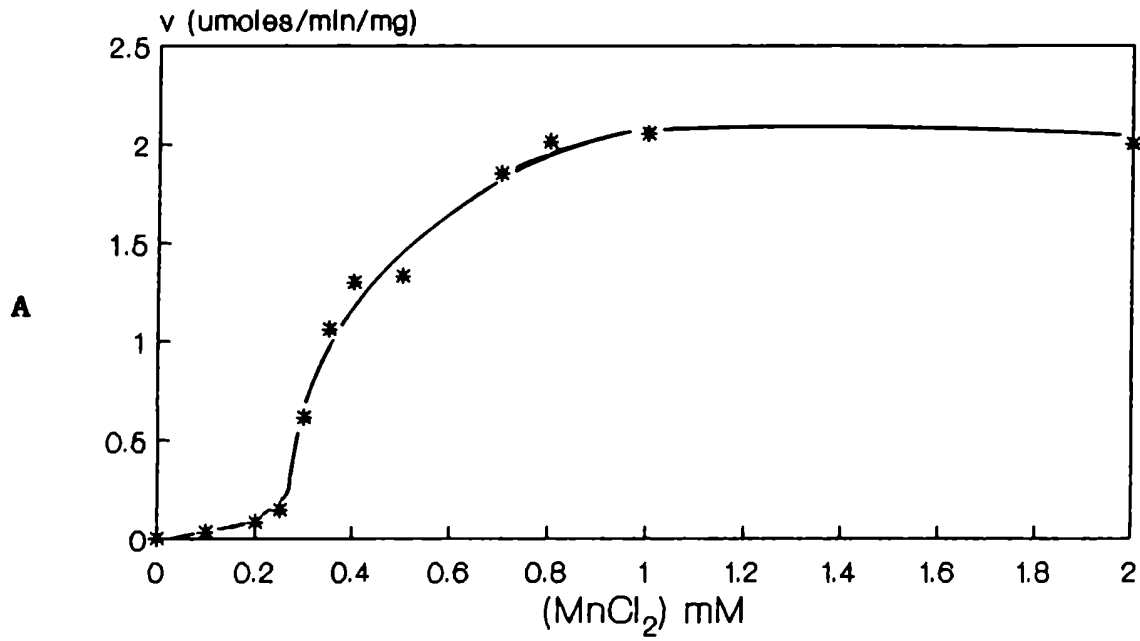
$K_m(\text{MnCl}_2)$: 0.28 mM; V_{max} : 3.5 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$; n_H : 1.3.

V_o = 0.85 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$

$K_m(\text{MnCl}_2, \text{MgCl}_2 \text{ 0.5mM})$: 0.28 mM;

$(V-V_o)_{\text{max}}$: 6.4 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$; n_H : 1.2.

Figura 24



Resultados

Figura 24: Efecto de concentraciones variables de MnCl_2 sobre la actividad de carboxilación de la PEPCK cuando se utiliza una preparación enzimática sin dilución previa.

A: Gráfico directo

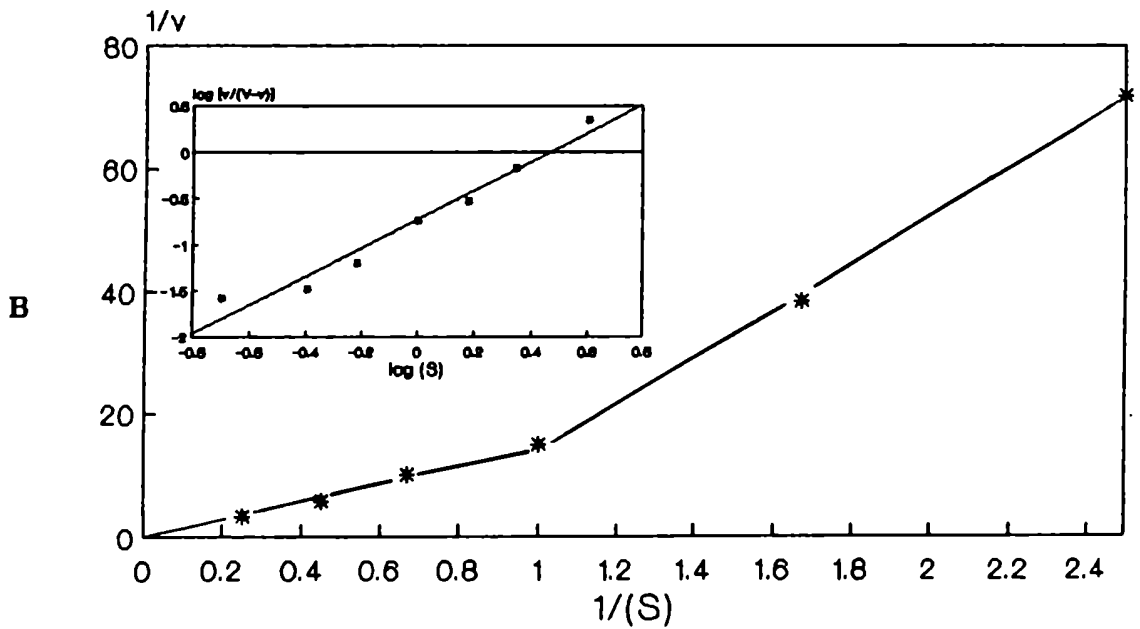
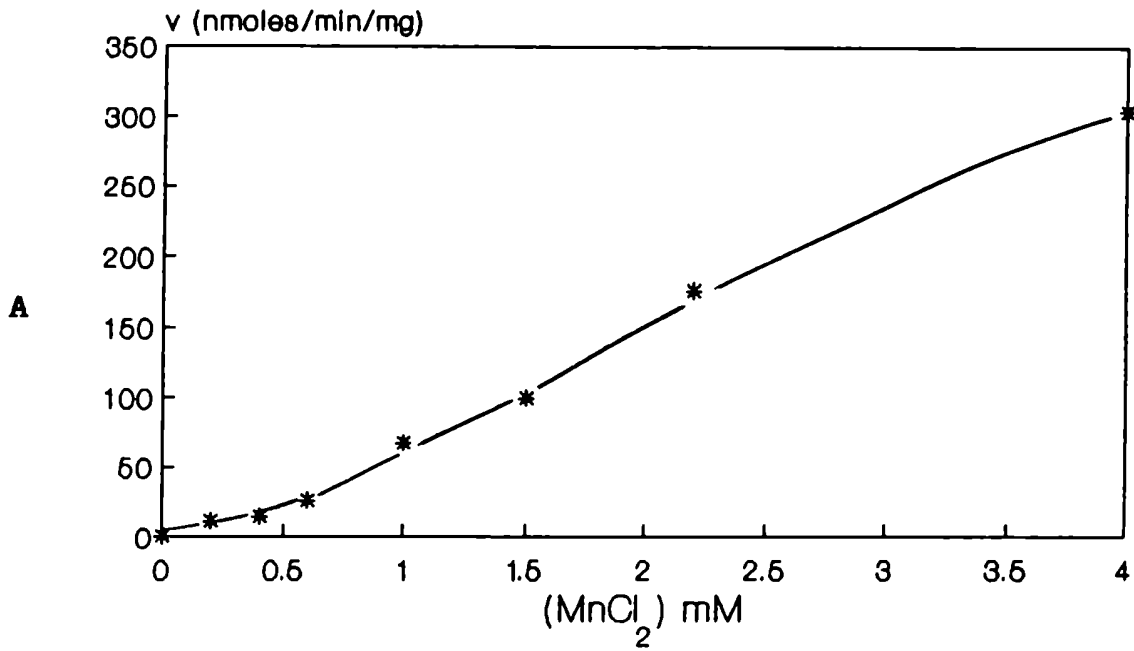
B: Gráfico de dobles recíprocos

Inserto: Gráfico de Hill

Parámetros cinéticos:

$S_{0.5}$: 0.39 mM; V_{max} : 2.09 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$; n_H : 4.5.

Figura 25



Resultados

Figura 25: Efecto de la variación en la concentración de MnCl_2 sobre la reacción de intercambio cuando se utiliza una preparación enzimática sin dilución previa. La mezcla de reacción fué como se describe en Materiales y Métodos. La concentración de ATP fué de 1.2 mM.

A: Gráfico directo

B: Gráfico de dobles recíprocos

Inserto: Gráfico de Hill

Parámetros cinéticos:

$S_{0.5}$: 2.6 mM; V_{max} : 441 nmoles/min/mg; n_H : 1.8

3.4. Determinación de los parámetros cinéticos

Se determinaron los parámetros cinéticos de la PEPCCK con una preparación proveniente del último paso de la purificación, utilizando el pH óptimo para cada reacción.

Debido al carácter histerético de la enzima (ver sección 4. de Resultados) en todos los casos el extracto enzimático fue diluido (1/10) en amortiguador borato-bórico 0.05M EDTA 0.1 mM pH 7.5 alrededor de 15 minutos antes de las determinaciones y mantenido en baño de hielo.

Los valores de K_m y V_{max} se obtuvieron en cada caso en presencia de concentraciones saturantes de los otros sustratos.

a) Reacción de carboxilación (método espectrofotométrico)

En la figura 26.A. se representa la actividad en función de la concentración de PEP.

El efecto de la concentración de ADP se estudió en presencia de exceso de Mn^{2+} de tal manera que en cada punto hubiera una concentración de Mn^{2+} libre de 0.5 mM por sobre la del complejo ADP-Mn (figura 27.A.). A concentraciones del complejo ADP-Mn mayores de aproximadamente 0.1 mM se observó un ligero efecto inhibitorio.

En la figura 28.A. se muestra el efecto de la variación en la concentración de $NaHCO_3$ sobre la actividad.

Figura 26

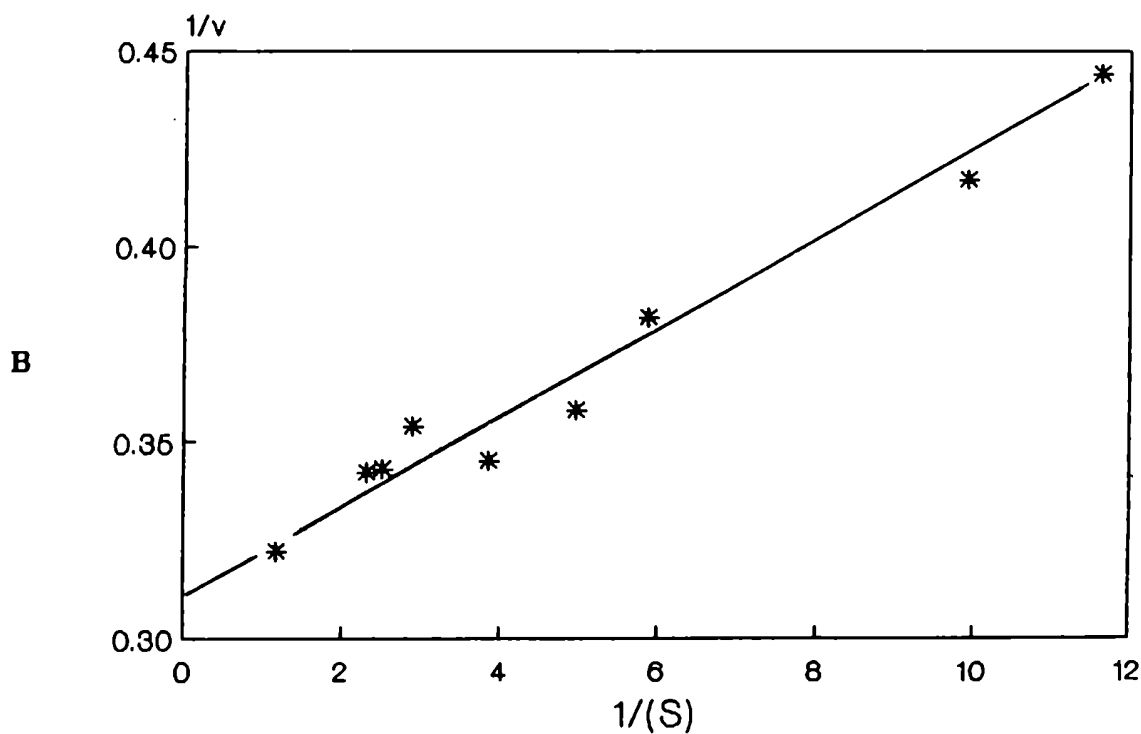
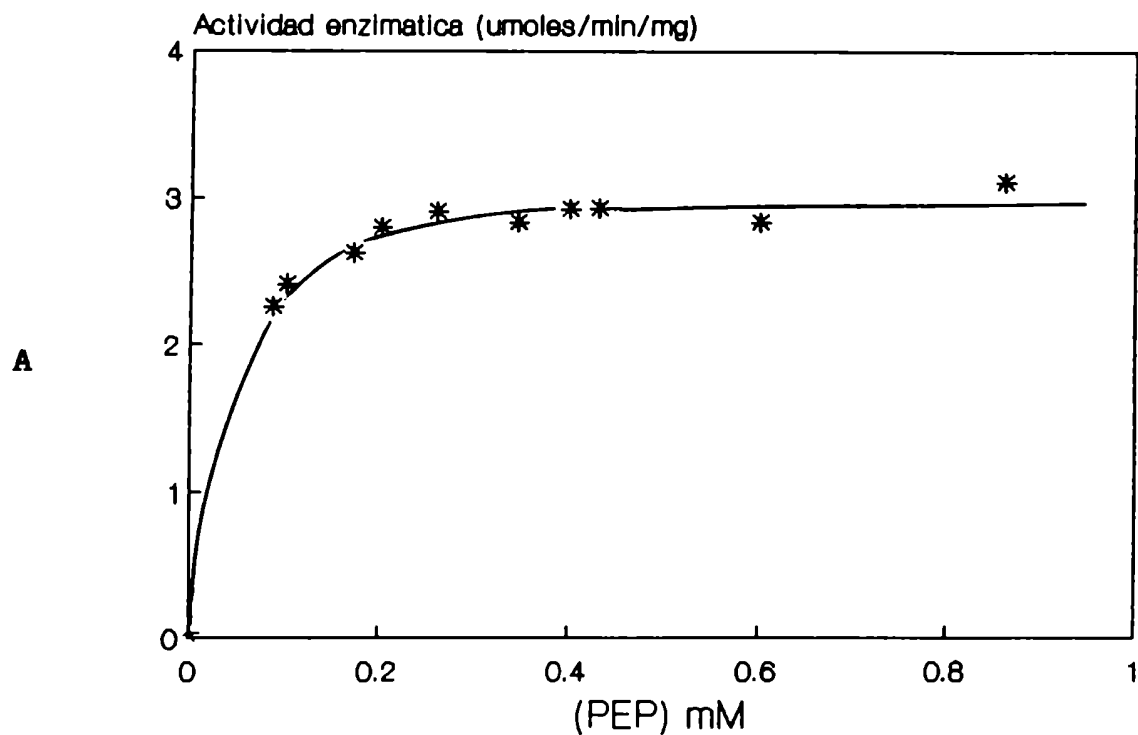


Figura 27

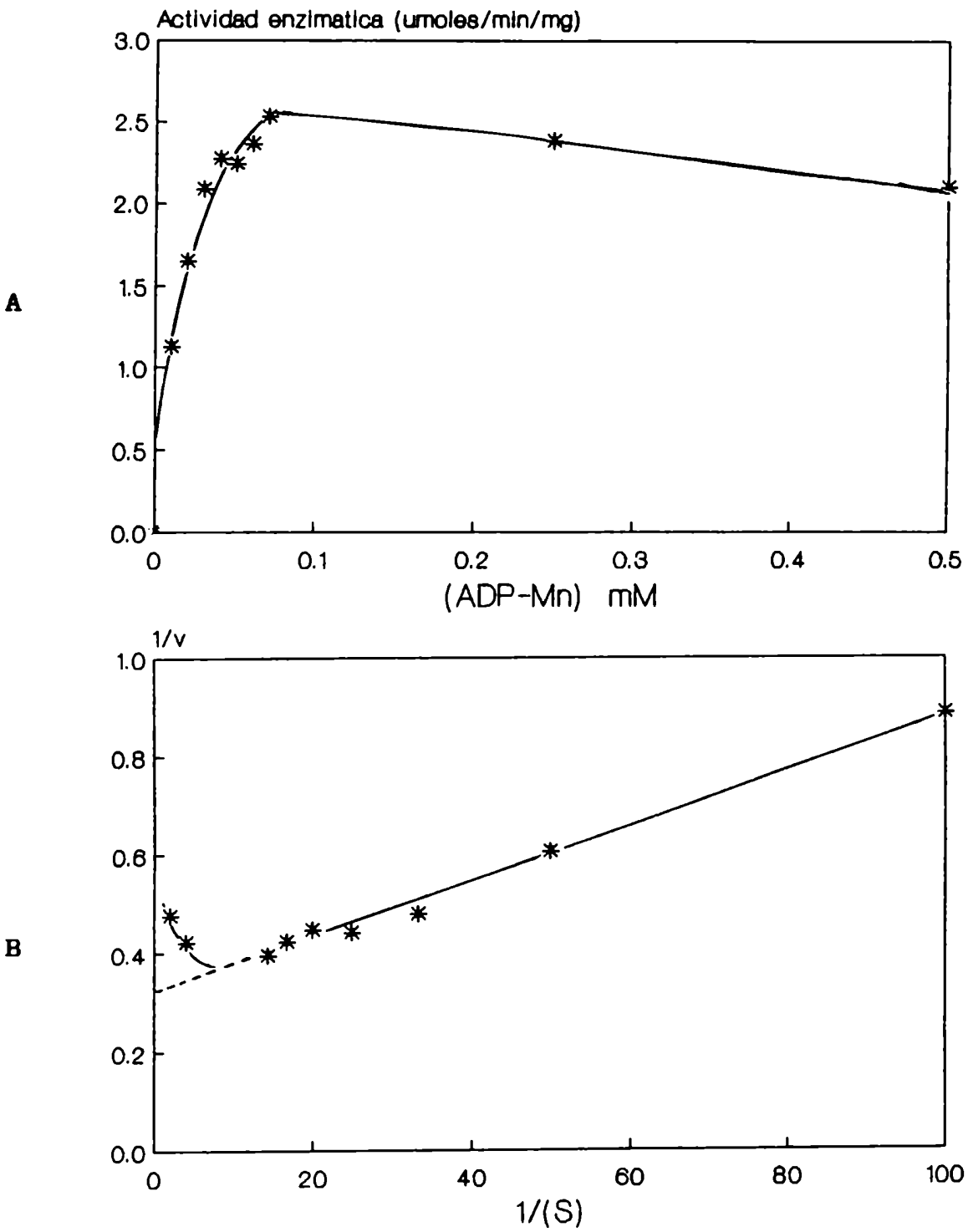


Figura 28

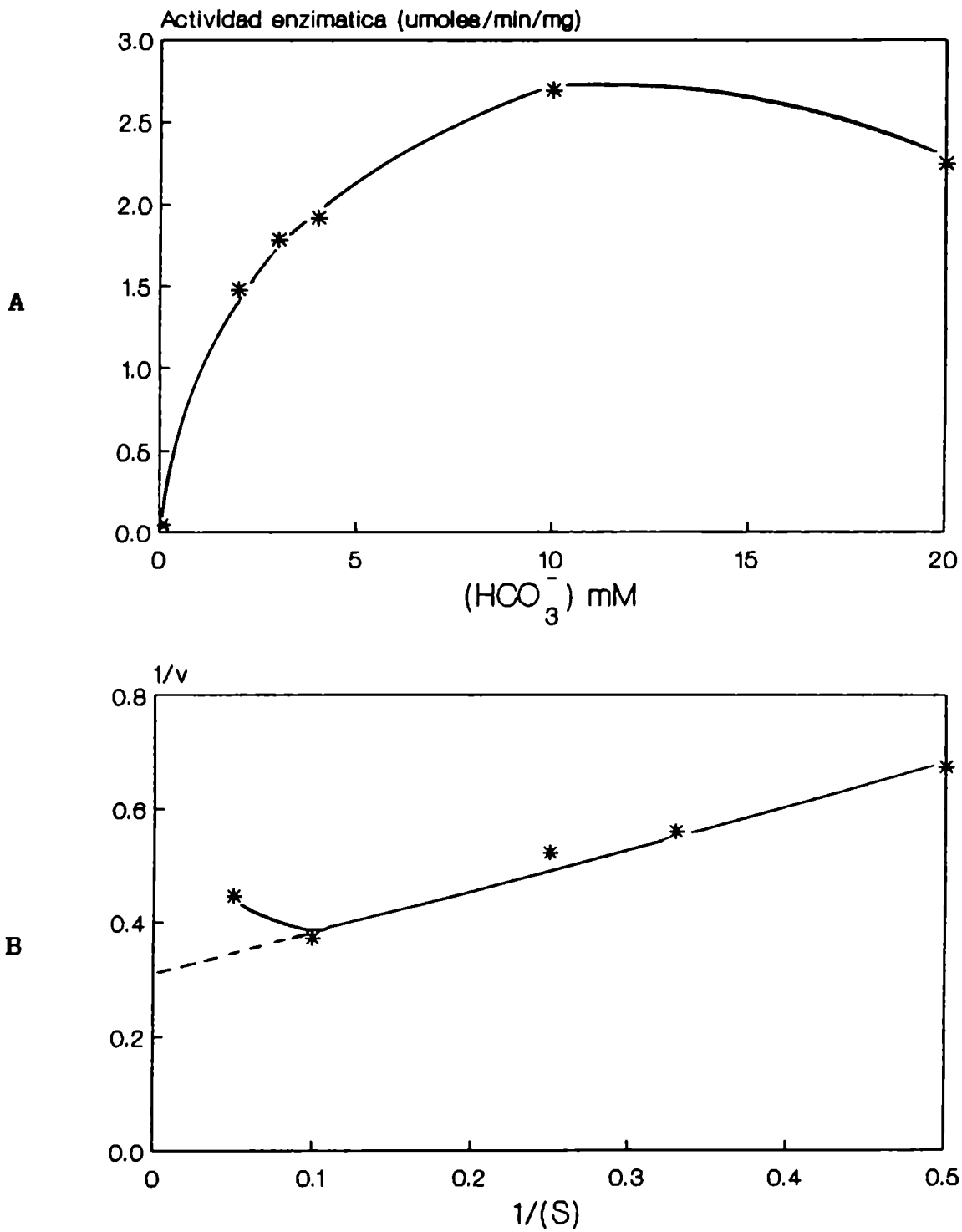


Figura 26: Efecto de la variación en la concentración de PEP sobre la actividad carboxilante de la PEPCK.

Las determinaciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos en mezclas de reacción que contenían MnCl_2 3 mM; ADP 0.91 mM y NaHCO_3 10 mM.

A: Gráfico directo

B: Gráfico de dobles recíprocos

Parámetros cinéticos:

$K_m = 35 \text{ uM}$; $V_{max} = 3.2 \text{ umoles/min/mg}$

Figura 27: Efecto de la variación en la concentración del complejo ADP-Mn sobre la actividad carboxilante de la PEPCK. La mezcla de reacción contenía PEP 0.88 mM; NaHCO_3 10 mM y una concentración de Mn^{2+} libre constante de 0.5 mM. Otros componentes de la mezcla de reacción fueron como se describe en Materiales y Métodos.

A: Gráfico directo

B: Gráfico de dobles recíprocos

Parámetros cinéticos:

$K_m = 16 \text{ uM}$; $V_{max} = 3.2 \text{ umoles/min/mg}$

Figura 28: Efecto de la variación en la concentración de NaHCO_3 sobre la actividad carboxilante de la PEPCK. La mezcla de reacción contenía MnCl_2 3 mM; ADP= 0.91 mM; PEP= 2 mM. Otros componentes de la mezcla de reacción fueron como se describe en Materiales y Métodos.

A: Gráfico directo

B: Gráfico de dobles recíprocos

Parámetros cinéticos:

$K_m = 2.6 \text{ mM}$; $V_{max} = 3.2 \text{ umoles/min/mg}$.

enzimática:

De los gráficos dobles recíprocos correspondientes se calcularon los valores para K_m y V_{max} .

El K_m para PEP fue de 35 μM (figura 26.B.), para ADP-Mn de 16 μM (figura 27.B.) y para $NaHCO_3$ de 2.6 mM (figura 28.B.) siendo la velocidad máxima (V_{max}) de 3.2 $\mu mol/min/mg$.

b) Reacción de formación de PEP (método fotolorimétrico)

Se determinó previamente un tiempo de incubación tal que la actividad se mantuviera constante con las menores concentraciones de sustratos utilizadas. El tiempo de incubación elegido fue de 3 minutos.

En la figura 29.A. se muestra la variación en la actividad enzimática en función de la concentración de oxaloacetato en presencia y ausencia de $MgCl_2$ 1 mM. El efecto de la variación en la concentración del complejo ATP-Mn sobre la actividad enzimática se muestra en la figura 30.A. En este caso se utilizó para todos los puntos una concentración de Mn^{2+} tal que hubiera en cada caso un exceso del metal por sobre el complejo de 0.5 mM.

Es de hacer notar que según estos resultados no se observa efecto inhibitorio por ATP-Mn hasta por lo menos una concentración 2 mM del complejo a diferencia de lo informado por Urbina (1987).

Los parámetros cinéticos para los sustratos se

Figura 29

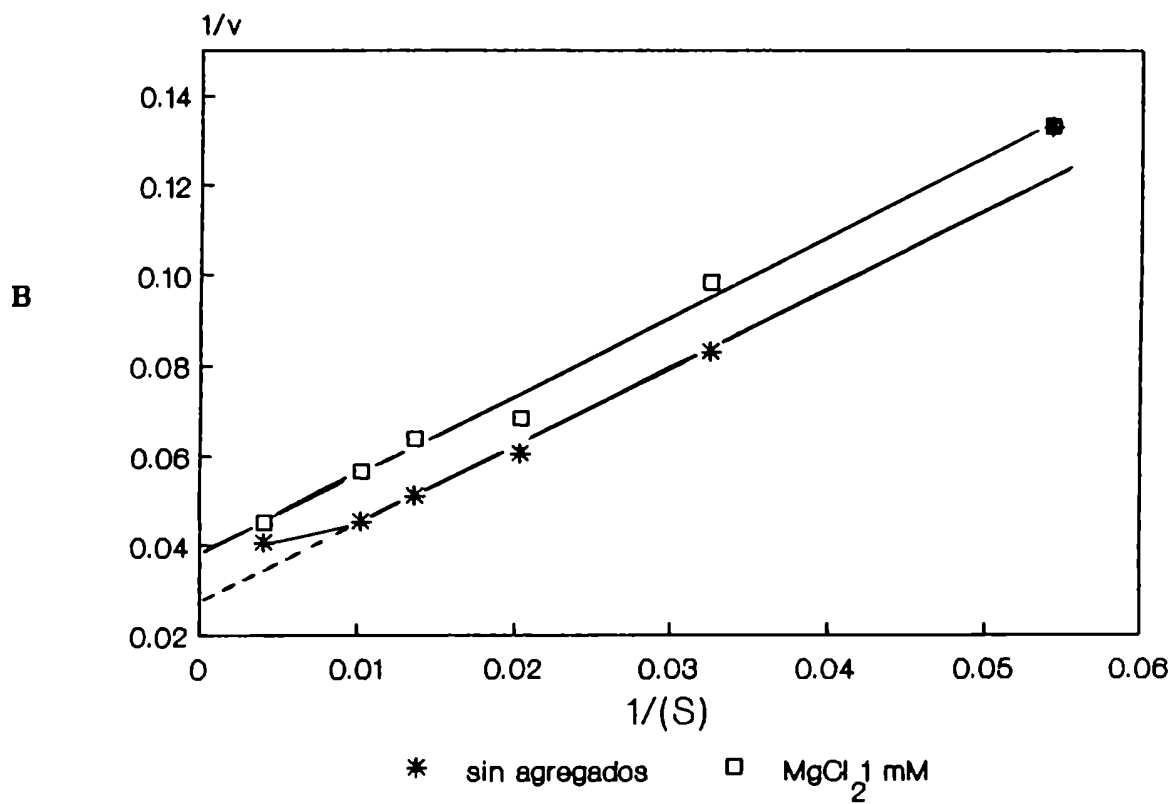
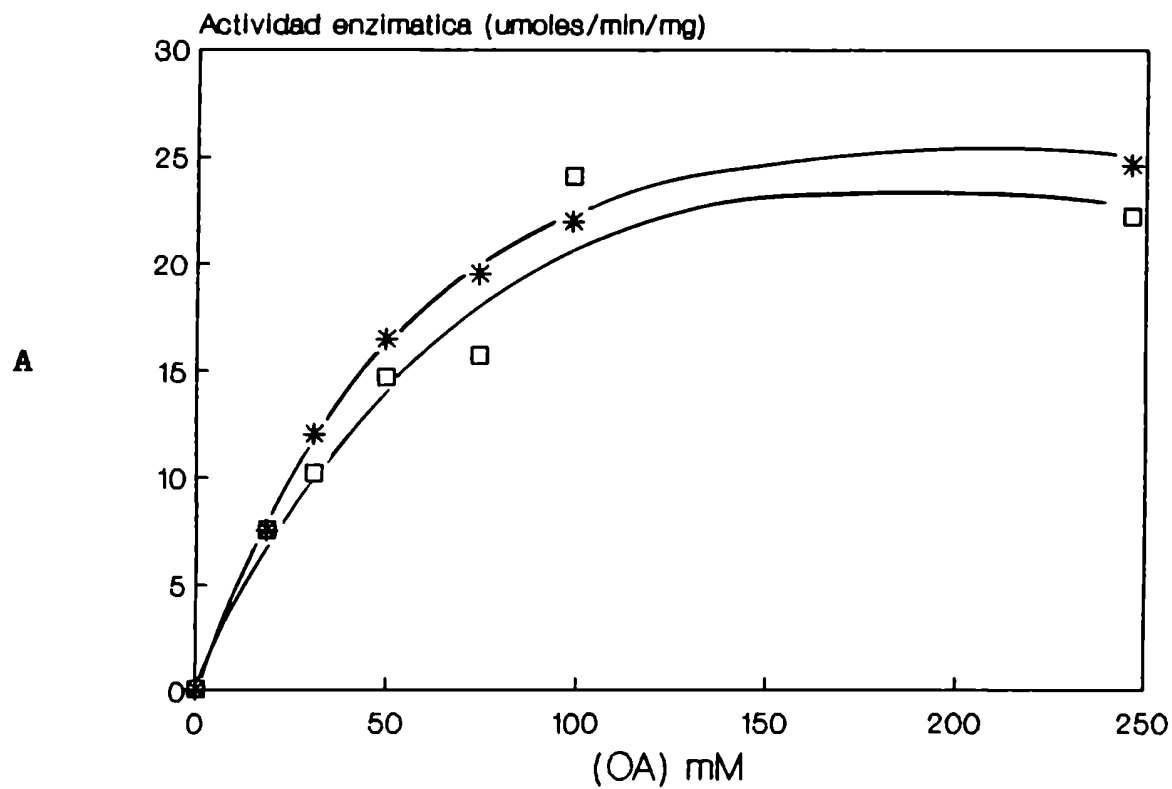
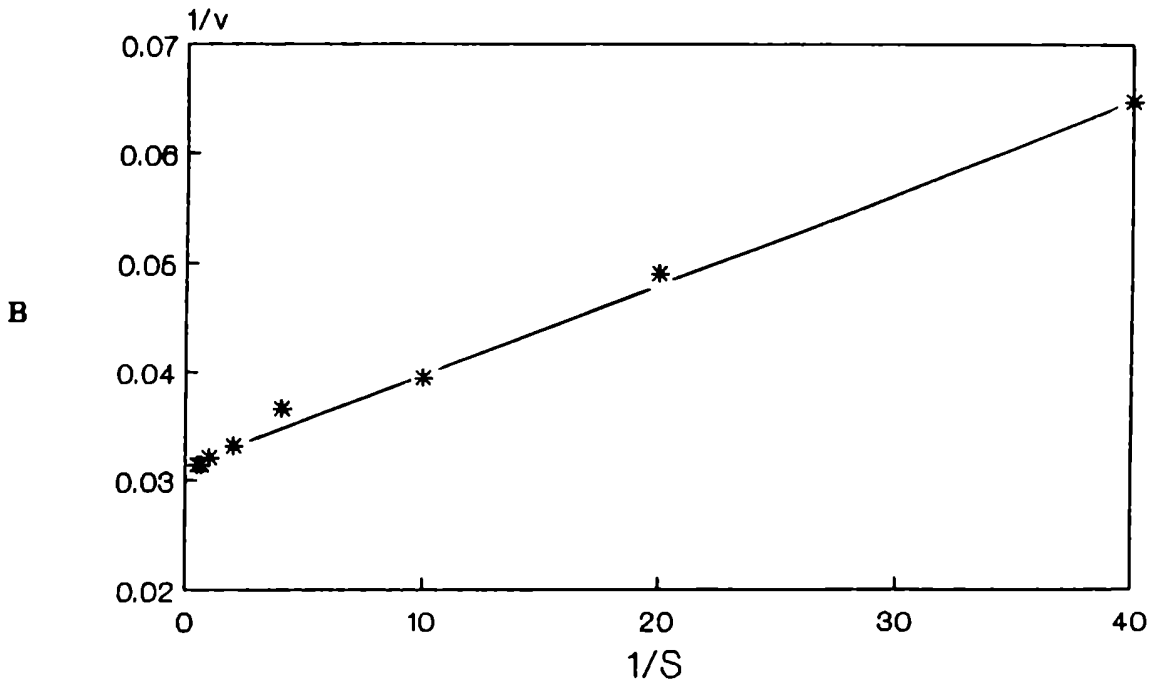
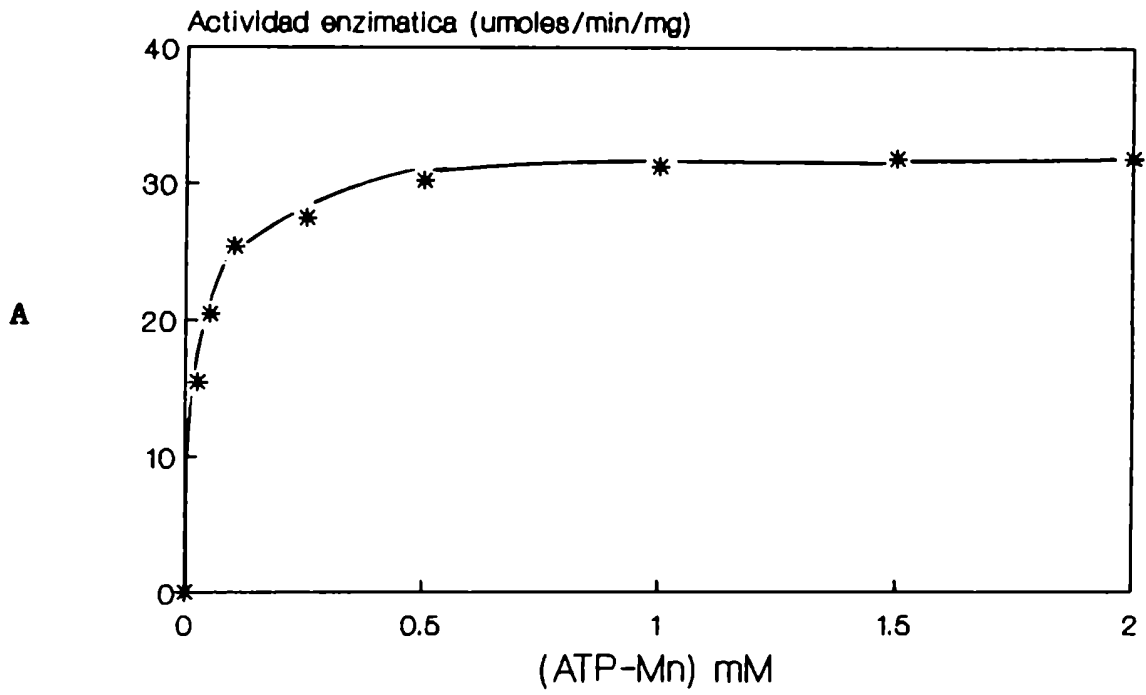


Figura 30



Resultados

Figura 29: Efecto de la variación en la concentración de oxaloacetato sobre la actividad de formación de PEP en ausencia o presencia de MgCl_2 1mM.

Las determinaciones se realizaron incubando mezclas de reacción conteniendo MnCl_2 1 mM y ATP 0.52 mM durante 3 minutos según se detalla en Materiales y Métodos.

A: Gráfico directo

B: Gráfico de dobles recíprocos

Parámetros cinéticos:

$K_m = 49 \text{ uM}$ (46.5 uM en presencia de MgCl_2 1 mM); $V_{max} = 31.7 \text{ umoles/min/mg}$ ($26.4 \text{ umoles/min/mg}$ en presencia de MgCl_2 1 mM).

Figura 30: Efecto de la variación en la concentración del complejo ATP-Mn sobre la formación de PEP. Las condiciones de incubación fueron como se describe en la leyenda de la figura 29 y las mezclas de reacción contenían una concentración de Mn^{2+} libre constante de 0.5 mM y oxaloacetato 0.4 mM.

A: Gráfico directo

B: Gráfico de dobles recíprocos

Parámetros cinéticos:

$K_m = 27 \text{ uM}$; $V_{max} = 31.7 \text{ umoles/min/mg}$

obtuvieron de los gráficos de dobles recíprocas y resultaron ser : el K_m para el oxaloacetato de 49 μM con una pequeña diferencia en presencia de $MgCl_2$ 1 mM (46.5 μM) y el K_m para ATP-Mn de 27 μM (figuras 29.B y 30.B.). La V_{max} fué de 32 $\mu mol/min/mg$.

c) Reacción de intercambio (método radioquímico)

También en este caso se determinó previamente el tiempo óptimo de incubación que resultó ser de 3 minutos.

La cinética para oxaloacetato se determinó en presencia de ATP o GTP resultando ser de tipo sigmoideo en ambos casos con $S_{0.5}$ muy similares : 41 μM con ATP y 48 μM con GTP (figuras 31., A. y B.).

El coeficiente de Hill con ATP como sustrato fue de 1.6 (figura 31., inserto).

En la figura 32.A. se indica el efecto de la variación en la concentración de ATP-Mn en la actividad de intercambio. Como puede observarse, la cinética fue hiperbólica encontrándose una inhibición que llega al 27% con una concentración de ATP-Mn de 150 μM .

El K_m para ATP-Mn obtenido del gráfico de dobles recíprocos fue de 37 μM . La velocidad máxima fue de 0.97 $\mu moles/min/mg$ (figuras 32., B.).

Figura 31

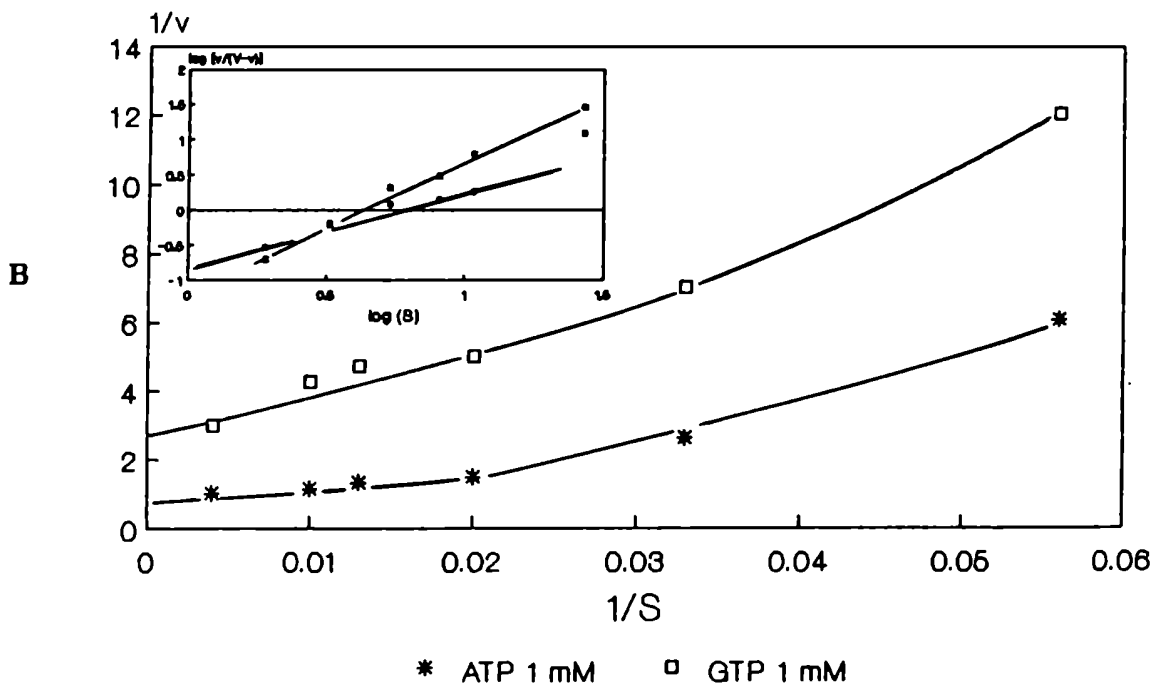
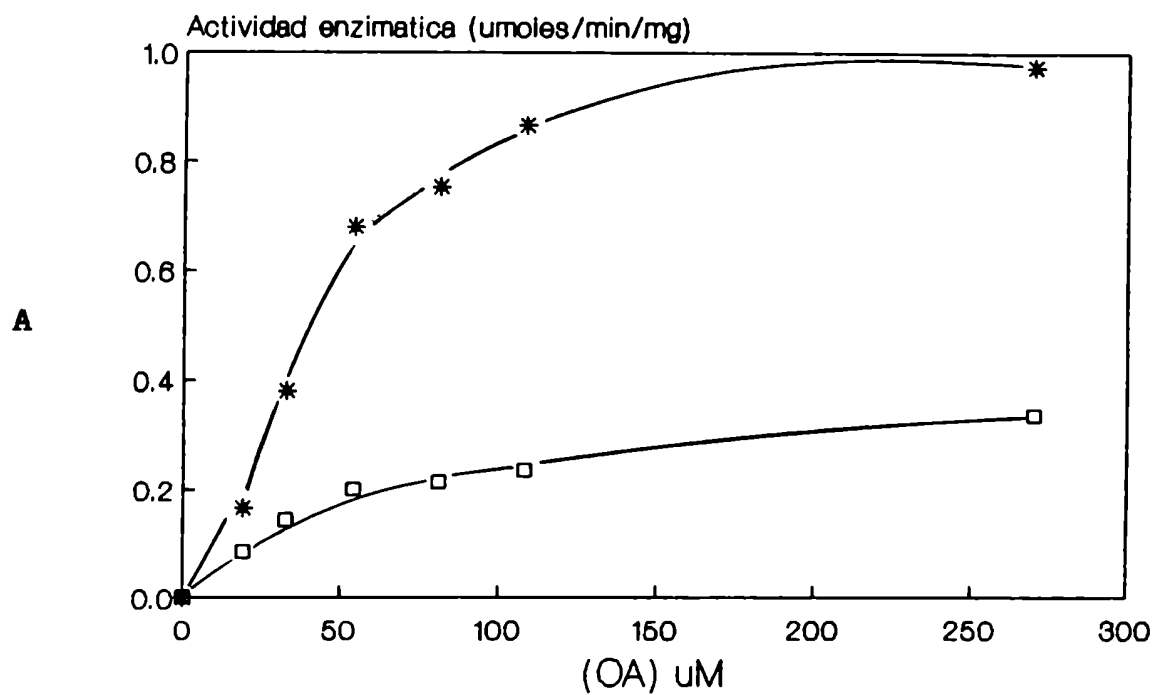
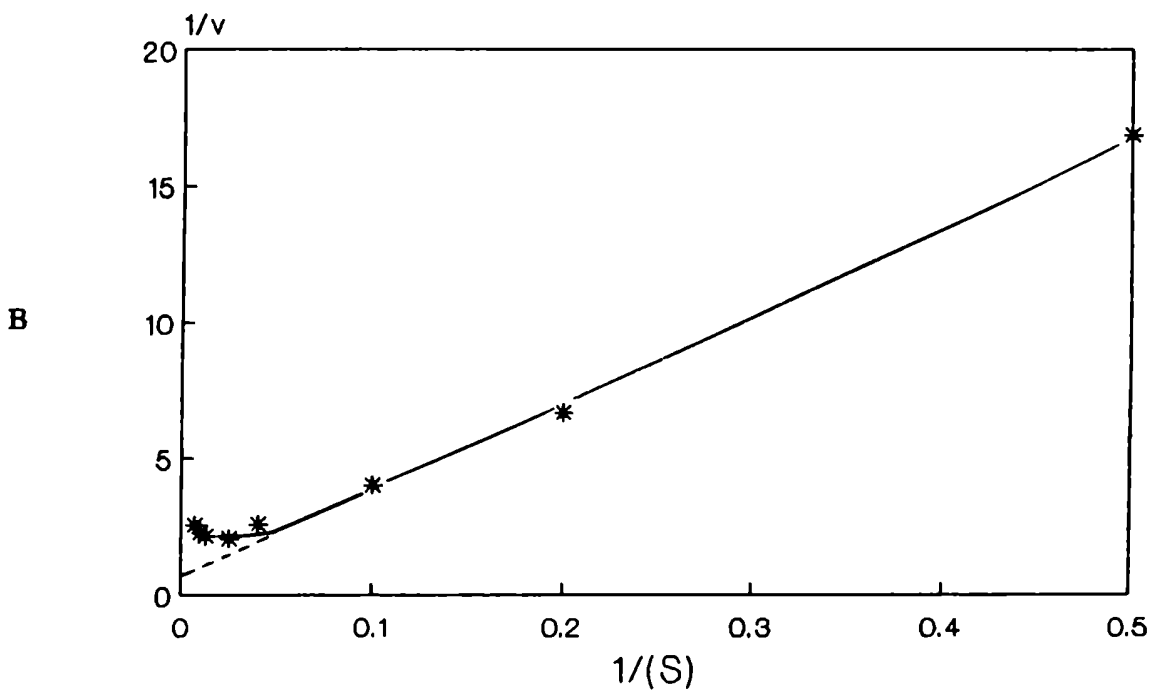
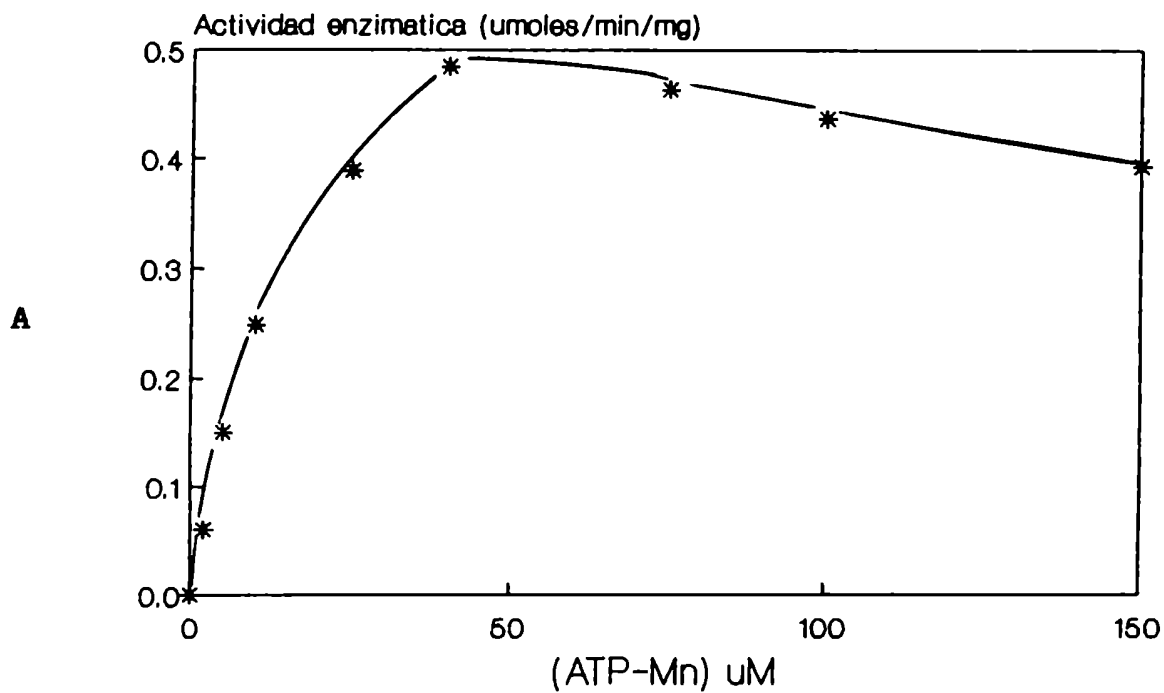


Figura 32



Resultados

Figura 31: Efecto de la variación en la concentración de oxaloacetato sobre la actividad de intercambio de la PEPCK en presencia de ATP o GTP. La actividad se determinó en mezclas de reacción conteniendo ATP 1mM o GTP 1mM y $MnCl_2$ 1.5 mM en incubaciones de 3 minutos. Otras condiciones se detallan en Materiales y Métodos.

A: Gráfico directo

B: Gráfico de dobles recíprocos

Inserto: Gráfico de Hill

Parámetros cinéticos:

$S_{0.5}$ (ATP)= 41 μM ; n_H = 1.6; V_{max} = 1.02 $\mu moles/min/mg$

$S_{0.5}$ (GTP)= 48 μM ; n_H = 1.3 ; V_{max} = 0.36 $\mu moles/min/mg$

Figura 32: Efecto de la variación en la concentración del complejo ATP-Mn en la actividad de intercambio de la PEPCK. La actividad se determinó como se detalla en la leyenda de la figura 31 en mezclas de reacción conteniendo: oxaloacetato 4 mM y una concentración de Mn^{2+} libre constante de 0.5 mM.

A: Gráfico directo

B: Gráfico de dobles recíprocos

Parámetros cinéticos:

K_m = 37 μM ; V_{max} = 0.97 $\mu moles/min/mg$

4. Carácter histerético

Se ha observado que al seguir la marcha de la reacción por el método espectrofotométrico, a tiempos largos (15-30 minutos) se producía una significativa activación de la enzima. En la figura 33 (-□-) se reproduce un trazado típico de absorbancia en función del tiempo de incubación.

Este tipo de comportamiento ha sido observado por ejemplo con la PEPCCK y la fosfofructoquinasa aisladas de Ascaris suum y con enzimas de otros orígenes (Pietrzak Roher et al, 1986; Cook et al, 1987; Bock y Frieden, 1976 y Reinhart y Lardy, 1980).

Una activación mucho más marcada se obtenía cuando se incubaba la enzima previa dilución en amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5 a 0° C durante 90 minutos antes de medir la actividad.

Estos estudios se llevaron a cabo con una preparación proveniente del segundo paso de la purificación (precipitación fraccionada con sulfato de amonio).

Para poder comparar los resultados obtenidos entre los distintos experimentos expresamos los mismos como % de activación de acuerdo a la ecuación:

$$\% \text{ activación} = [(v_f - v_o) / v_o] \cdot 100$$

donde v_f es la máxima actividad alcanzada y v_o es la actividad inicial.

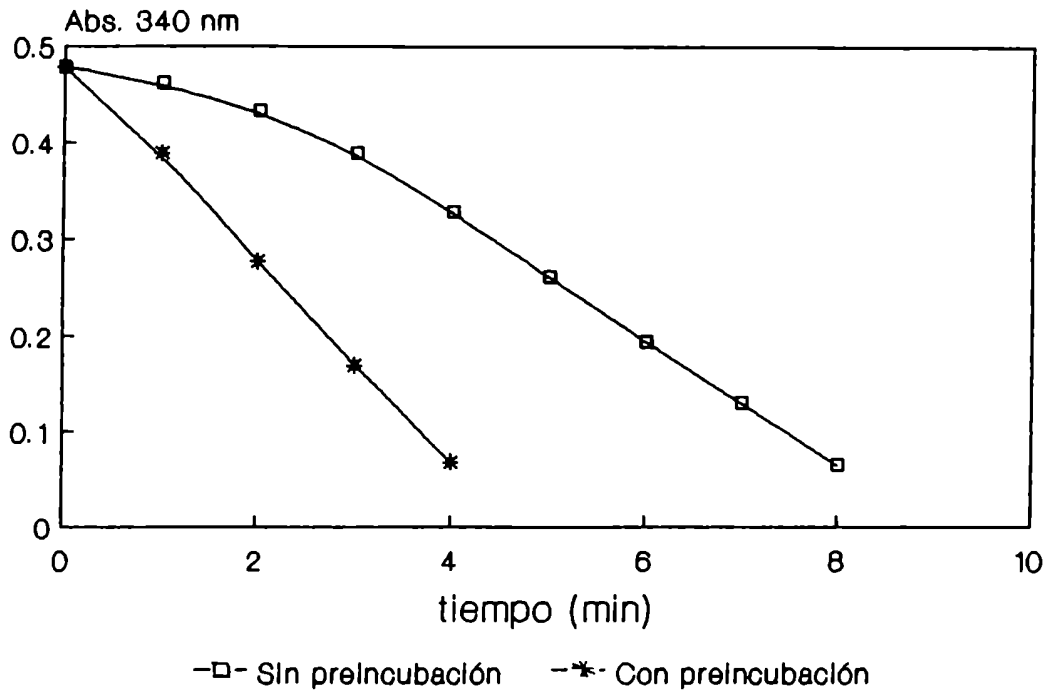


Figura 33: Carácter histerético de la PEPCK.

Trazado típico de absorbancia en función del tiempo de incubación obtenido al determinar la actividad enzimática por el método espectrofotométrico. Las condiciones experimentales se detallan en el texto.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla XVI. Su análisis demuestra que la enzima se activó hasta un 90% durante el curso de la reacción, cuando no se la diluía y preincubaba previamente (experimento 1). Sin embargo, si se partía de una preparación enzimática que había sido diluida 1/5 en amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5 y preincubada a 0°C durante 90 minutos, la actividad inicial era un 193% mayor que en el caso anterior y la activación durante el curso de la reacción sólo llegó al 12% (experimento 2).

Estos resultados sugieren que la enzima se activa en diferente grado cuando se la diluye en distintos amortiguadores. La actividad es mayor si se trata de amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5 puesto que en Tris-Acetato 0.1 M pH 6.7 la actividad máxima obtenida sólo representa un 58% de la actividad inicial de la preparación diluida en borato-bórico (experimentos 4 y 5).

La actividad inicial disminuyó cuando se utilizaron cantidades crecientes de enzima (tanto en el caso de la preparación diluida como en el de la que nó), pero en el caso de la preparación no diluida previamente se obtuvieron activaciones de hasta un 120 % durante su incubación a 30 °C (experimento 3), en cambio si la preparación había sido previamente diluida e incubada a 0 °C durante 60 minutos la activación durante la incubación sólo llegó al 5% (experimento 4).

Resultados

Tabla XVI: Caracter histerético de la PEPCK

Exp.	Condición Experimental	Volumen de enzima utilizado en el ensayo (ul)	V_o^{*1} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	V_f^{*2} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	$[(V_f - V_o)/V_o]100$ (%)
1	Sin dilución ni preincubación.	2	2.38	4.52	90
2	Diluido 1/5 en A* y preincubado 90 min a 0°C.	10	34.81	39.02	12
3	Sin dilución ni preincubación.	1	0.97	2.22	129
		2	2.15	3.60	67
		3	1.86	4.06	119
4	Diluido 1/5 en A* y preincubado 60 min a 0°C.	5	17.78	18.75	5.4
		10	26.27	26.93	2.5
		15	38.18	38.18	0
5	Diluido 1/5 en B* y preincubado 60 min a 0°C.	10	11.67	15.21	30

Amortiguador A* : borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5

Amortiguador B* : Tris-Acetato 0.1 M pH 6.7.

La preparación utilizada en estos experimentos provenía de la segunda etapa del método de purificación (precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y contenía 3.7 mg de proteínas por mililitro.

*1 V_o : velocidad inicial

*2 V_f : velocidad final

4.1. Efecto de sales y de DTT sobre el carácter histerético

Estos experimentos se realizaron con preparaciones obtenidas por precipitación fraccionada con sulfato de amonio entre 45 y 70 % de saturación (2° etapa del método de purificación descrito) que fueron dializadas contra amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5.

La actividad enzimática se determinó por el método espectrofotométrico utilizando una mezcla de reacción estandar con los agregados que en cada caso se especifican. Las preparaciones utilizadas no fueron diluidas previamente, salvo cuando se indica expresamente.

Se graficó la variación de densidad óptica a 340 nm en función del tiempo de incubación. De las pendientes de dichas curvas a distintos tiempos se calcularon las velocidades respectivas en cada punto las cuales se muestran en el gráfico de la figura 34.

El análisis de esta figura indica que, en las condiciones de medida utilizadas, la actividad en todos los casos se incrementó a medida que procedía la reacción. La sola presencia de DTT en la mezcla de incubación produjo un efecto significativo de activación con respecto al control (\bullet , \ast). También se produjo una activación significativa con respecto al control con DTT por agregado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (\square), Na_2SO_4 (Δ , \times) o $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$

(X , ◇) siendo los dos primeros más efectivos que el último.

El hecho de que el $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ en concentraciones iguales o mayores a las del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o Na_2SO_4 produzca menor efecto que estos últimos parecería sugerir que el responsable en mayor grado de la activación sea el ión sulfato más que el amonio, sin descartar la posibilidad de que la diferencia de efecto sea debida a la menor disociación del $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$.

La preincubación de la enzima durante 20 minutos a 0°C produjo una velocidad inicial significativamente mayor que cuando se omite la preincubación con un período mucho más corto para alcanzar la actividad máxima (figura 34, B).

Se realizó también con esta preparación enzimática un experimento similar al descrito anteriormente pero utilizando concentraciones crecientes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (figura 35). Se pudo comprobar que el efecto activador es dependiente de la concentración de sal.

A la concentración más alta utilizada se observó que la actividad aumentaba rápidamente en los primeros minutos de incubación para tender a un estado estacionario en contraposición con lo que ocurría en ausencia de sal, en cuyo caso se observó un período lag de aproximadamente 4 minutos, después del cual la actividad comenzó a incrementarse.

En un experimento similar realizado con una preparación

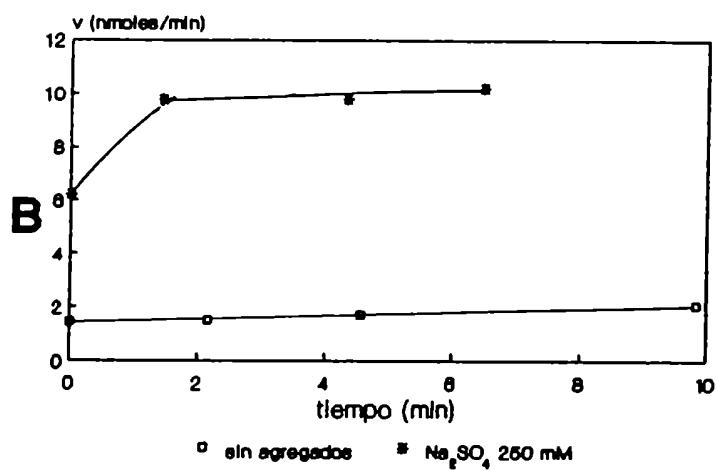
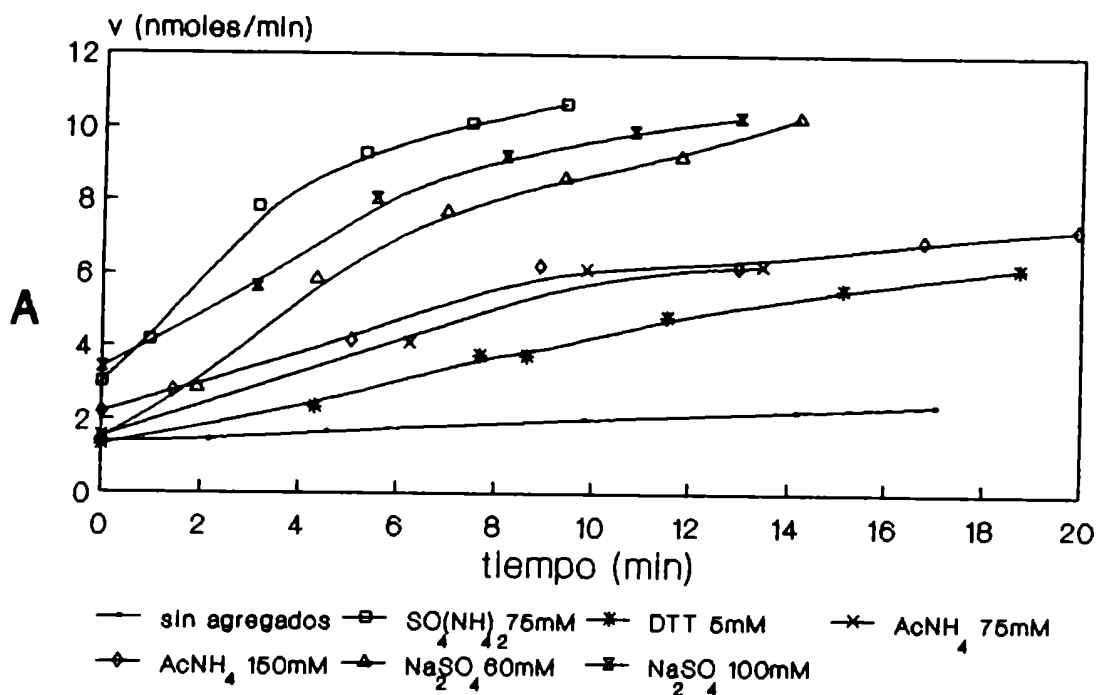


Figura 34: Efecto de sales y de DTT sobre la actividad enzimática de carboxilación determinada por el método espectrofotométrico. Para la realización de estos experimentos se utilizó una preparación enzimática proveniente de la segunda etapa del método de purificación (precipitación fraccionada con sulfato de amonio) que fue previamente dializada exhaustivamente

contra amortiguador borato-bórico 50 mM EDTA 0.1 mM pH 7.5 durante aproximadamente 24 horas. En cada caso se utilizaron 10 ul de la preparación dializada (5.3 mg/ml).

A: Efecto de los reactivos de tioles agregados directamente a la mezcla de reacción durante la incubación. Se agregó DTT 5 mM a todas las mezclas de reacción que contenían sales.

B: Efecto de la preincubación de la enzima durante 20 minutos a 0°C con Na_2SO_4 250 mM en la actividad enzimática determinada en una mezcla de reacción sin agregados.

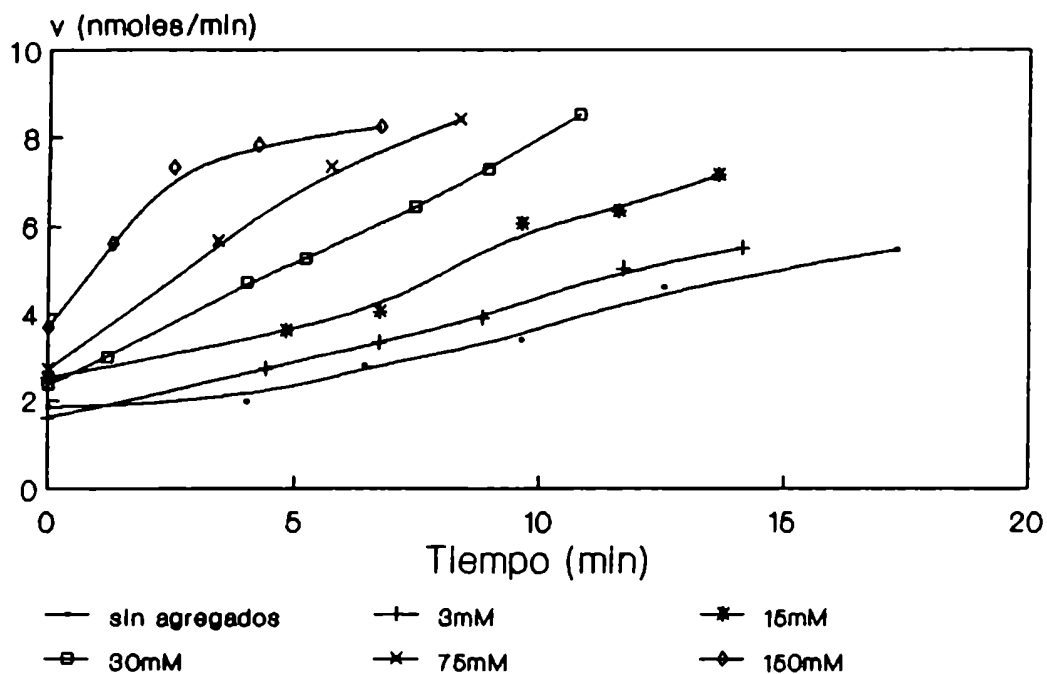


Figura 35: Actividad carboxilante de la PEPCK en función del tiempo de incubación en mezclas de reacción con distintas concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las condiciones de la determinación fueron iguales a las detalladas en la leyenda de la figura 34. En todos los casos se incluyó DTT 5mM en la mezcla de reacción.

parcialmente purificada proveniente de la 5° etapa del método de purificación descrito (cromatografía en hidroxilapatita) y previamente dializada se utilizaron mezclas de reacción estandar con DTT (figura 36).

Al igual que con el extracto más crudo (figura 35) observamos una activación en función del tiempo de incubación y también con respecto a la presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en la mezcla de reacción. Además se observó que la activación en función del tiempo llegó a un máximo para luego disminuir notablemente a tiempos mucho menores que los de los experimentos correspondientes a las figuras 34 y 35. Posiblemente este efecto se deba a la mayor inestabilidad de las preparaciones altamente purificadas.

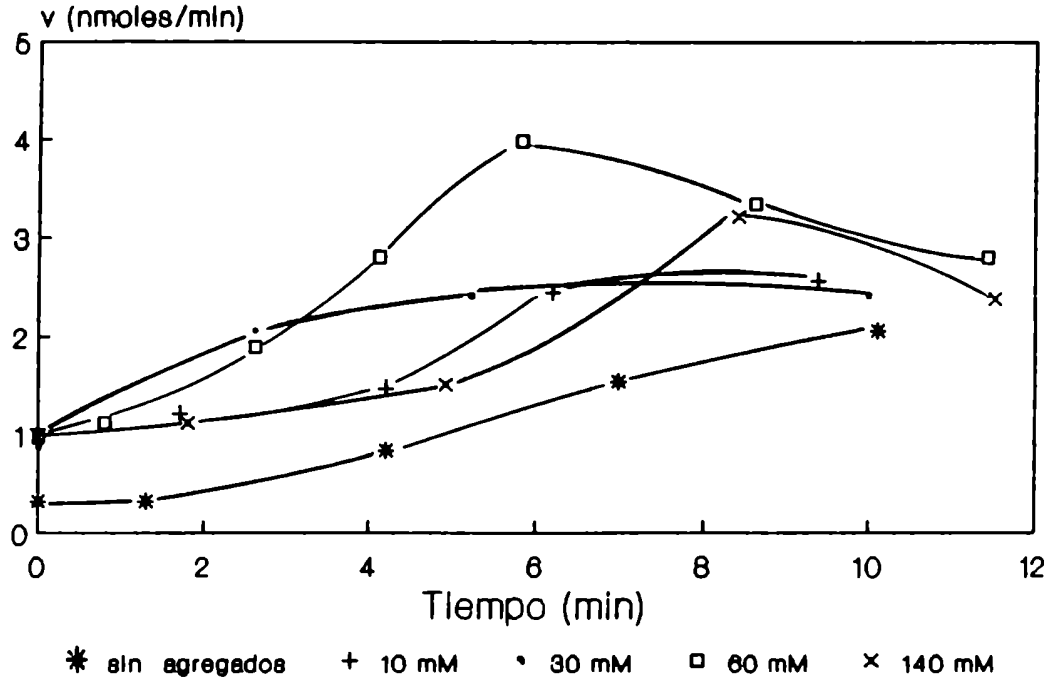


Figura 36: Actividad carboxilante de la PEPCK en función del tiempo de incubación en presencia de diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para estos experimentos se utilizó una preparación enzimática proveniente de la quinta etapa del método de purificación (cromatografía en hidroxilapatita) que previamente se dializó contra amortiguador borato-bórico 50 mM EDTA 0.1 mM pH 7.5 durante aproximadamente 20 horas. En cada caso se utilizaron 25 μl de la preparación dializada (0.1 mg/ml). Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

4.2. Acción del NAD^+ y NADH sobre la actividad enzimática

Como ya se ha dicho, en los experimentos sobre el carácter histerético, al determinar la actividad enzimática por el método espectrofotométrico se había observado que se producía un incremento de la actividad de la enzima en función del tiempo de incubación.

Dado que estábamos en presencia de un sistema acoplado que utiliza NADH , la activación observada podría deberse, entre otros factores a una inhibición de la PEPCK por NADH que desaparece en el curso de la reacción por consumo de esta coenzima o a una activación por NAD^+ que se va formando a medida que procede la reacción o a ambas cosas simultáneamente.

Es de destacar que la inhibición de la PEPCK por NADH ha sido un tema muy discutido ya que experimentos previos en otros sistemas (Whright y Sanwal, 1969; Krebs y Bridger, 1976) indicaban una inhibición por NADH aunque trabajos posteriores (Goldie y Sanwal, 1977; Goldie y Sanwal, 1980) parecen descartar esa posibilidad atribuyendo esa inhibición aparente a la presencia de la enzima malato deshidrogenasa como impureza de la PEPCK o a un artefacto del método de medida utilizado por los primeros autores.

Con el fin de estudiar este problema se determinó el efecto del NAD^+ y del NADH sobre la actividad carboxiquinásica determinada por el método radioquímico de intercambio que no requiere de la presencia de ningún

sistema enzimático acoplado.

Para la realización de estos experimentos se utilizó una preparación proveniente de la cromatografía en hidroxilapatita (5° paso del método de purificación) llevada a 70% de saturación con sulfato de amonio, centrifugada a 20000g durante 20 minutos y resuspendida en amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5. De acuerdo a los resultados que se muestran en la figura 37 ambos nucleótidos presentaron un ligero efecto inhibitorio que fue mayor en el caso del NADH aunque la inhibición no alcanzó el 30% de la actividad enzimática con una concentración de nucleótido de 0.5 mM.

Debe destacarse que el hecho de que la actividad carboxiquinásica de intercambio de la PEPCK no sea inhibida significativamente por las coenzimas no necesariamente implica que éstas no muestren efecto inhibitorio sobre la actividad carboxiquinásica de fijación de CO_2 . Sin embargo, no existen evidencias experimentales que indiquen lo contrario. Los resultados obtenidos parecen descartar la posibilidad de que el anteriormente citado efecto de activación dependiente del tiempo, observado al medir la actividad espectrofotométricamente, se deba a variaciones en las concentraciones relativas de ambos nucleótidos.

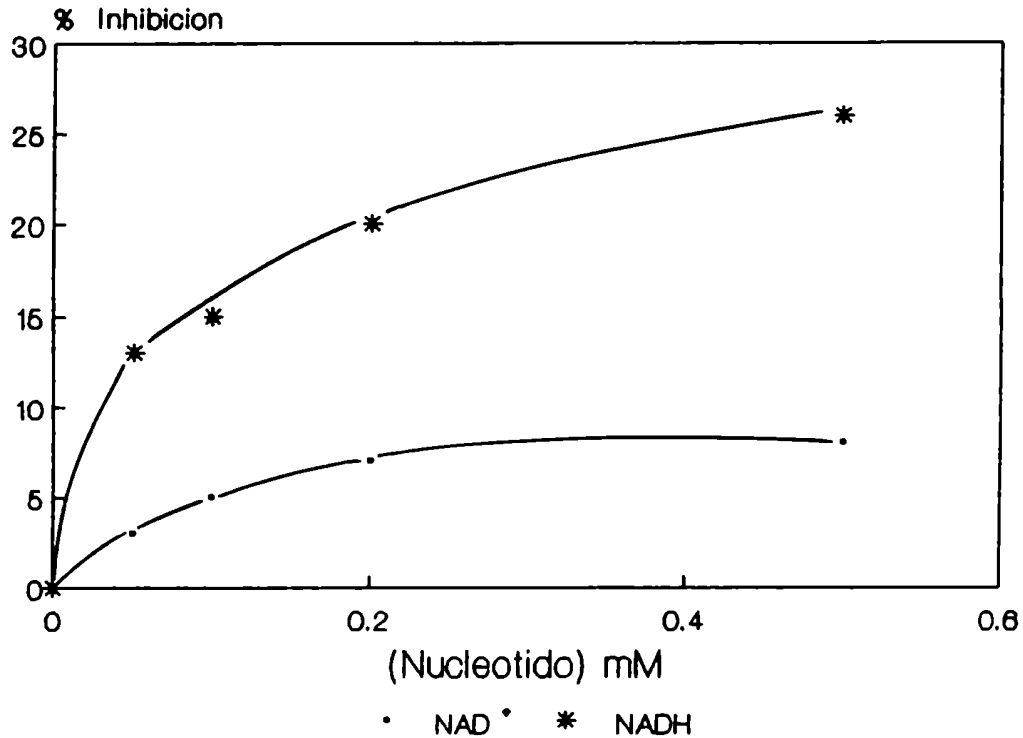


Figura 37: Inhibición porcentual relativa a un control de los nucleótidos NAD⁺ y NADH sobre la actividad carboxiquinásica de intercambio determinada por el método radioquímico. En estos experimentos se utilizó una preparación enzimática proveniente de la quinta etapa del método de purificación (cromatografía en hidroxilapatita). Las condiciones experimentales fueron como se describió en Materiales y Métodos.

5. Efecto del quinolinato sobre la actividad de la PEPCK

El quinolinato, producto del catabolismo del triptofano y precursor potencial del NAD (figura 38), es un inhibidor específico de PEPCKs de diversos orígenes (Williamson et al, 1971; McDaniel et al, 1972; Soling y Kleineke, 1976; Lloyd y Barret, 1983).

Con el objeto de determinar si dicho metabolito es capaz de ejercer algún efecto en la enzima aislada de T. cruzi se ensayó su acción sobre una preparación enzimática obtenida del último paso de la purificación (cromatografía en ATP-agarosa).

Cuando la actividad enzimática se determinó por el método de intercambio utilizando una mezcla de reacción estandar sin el agregado del 2°catión (Mg^{2+}) se obtuvieron los resultados representados en la figura 39. Una concentración de quinolinato de 0.04 mM produce una inhibición del 30% en la actividad de la enzima y se alcanza un 50% de inhibición cuando la concentración es de 0.25 mM (I_{50}). Es de hacer notar que aún a una concentración de 2 mM no se obtiene inhibición total.

Cuando el quinolinato se ensayó sobre la reacción de fijación de CO_2 sobre PEP (método espectrofotométrico), se obtuvo una inhibición del 50% con 0.044 mM de quinolinato (I_{50}). Tampoco en este caso se obtuvo inhibición total con el reactivo (figura 40).

Resultados

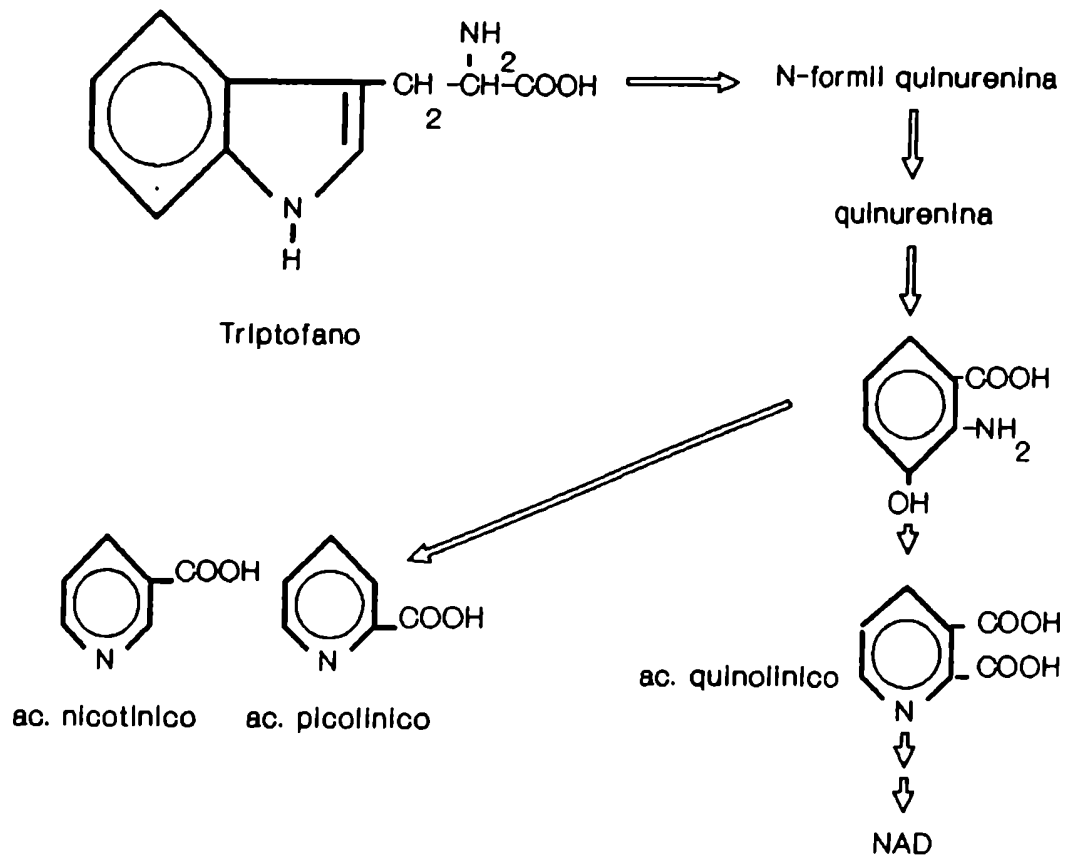


Figura 38: Catabolismo del triptofano. Síntesis de ácido quinolínico. Metabolitos relacionados.

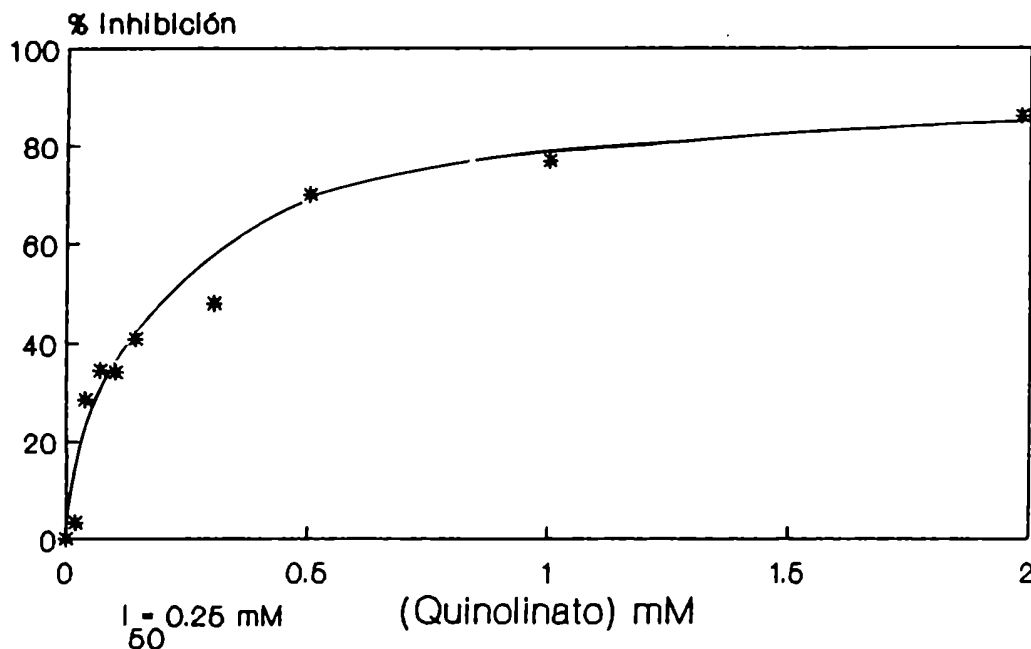


Figura 39: Efecto del ácido quinolínico sobre la actividad carboxiquinásica de intercambio determinada por el método radioquímico. En estos experimentos se utilizó una preparación proveniente de la última etapa del método de purificación (cromatografía en ATP-agarosa). La mezcla de reacción fue como se describió en Materiales y Métodos omitiendo el MgCl_2 .

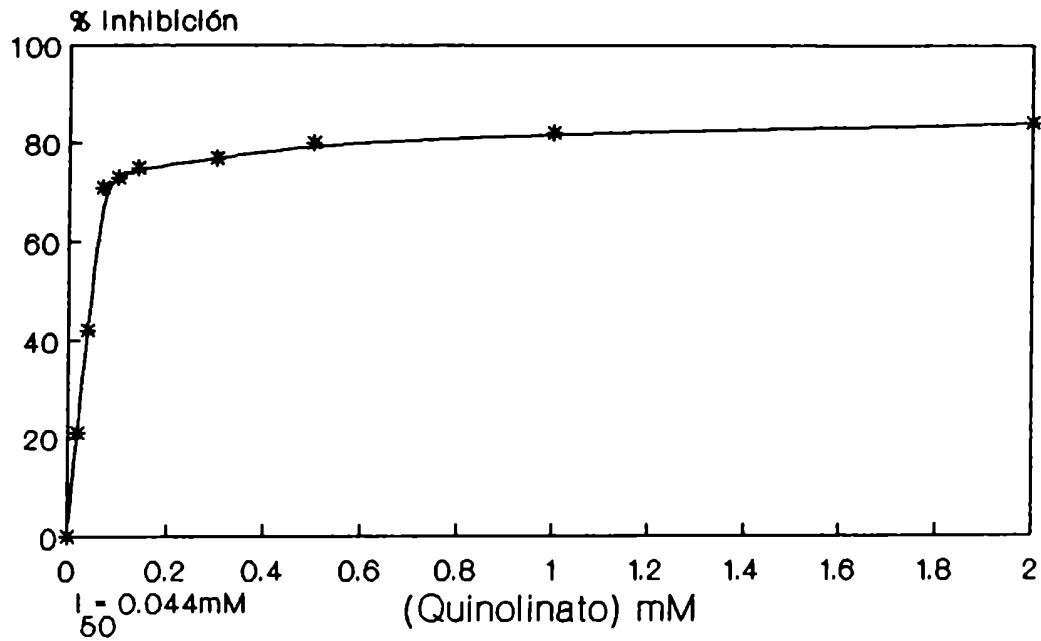


Figura 40: Efecto del ácido quinolínico sobre la actividad carboxilante de la PEPCK determinada por el método espectrofotométrico. La preparación enzimática utilizada provino de la última etapa del método de purificación (cromatografía en ATP-agarosa) y las condiciones experimentales fueron como se describió en Materiales y Métodos.

Si bien los resultados obtenidos indican que el quinolinato también es un inhibidor de la enzima aislada del T.cruzi resta aún por estudiar de qué tipo de inhibición se trata.

6. Efecto de los reactivos de grupos sulfhidrilos

Se ha demostrado que PEPCKs de distintos orígenes requieren de grupos sulfhidrilos libres para obtener máxima actividad, tanto para la reacción de carboxilación como para la de decarboxilación (ver Introducción).

Se estudió primero el efecto de los reactivos protectores de grupos sulfhidrilos sobre la actividad enzimática.

Para estos experimentos se utilizaron preparaciones enzimáticas con diferente grado de purificación: un extracto obtenido por precipitación fraccionada con sulfato de amonio de un extracto crudo (A y B) (2° etapa del método de purificación), el proveniente de la etapa de filtración a través de gel (C) (3° etapa) y uno obtenido del cromatofocado de un extracto crudo, precipitado con sulfato de amonio según se describe en Materiales y Métodos (D).

El agregado de ditioneitol, beta-mercaptoetanol o glutation a la mezcla de reacción no produce efectos significativos sobre la actividad enzimática cuando se utilizaron las preparaciones A, B o C (Tabla XVII).

Un experimento similar se realizó utilizando la preparación D y en este caso en presencia de DTT 5 mM la actividad se incrementó en un 50% (Tabla XVII).

Tabla XVII: Efecto de los protectores de grupos sulfhidrilos sobre la actividad de la enzima.

	Reactivo	Actividad Específica (mU/mg)
A	sin agregados	10
	DTT 5 mM	10
B	sin agregados	11
	DTT 5 mM	12
C	sin agregados	25
	DTT 5 mM	21
	BME 5 mM	21
	GSH 5 mM	25
D	sin agregados	30
	DTT 5 mM	48

Para la realización de estos experimentos se utilizaron los siguientes protectores de tioles: ditioneitol (DTT), beta-mercaptoetanol (BME) y glutation (GSH). En A y B se utilizó un extracto proveniente de la segunda etapa del método de purificación (precipitación fraccionada con sulfato de amonio) que contenía 27.3 mg/ml de proteínas. El extracto C provenía de la cromatografía de filtración en geles (12.7 mg/ml de proteínas) y D de un experimento de cromatofocado (6.4 mg/ml). Los detalles de la obtención de los extractos se describen en Materiales y Métodos. En A y C la actividad enzimática se determinó por el método radioquímico de intercambio, en B y D por el método radioquímico de fijación de CO₂ sobre PEP.

Se estudió entonces el efecto de los reactivos protectores de grupos sulfhidrilos sobre la preincubación de la enzima a 0°C durante 35 minutos. La actividad de intercambio se determinó posteriormente en mezclas de reacción con o sin los reactivos indicados en cada caso (Tabla XVIII).

Cuando la enzima se preincubó en ausencia de los reactivos se produjo un incremento de la actividad si durante la incubación se incluían DTT o GSH con respecto a un control en el que no se incluyeron.

Cuando la preincubación se hizo en presencia de DTT 5mM la activación fue significativa y aumentó ligeramente cuando también se agregó DTT 5mM a la mezcla de reacción.

En el caso del GSH se observó activación cuando el reactivo estaba presente en la preincubación con una pequeña inhibición si también se incluía en la mezcla de reacción.

Posteriormente se ha estudiado el efecto de reactivos de grupos sulfhidrilos sobre la actividad carboxiquinásica utilizando para ello la reacción de intercambio. De esa manera se evitan los posibles efectos secundarios de los inhibidores sobre los sistemas enzimáticos acoplados requeridos cuando se emplean los otros métodos de medida.

Para estos experimentos se utilizaron diferentes tipos de reactivos de grupos sulfhidrilos:

Tabla XVIII: Efecto de la preincubación de la enzima con protectores de grupos tioles sobre su actividad.

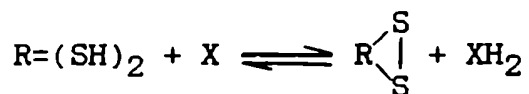
REACTIVO AGREGADO DURANTE		ACTIVIDAD ESPECIFICA (mU/mg)
PREINCUBACION	INCUBACION	
		9.0
	DTT 5 mM	10.5
	GSH 5 mM	15.8
DTT 5 mM		12.0
DTT 5 mM	DTT 5 mM	14.7
GSH 5 mM		15.9
GSH 5 mM	GSH 5 mM	14.2

Para la realización de estos experimentos se utilizó una preparación enzimática (27.3 mg/ml) proveniente de la segunda etapa del método de purificación (precipitación fraccionada con sulfato de amonio). La enzima se diluyó 1/10 en amortiguador Tris-Ac 0.1 M pH 6.7 preincubándose en presencia o ausencia de los protectores de tioles a 0°C durante 30 minutos. Finalizada la preincubación una alícuota de la mezcla de preincubación se agregó a mezclas de reacción con o sin los diferentes reactivos a las concentraciones indicadas procediéndose en la forma usual con el método radioquímico de intercambio para la determinación de actividad.

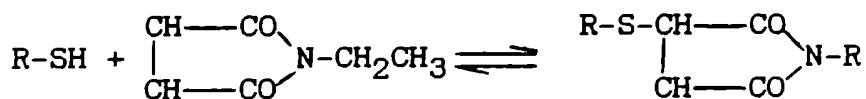
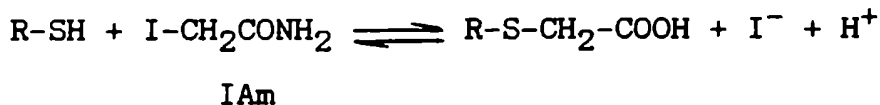
- a) Mercuriales orgánicos como el p-cloromercurifenil-sulfonato (CMS), p-cloromercuribenzoato (PCMB) y fluoresceín mercuriacetato (FMA) que reaccionan con los grupos tioles formando mercaptidas:



- b) O-iodosobenzoato que se comporta como un oxidante de grupos sulfhidrilos vecinales intra o intermoleculares.

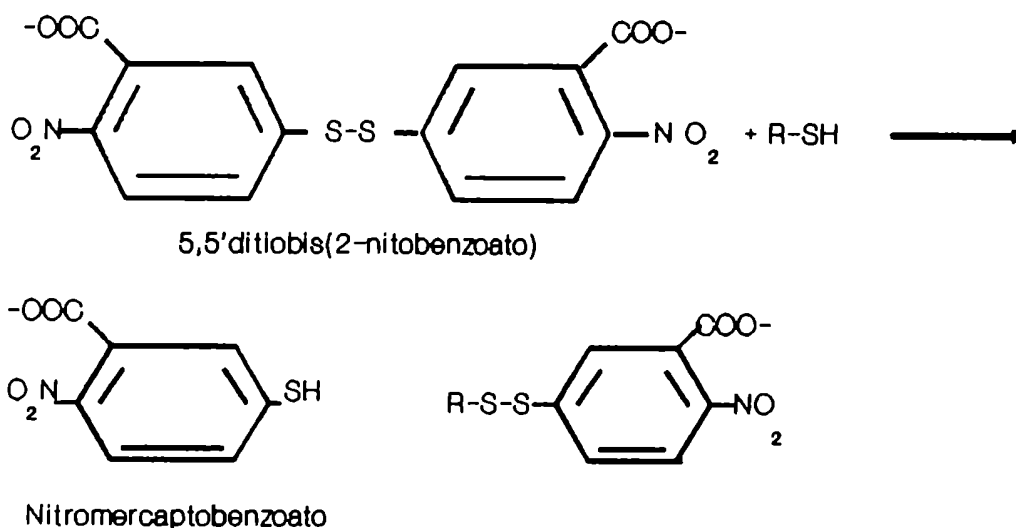


- c) Iodoacetamida y N-etilmaleimida que actúan como alquilantes de grupos sulfhidrilos según:



NEM

d) 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) que reacciona con los tioles liberando un mol de mercaptobenzoato por mol de tiol presente:



Estos ensayos se realizaron preincubando la enzima con el inhibidor de 5 a 6 minutos a 30°C en una mezcla que sólo contenía la enzima, el inhibidor y amortiguador determinando la actividad enzimática remanente por agregado de dicha mezcla a un medio de reacción que contenía todos los sustratos y el inhibidor en la misma concentración en que estaba presente durante la preincubación.

Los mercuriales orgánicos se comportaron como inhibidores muy potentes de la actividad enzimática dado que se obtiene el 50% de inhibición con concentraciones 0.1 uM de CMS, 0.07 uM de FMA y 0.14 uM de PCMB y una inhibición total a concentraciones 1 uM de cualquiera de

los tres (figura 41).

Con o-Iodosobenzoato se alcanza un 50% de inhibición a una concentración 0.5 mM y un 98% con 7.5 mM (Tabla XIX).

Ni la N-etilmaleimida ni la Iodoacetamida son inhibidores muy potentes de la actividad de PEPCK dado que sólo se obtiene un 9% de inhibición con 1 mM de NEM y un 25% con 0.1 mM de IAM (Tabla XX).

En la figura 42 se muestra el efecto del DTNB. En este caso, se alcanza un 50% de inhibición con una concentración 25 μ M de DTNB y la inhibición llega al 98% con 1 mM.

Se estudió también la posibilidad de revertir la inhibición lograda con los reactivos de tioles mediante protectores de dichos grupos como el ditiotreitól.

En estos experimentos se preincubó la enzima con el inhibidor durante 3 minutos a 30°C y luego se agregó el DTT preincubándose la mezcla otros 5 minutos. Transcurrido ese lapso se determinó la actividad remanente en una mezcla de reacción que contenía todos los sustratos pero carecía tanto de inhibidor como de DTT (Tabla XXI).

Los resultados de este experimento indican que el DTT es capaz de revertir parcialmente una inhibición del 97% obtenida con PCMB 0.5 μ M (la inhibición en presencia de DTT es sólo del 22%).

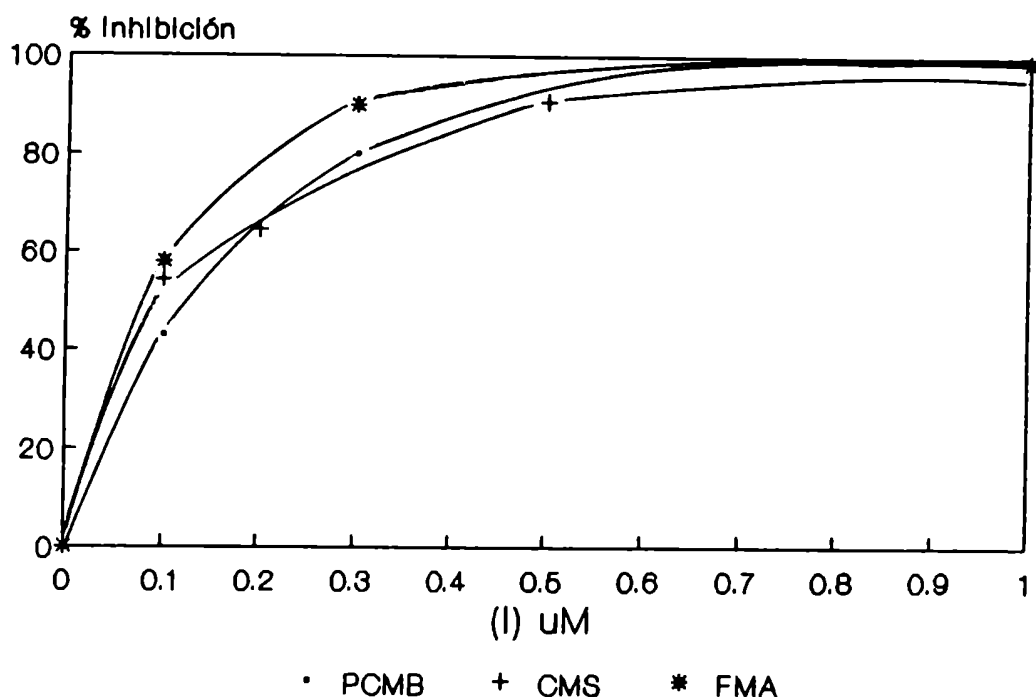


Figura 41: Efecto de reactivos de tioles (mercuriales orgánicos) sobre la actividad carboxiquinásica de intercambio. Para estos experimentos se utilizó una preparación enzimática altamente purificada (proveniente de la etapa de cromatografía en ATP-agarosa).

La enzima se preincubó durante 6 minutos a 30°C en 250 ul de amortiguador Tris-Ac 80 mM pH 6 con el inhibidor en la concentración indicada en cada caso. Luego de ese lapso se inició la reacción agregando el volumen total de preincubación a 250 ul de mezcla de reacción cuya concentración final fué la siguiente: amortiguador Tris-Ac 50 mM pH 6, oxaloacetato 11.9 uM, MnCl₂ 1.6 mM, ¹⁴CO₃HNa (1.29 uCi/umol) 1.92 umol/ml, ATP 1 mM e inhibidor a la concentración indicada en cada caso.

Otras condiciones experimentales fueron como se describió en Materiales y Métodos.

Tabla XIX: Efecto del reactivo orto-iodosobenzoato sobre la actividad de PEPCK.

CONCENTRACION DEL REACTIVO	% INHIBICION
10 μ M	7.5
1.0 mM	71.0
7.5 mM	98.0

Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la leyenda de la figura 41.

Tabla XX: Efecto de N-etilmaleimida y Iodoacetamida sobre la actividad de PEPCK.

REACTIVO	% INHIBICION
NEM 1.0 mM	9
IAm 0.1 mM	25

Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la leyenda de la figura 41.

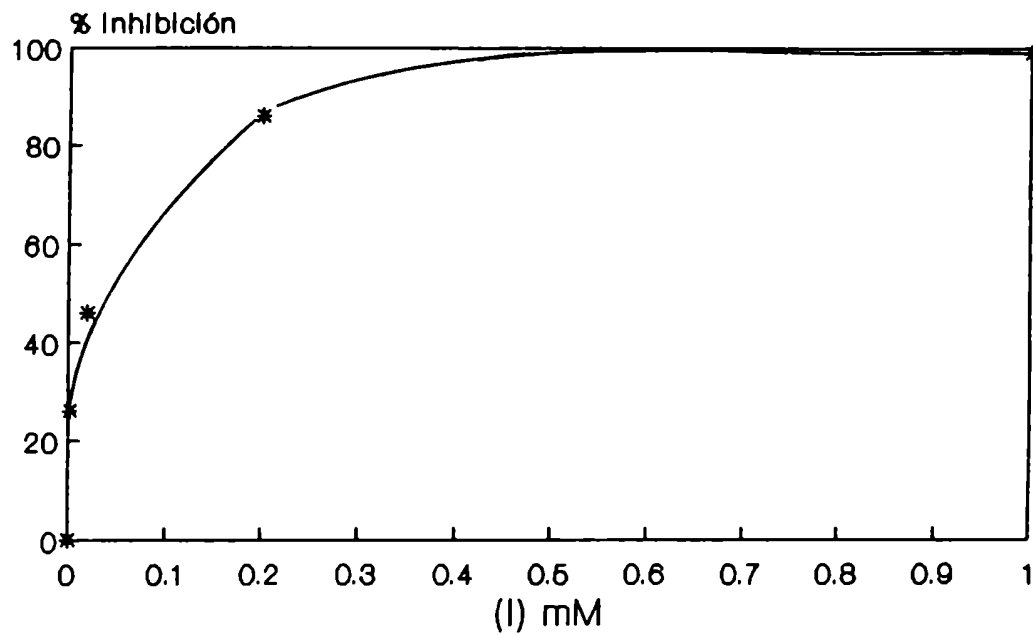


Figura 42: Efecto del DTNB sobre la actividad carboxiquinásica de intercambio de la PEPCK.

Las condiciones experimentales fueron similares a las detalladas en la leyenda de la figura 41.

Tabla XXI: Reactivación de la PEPCK con DTT.

REACTIVOS UTILIZADOS EN LA PREINCUBACION	ACTIVIDAD ENZIMATICA (nmoles/min/mg)	INHIBICION (%)
1. Control	389.2	0
2. PCMB 0.5 μ M	12.1	97
3. DTT 2 mM	389.8	0
4. PCMB 0.5 μ M + DTT 2 mM	303.8	22

La enzima se preincubó durante tres minutos en un volumen final de 245 μ l en presencia o ausencia de PCMB en la concentración indicada y amortiguador Tris-Ac 80 mM pH 6, y luego de agregarse 5 μ l de H₂O en los casos 1. y 2. y de DTT 0.1 M en 3. y 4., se continuó con la preincubación durante cinco minutos más. Terminado ese período se agregaron los 250 μ l de esta mezcla a igual volumen del medio de reacción cuya composición fué igual a la descrita en la leyenda de la figura 41 pero que carecía tanto de inhibidor como de DTT.

El cálculo del porcentaje de inhibición para el caso 4. se hizo en relación al control 3.

7. Investigación de la presencia de isoenzimas y de posibles efectos de proteasas sobre la PEPCCK del T. cruzi.

Dado que existía una discrepancia, más allá de lo operativamente aceptable en los pesos moleculares para la enzima nativa y la subunidad entre los determinados por Urbina (1987) y los presentados en esta Tesis fue de interés estudiar alguna posible causa de dicha diferencia.

Se investigó entonces si ésta podía deberse a que se trataba de formas moleculares diferentes con la misma actividad enzimática. Con este fin se intentó una separación de dichas formas utilizando la técnica de cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC).

En un primer experimento para conocer el comportamiento de la enzima en este sistema se utilizó material proveniente de la última etapa del método de purificación (ATP-agarosa) dializado contra amortiguador Tris-HCl 20mM EDTA 0.1mM pH 7.6.

Se utilizó una columna de intercambio aniónico (Mono Q) equilibrada en Tris-HCl 20 mM EDTA 0.1 mM pH 7.6 eluyéndosela con un gradiente continuo de 0 a 30% de NaCl en el mismo amortiguador.

Los resultados, que se muestran en la figura 43, indican que se obtuvo sólo un pico con actividad de PEPCCK que eluyó con una concentración de NaCl de aproximadamente 0.18 M.

Se realizaron entonces análisis cromatográficos en FPLC de extractos con menor grado de pureza.

En esos casos, los perfiles de elución mostraron algunas veces la presencia de dos picos con actividad carboxiquinásica, determinada ésta por el método espectrofotométrico.

Se llevaron a cabo entonces experimentos tendientes a establecer si se trataba de isoenzimas, modificaciones proteolíticas de la misma proteína o a algún artefacto de los métodos utilizados.

Para ello se realizó un cultivo de células cosechando y procesando una parte de éste en presencia de inhibidores de proteasas.

A 3.38 g de células (peso húmedo) se agregó 10 ml de NaCl 8.5 g/l conteniendo los siguientes inhibidores de proteasas: TLCK (que es un potente inhibidor de la cruzipaina, la proteasa cuantitativamente más importante en el T. cruzi) 0.2 mM, PMSF 2 mM, pepstatina 0.01 mM, leupeptina 0.005 mM y E-64 0.005 mM, mientras que paralelamente se cosecharon 3,64 g de células omitiendo los inhibidores.

Luego de separar los sobrenadantes por centrifugación a 7000rpm durante 10 minutos, los epimastigotes se congelaron a -20°C.

El tratamiento de las células se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos para la purificación de la enzima, excepto que en el caso de los parásitos tratados con inhibidores de proteasas el tratamiento

sónico se realizó en presencia de dichos inhibidores. Para los experimentos de FPLC se utilizaron las fracciones obtenidas del corte entre 45 y 70% de saturación con sulfato de amonio. El tratamiento de las muestras previo a la corrida y la elución de la columna fueron como ya se ha descrito excepto que en algunos casos se utilizó un gradiente de hasta 20% de NaCl 1 M.

En ambos casos (cosecha y tratamiento con y sin inhibidores) se obtuvo un solo pico que eluyó con una concentración 0.11 M de NaCl (figura 44). El rendimiento obtenido con la muestra del tratamiento sin inhibidores fue de aproximadamente el 90%, mientras que en el otro caso sólo se recuperó el 43% de la actividad sembrada. Ante la posibilidad de una baja resolución debido a la gran cantidad de proteína sembrada se recromatografió el material proveniente de cada uno de los picos obtenidos previamente.

En el caso I (con inhibidores) se obtuvieron entonces dos picos: el principal (A) que eluía con 0.11 M de NaCl y otro, con el 22% de la actividad del pico mayor que eluyó a 0.16 M (B) (figura 45.A.).

En el caso II (sin inhibidores) se obtuvo un pico a 0.11 M (C) y otro pequeño, con sólo el 2% de la actividad a 0.18 M (D) (figura 45.B). Esto ocurrió a pesar de que el número de unidades sembradas en este caso fue tres veces mayor que en el caso I.

Resultados

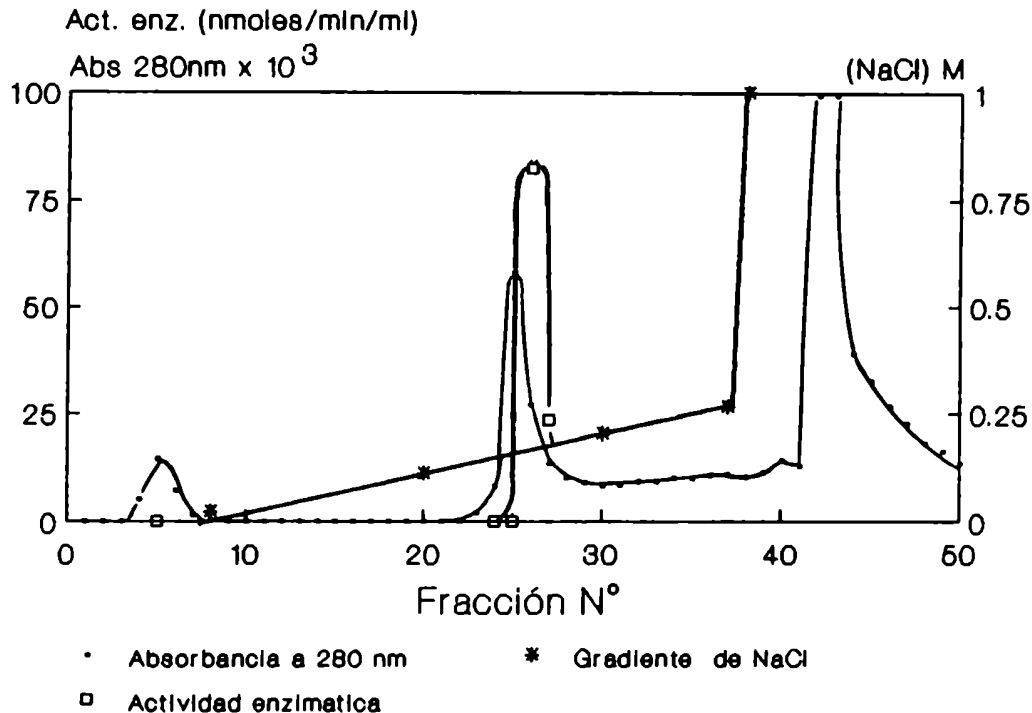


Figura 43: Perfil de elución en FPLC de la PEPCCK altamente purificada de *T. cruzi*. En este experimento se utilizó una preparación proveniente de la etapa de cromatografía en ATP-agarosa. El extracto enzimático (suspensión proteica en amortiguador borato-bórico 50 mM EDTA 0.1 pH 7.5 saturado en sulfato de amonio) se centrifugó a 30000 rpm durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió en 1ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM EDTA 0.1 mM pH 7.6. Se sembró 1 ml de dicho extracto (0.25 mg de proteínas) realizándose la elución en las siguientes condiciones: Gradiente entre 0 y 30% de NaCl 1M en amortiguador Tris-HCl 20 mM EDTA 0.1 mM pH 7.6 en 15 ml y luego un barrido con NaCl 1M en el mismo amortiguador. Flujo: 8 ml/min; velocidad del registrador: 0.5 cm/ml, volumen de inyección: 8.5 ml, volumen de cada fracción: 0.5 ml. La actividad carboxiquinásica eluyó con una concentración de NaCl de 0.18 M.

Figura 44

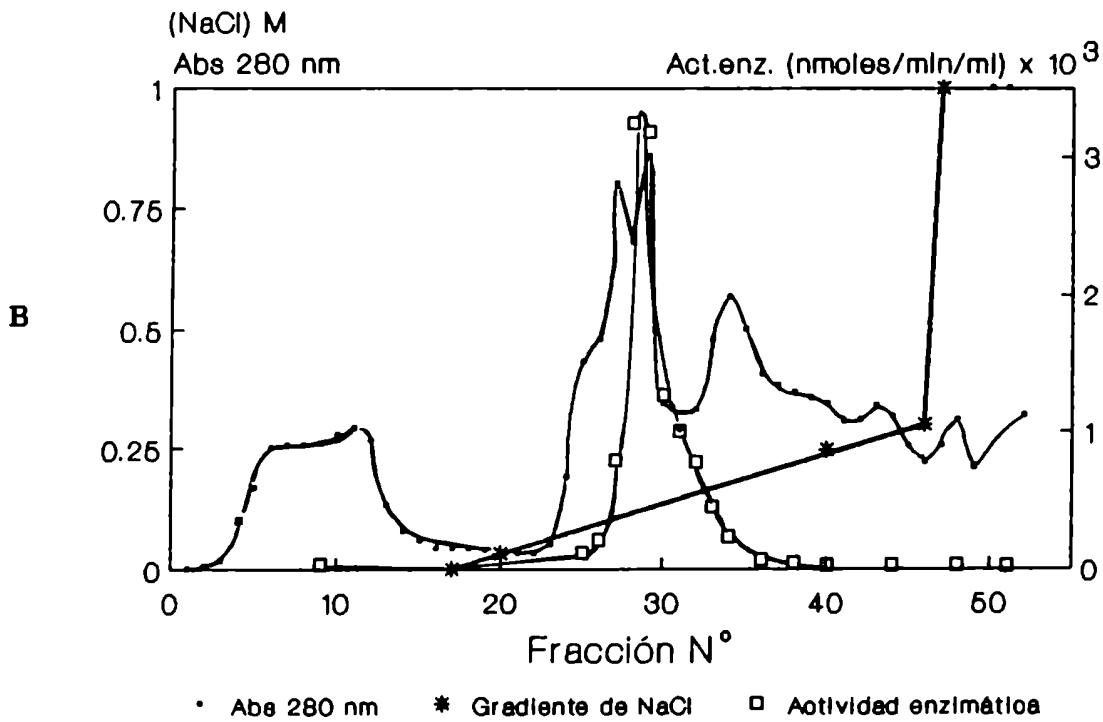
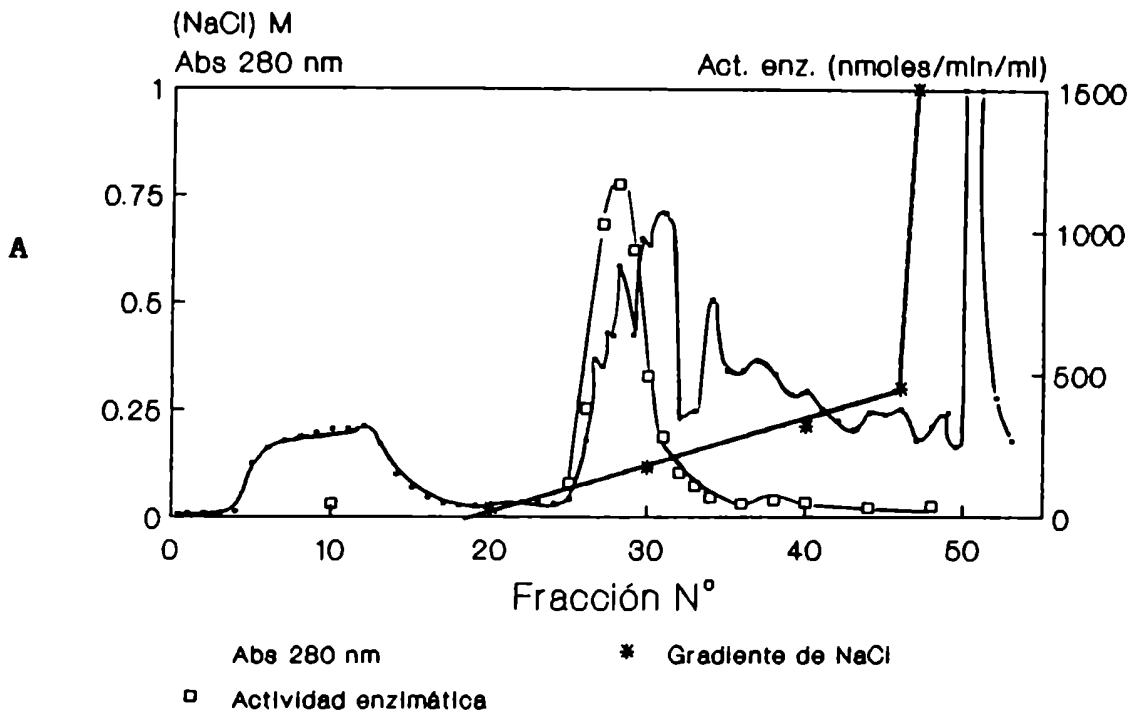


Figura 44: Diagramas de elución en FPLC de extractos provenientes de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio. La ruptura celular se realizó por tratamiento con ultrasonido según se describió en Materiales y Métodos.

A: La cosecha y el tratamiento ultrasónico de las células fueron realizados en presencia de inhibidores de proteasas. El extracto fue dializado exhaustivamente contra Tris-HCl 20 mM EDTA 0.1 mM pH 7.6 y centrifugado a 4000 rpm durante 20 minutos. Se sembraron 4.8 ml de la preparación enzimática con una concentración proteica de 3.3 mg/ml.

B: No se utilizaron inhibidores de proteasas. El extracto enzimático fue tratado en las mismas condiciones que en A sembrándose 4.8 ml del mismo con una concentración proteica de 3.6 mg/ml.

Figura 45

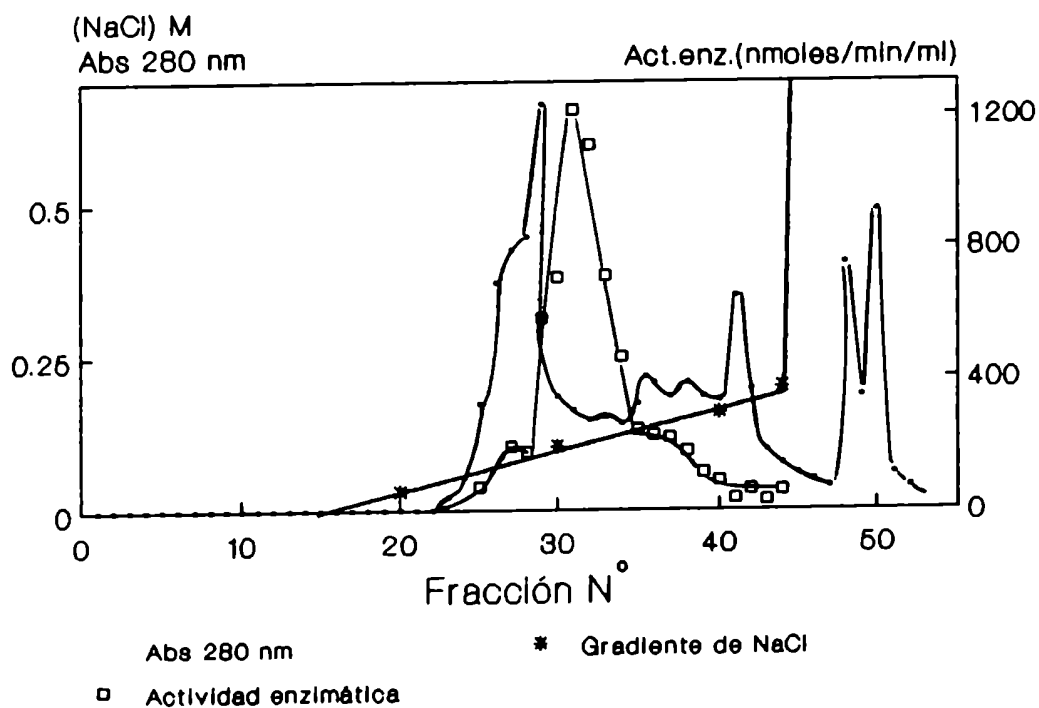
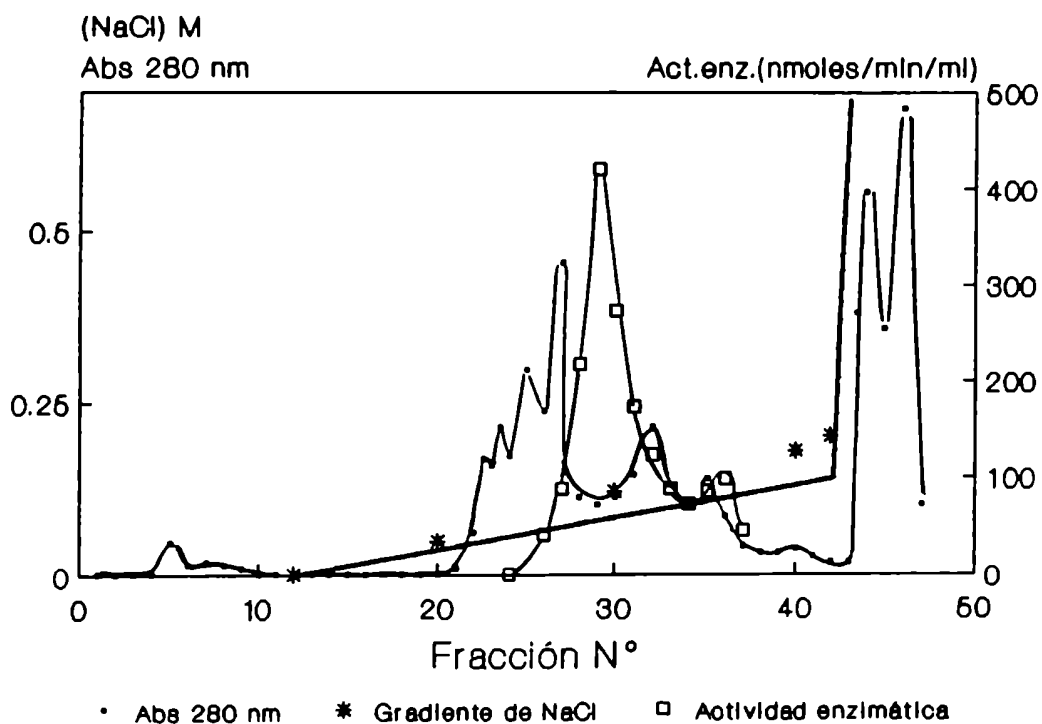


Figura 45: Recromatografía en FPLC de las fracciones con actividad carboxiquinásica obtenidas en los experimentos correspondientes a la figura 44.

A: Se tomaron las fracciones 26 a 31 (2.7 ml) del experimento correspondiente a la figura 44 A y se dializaron contra amortiguador borato-bórico 50 mM EDTA 0.1 mM pH 7.5 saturado en sulfato de amonio. Posteriormente se dializó la suspensión contra 1 litro de amortiguador Tris-HCl 20 mM EDTA 0.1 mM pH 7.6 y el extracto se centrifugó a 25000 g durante 30 minutos. Se sembraron 2.6 ml de dicho extracto que contenían 2.5 mg/ml de proteínas.

B: Se reunieron las fracciones 26 a 34 (4.2 ml) del experimento correspondiente a la figura 44 B y se procedió como en A. Se sembraron 3.5 ml del extracto dializado con una concentración proteica de 2 mg/ml.

Estos resultados permitirían descartar que la aparición del segundo pico se deba a una modificación proteolítica de la enzima. Descartada la modificación proteolítica como origen de la presencia de dos picos en estos experimentos se intentó una separación de aquellos utilizando un fraccionamiento subcelular diferente.

Con este fin se cosechó un nuevo cultivo en la forma habitual pero de acuerdo a los resultados anteriores se omitieron los inhibidores de proteasas en el proceso.

Las células se sometieron a un tratamiento de ruptura suave por ciclos de congelamiento y descongelamiento según se describe en Materiales y Métodos. Se utilizó entonces por una parte la fracción soluble obtenida por este tratamiento y por otra parte el material solubilizado en el tratamiento ultrasónico del residuo celular.

Ambos extractos se sometieron a una precipitación fraccionada con sulfato de amonio entre 45 y 70% de saturación.

La cromatografía en FPLC de la muestra proveniente del tratamiento por congelamiento y descongelamiento reveló un único pico que eluyó en diferentes corridas cromatográficas con 0.08 a 0.11 M de NaCl mientras que con la muestra proveniente del residuo celular también se obtuvo un pico, pero a 0.13 M de NaCl.

Se tomó entonces una alícuota del pico que eluía a 0.13 M (proveniente del tratamiento sónico del residuo celular del proceso de congelamiento y descongelamiento)

y se la mezcló con la fracción soluble obtenida por congelamiento y descongelamiento. La mezcla se dializó y corrió en FPLC obteniéndose un pico que eluía a 0.085 M y un pequeño pico, con sólo el 10% de la actividad del pico mayor, que eluyó a 0.135 M.

A pesar de haber sembrado el doble de unidades enzimáticas del pico de 0.13 M, el grueso de la actividad enzimática eluyó en un único pico a 0.08 M.

Estos resultados descartarían la existencia de isoenzimas como causa de la aparición de dos picos en las cromatografías en FPLC. Este efecto podría deberse a la existencia de alguna forma de agregación de la enzima dependiente del medio.

La mencionada diferencia en los pesos moleculares podría deberse a que en el caso de la proteína aislada por Urbina hubiera habido en su manipuleo una proteólisis específica que condujo a una forma proteica de menor peso molecular pero que conserva sus propiedades catalíticas.

Dado que algunos autores habían informado de la existencia de una actividad proteolítica firmemente asociada a la PEPCK de levaduras (Beck et al, 1982) se consideró importante investigar la presencia de una actividad similar en las preparaciones enzimáticas altamente purificadas de T. cruzi.

Con ese fin se ensayó la actividad proteolítica de la preparación purificada sobre hemoglobina como sustrato

en las condiciones descritas en Materiales y Métodos y en presencia o ausencia de beta-mercaptoetanol 0.03 M. En ninguno de los casos pudo ponerse de manifiesto una actividad proteolítica significativa.

Otra posibilidad consistía en la acción de alguna otra proteasa presente en el T.cruzi. En ese sentido es interesante mencionar que recientemente se ha purificado y estudiado una cisteína proteinasa de T.cruzi a la que se ha denominado cruzipaina (Bontempi, 1990; Cazzulo, revisión, 1991) de localización lisosomal y que exhibe una potente actividad proteolítica dependiente de mercaptoetanol y que no es inhibible por PMSF. Debemos recalcar que Urbina obtiene el extracto crudo precisamente en presencia de mercaptoetanol y dicho inhibidor de proteasas, por lo que dicha proteasa se presentaba como una posibilidad muy atractiva de ser la responsable del fenómeno.

Con el fin de determinar si la PEPCK podía ser sustrato de la cruzipaina se llevaron a cabo experimentos en distintas condiciones en los cuales se incubó la PEPCK relativamente purificada (proveniente de la cromatografía en ATP-agarosa) con una preparación de cruzipaina purificada a homogeneidad por el Dr. J.J. Cazzulo.

Las muestras se sometieron luego a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y disociantes de acuerdo al método de Laemmli según se describe en Materiales y Métodos.

Los primeros experimentos se realizaron utilizando en

cada incubación 36 mUE de proteasa (0.4 ug de proteína) e incubando las mezclas a 50°C (la temperatura óptima para la actividad de la enzima era de 60°C) durante 3 horas como mínimo. Las electroforesis de las mezclas provenientes de dichas incubaciones mostraron sólo material que corría con el frente (posiblemente péptidos de bajo peso molecular) con la desaparición total de cualquier otra banda proteica. En experimentos posteriores se redujo el tiempo de incubación a una hora, la temperatura de incubación a 30°C y la cantidad de proteasa a la mitad. Sin embargo a los 60 minutos desaparecían completamente las bandas en los geles.

Finalmente pudo observarse una situación intermedia cuando se utilizó una preparación de proteasa de 1.8 mUE (0.02 ug de proteína) en condiciones de incubación similares a las últimas descritas.

En ese caso tampoco pudo detectarse la aparición de bandas de pesos moleculares menores a los originales (particularmente alguna de peso molecular alrededor de 40.000) sino sólo la disminución en la intensidad de las bandas originalmente presentes a los menores tiempos y la desaparición total de éstas con la presencia de material que corre con el frente en los otros casos (figura 46).

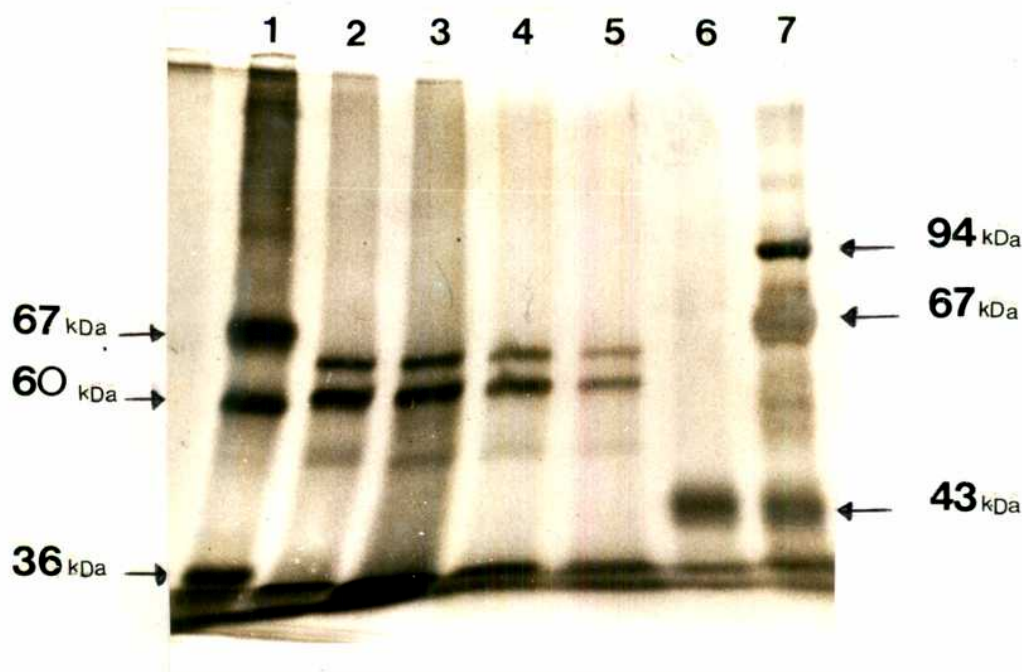


Figura 46: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio y en condiciones reductoras de muestras de PEPCK que fueron tratadas con la proteinasa "cruzipapaína". Cada mezcla de reacción contenía en un volumen final de 35 ul: 5 ug de PEPCK (previamente dializada en microdializador contra 25 ml de amortiguador Tris-Ac 10 mM pH 6 durante 15 horas), 1.35 umoles de beta-mercaptoetanol, 0.02 ug de proteinasa. Las muestras se incubaron a 30°C durante 0, 30, 60 y 120 minutos. Finalizada la incubación se agregó a cada mezcla de reacción 35 ul de buffer de muestra para la electroforesis y se calentó durante 3 minutos en baño de agua a ebullición. Las condiciones de la corrida electroforética y del revelado de las bandas se realizó como se describió en Materiales y Métodos.

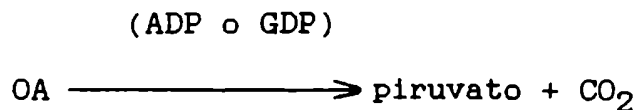
N° de carril

- 1 Tiroglobulina (330 kDa), Albúmina (67 kDa),
Catalasa (60 kDa), Lactato DH (36 kDa), y
Ferritina(18.5 kDa).
- 2 PEPCK
- 3 PEPCK incubada durante 30 minutos con la proteinasa
- 4 60
- 5 120
- 6 Ovoalbúmina (43 kDa)
- 7 Fosforilasa b (94 kDa), Albúmina (67 kDa),
Anhidrasa Carbónica (30 kDa), Inhibidor de tripsina
(20.1 kDa) y alfa-lactalbúmina (14.1 kDa).

En este experimento no se incluyó un carril con la proteinasa solamente, ya que en experimentos previos con una concentración 10 veces mayor de enzima no se pudieron detectar las bandas correspondientes.

8. Actividad oxaloacético decarboxilásica asociada a la PEPCK

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, las carboxiquinasas aisladas de levadura de panadería y de mitocondrias de hígado de pollo son capaces de catalizar la decarboxilación irreversible del oxaloacetato a piruvato en presencia de ADP o GDP respectivamente (Cannata y Stoppani, 1962; Noce y Utter, 1975) de acuerdo a la siguiente reacción:



Se consideró importante investigar la posibilidad de que dicha reacción también fuera catalizada por la PEPCK aislada de T. cruzi. En las determinaciones realizadas se utilizaron extractos obtenidos por precipitación fraccionada con sulfato de amonio de homogenatos de células enteras de epimastigotes de T. cruzi y la enzima altamente purificada de la misma fuente.

Para evitar las ambigüedades que involucraría en este caso la utilización del método espectrofotométrico de medida debido a las reacciones laterales parásitas muy difíciles de controlar, se utilizó el método manométrico de medida del CO₂ desprendido en la reacción.

Los resultados indicaron la presencia de una actividad

oxaloacético decarboxilásica tanto en los extractos crudos como en los altamente purificados (ver más adelante).

Según se muestra en la Tabla XXII la actividad decarboxilásica de la enzima altamente purificada fue un orden mayor que la correspondiente a la carboxiquinásica, lo que indicaría que la misma es una actividad intrínseca de la PEPCK.

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con las PEPCKs aisladas de levadura e hígado de pollo, en cuyos casos la reacción es dependiente de nucleósidos difosfato, la enzima aislada de T.cruzi sólo exhibió una escasa activación o inhibición dependiendo del nucleósido difosfato utilizado (Tabla XXIII).

En el caso de las enzimas de levadura e hígado de pollo la reacción es aparentemente independiente de la presencia de cationes divalentes y en el caso particular de la enzima de levadura éstos son inhibidores (Cannata y Stoppani, 1963).

Por dicha razón nos interesó investigar ese aspecto en la PEPCK del T.cruzi.

Los cationes divalentes ensayados exhiben una acción activadora o inhibidora sobre la actividad decarboxilásica según la concentración de los mismos y según se ensayen sobre la enzima pura o sobre extractos parcialmente purificados.

Cuando se trabajó con la enzima pura, concentraciones

Resultados

Tabla XXII: Comparación de actividades enzimáticas de una preparación enzimática altamente purificada.

ACTIVIDAD MEDIDA	u moles/min/mg
Oxaloacético Decarboxilásica	12.65
Carboxiquinásica	
Intercambio	1.07
Fijación de CO ₂	2.89

Las actividades enzimáticas se determinaron en mezclas de reacción estandar sin agregados según se describe en Materiales y Métodos. En todos los casos se utilizó una preparación proveniente del último paso del método de purificación (0.159 mg/ml de proteínas).

Tabla XXIII: Acción de los nucleosidos difosfato sobre la actividad oxaloacético decarboxilásica de una preparación enzimática parcialmente purificada.

NUCLEOSIDO DIFOSFATO (0.5 mM)	% ACTIVIDAD
	100
ADP	119
IDP	115
GDP	101
CDP	85
TDP	110

La determinación de la actividad OD se realizó en mezclas de reacción estandar según se describe en Materiales y Métodos con los agregados que se detallan en cada caso. Para estos experimentos se utilizó una preparación proveniente de la segunda etapa del método de purificación (fraccionamiento con sulfato de amonio) con una concentración proteica de 21.1 mg/ml.

bajas de Mg^{2+} y Zn^{2+} (30 μM) producían una pequeña activación, mientras que el Cu^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{2+} inhibieron en proporciones variables. Los dos últimos fueron ensayados sobre una preparación parcialmente purificada (Tabla XXIV).

El Cd^{2+} (30 μM) activó en un 88% (Tabla XXIV), sin embargo, la activación por Cd^{2+} y Mn^{2+} sólo se observó a concentraciones menores de 50 μM , produciéndose inhibición por encima de dichos valores (figura 47). En el caso de la actividad carboxiquinásica de fijación de CO_2 sobre PEP, el Cd^{2+} inhibió a todas las concentraciones ensayadas (figura 48).

Al estudiar este efecto sobre una preparación parcialmente purificada (figura 49) se observó una marcada estimulación de la actividad oxaloacético decarboxilásica (como se aprecia en dicha figura, una concentración de Cd^{2+} de 0.25 mM, capaz de inhibir totalmente la actividad oxaloacético decarboxilásica de la enzima pura [ver figura 47], fue capaz de estimular hasta cinco veces dicha actividad en la preparación parcialmente purificada).

Es posible atribuir las diferencias de comportamiento entre la enzima pura y la parcialmente purificada a múltiples factores entre los cuales podemos citar como los más probables: a) desensibilización de la enzima a los metales durante su purificación y b) existencia de otra proteína con actividad oxaloacético decarboxilásica. Esta última posibilidad se estudió en

Tabla XXIV: Efecto de los cationes divalente sobre la actividad OD de una preparación enzimática altamente purificada.

EXPERIMENTO	CATION DIVALENTE	% ACTIVIDAD
		100
1	Mg ²⁺ 30 μ M	113
	Cd ²⁺ 30 μ M	188
	Zn ²⁺ 30 μ M	130
	Cu ²⁺ 30 μ M	51
2	Ca ²⁺ 100 μ M	83
	Fe ²⁺ 100 μ M	0

La actividad enzimática se determinó en mezclas de reacción estandar con los agregados mencionados en cada caso.

En el experimento 1 se utilizó una preparación enzimática proveniente de la última etapa de la purificación (ATP-agarosa) con una concentración proteica de 0.159 mg/ml.

En el experimento 2 se utilizó una preparación enzimática proveniente de la segunda etapa de la purificación (precipitación fraccionada con sulfato de amonio) de un extracto obtenido por congelamiento y descongelamiento de las células según se describe en Materiales y Métodos. La concentración proteica de dicho extracto fue de 25.46 mg/ml.

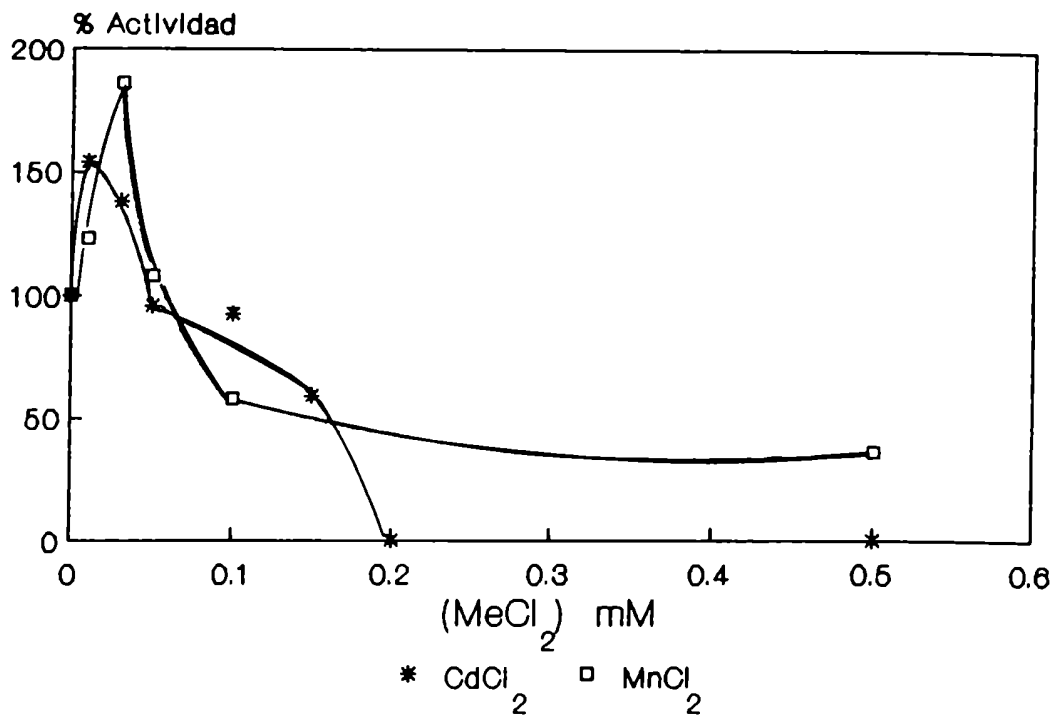


Figura 47: Efecto de Mn^{2+} y de Cd^{2+} sobre la actividad oxaloacético decarboxilásica.

Se representa en cada punto la actividad porcentual relativa a un control sin catión divalente.

Para estos experimentos se utilizó una preparación proveniente de la última etapa del método de purificación (cromatografía en columna de ATP-agarosa).

Resultados

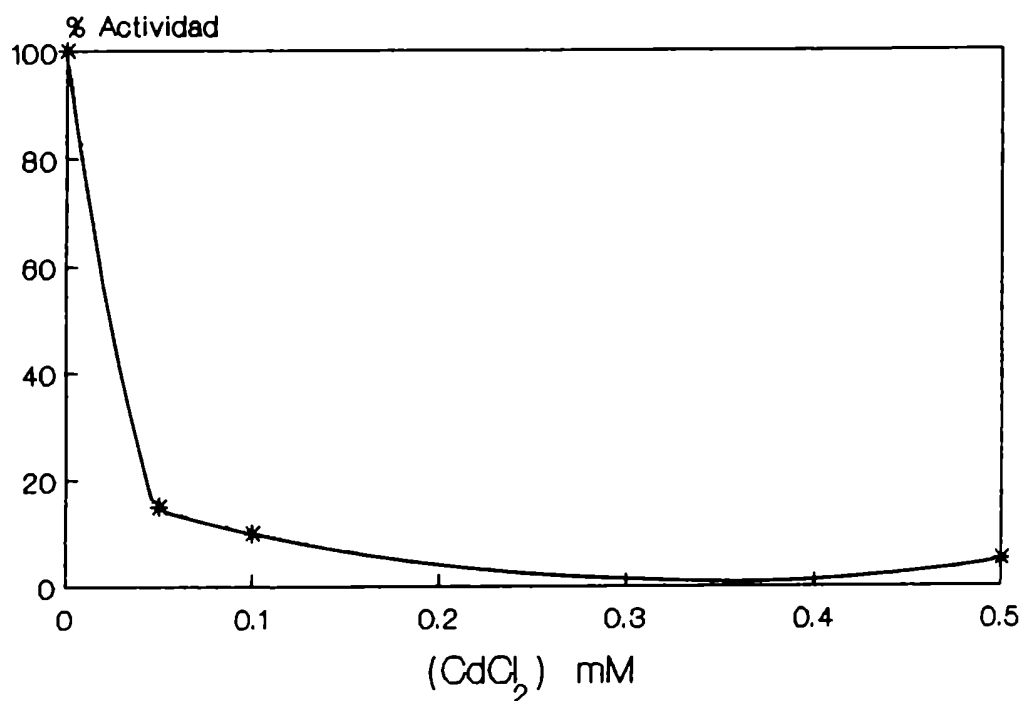


Figura 48: Efecto del Cd^{2+} sobre la actividad carboxiquinásica de fijación de CO_2 sobre PEP.

Se representa la actividad porcentual relativa a un control realizado en ausencia de metal.

Se utilizó una preparación enzimática proveniente de la última etapa del método de purificación (Cromatografía en ATP-agarosa) de una concentración proteica de 0.159 mg/ml. El extracto se diluyó al medio en amortiguador borato-bórico 50 mM EDTA 0.1 mM pH 7.5 incubándose a 0°C durante 3 horas. De la mezcla de reacción estandar con un volumen final de 1.2 ml se tomaron alícuotas de 200 μl a los 5, 10, 15, 20 y 25 minutos del agregado de la enzima y se agregaron sobre 50 μl de HClO_4 2 M procediéndose como se detalla en Materiales y Métodos para la determinación de actividad por el método radioquímico de fijación de $^{14}\text{CO}_2$ sobre PEP.

detalle y los resultados obtenidos se describirán mas adelante. Con el fin de descartar la posibilidad de que el CO_2 desprendido proviniera de la reacción de decarboxilación del oxaloacetato para dar fosfoenolpiruvato (es decir, la actividad carboxiquinásica propiamente dicha) se midió en el mismo experimento desprendimiento de CO_2 y formación de PEP. Los resultados obtenidos, incluidos en la Tabla XXV indicaron que en ninguna de las condiciones en que hubo una decarboxilación significativa se detectó la formación simultánea de PEP, posiblemente debido a que el pH al cual se mide la reacción de decarboxilación (5.8) es bastante inferior al pH óptimo de formación de PEP (7.76).

Resultados

Tabla XXV: Actividad carboxiquinásica de formación de PEP en las condiciones en que se determina la actividad OD.

AGREGADOS	% ACTIVIDAD OD	ACTIVIDAD CARBOXIQUINASICA DE FORMACION DE PEP (uoles/min/mg)
	100	
Mn ²⁺ 1 mM + ATP 1 mM	49	0
Mn ²⁺ 1 mM	0	
Cd ²⁺ 30 uM + Mn ²⁺ 1 mM + ATP 1 mM	75	0
Cd ²⁺ 30 uM + ATP 1 mM	103	0
Cd ²⁺ 30 uM + Mn ²⁺ 1 mM	0	
ATP 1 mM	91	0

Las incubaciones se realizaron en mezclas de reacción estandar (ver Materiales y Métodos) con los agregados detallados en cada caso. La preparación enzimática provenia del último paso de la purificación (ATP-agarosa). Su concentración proteica fue de 0.159 mg/ml. La reacción se inició con el agregado de la enzima desde el bulbo lateral del vaso de Warburg y luego de 30 minutos, durante los cuales se realizaron lecturas del CO₂ desprendido se frenó con 100 ul de TCA 15%. En esta mezcla de reacción se determinó el PEP formado según la técnica descrita en Materiales y Métodos.

9. Posible existencia de otra proteína con actividad oxaloacético decarboxilásica, no asociada a la PEPCK en el T. cruzi

Como se ha descripto anteriormente, cuando se estudió la actividad OD de una preparación de PEPCK parcialmente purificada se observó una estimulación por Cd^{2+} de dicha actividad que en algunos casos llegó a ser de hasta aproximadamente 6 veces presentando algunas características distintivas de las que exhibía la PEPCK altamente purificada.

Este efecto se acentuaba cuando los extractos eran obtenidos sometiendo a las células a ciclos de congelamiento y descongelamiento exclusivamente, tal como se indica en Materiales y Métodos.

Estos extractos poseían una muy baja actividad de PEPCK en contraposición a lo que ocurría con los extractos obtenidos por tratamiento sónico del residuo celular remanente del proceso de congelamiento y descongelamiento. En ese caso la actividad de PEPCK era alta comparada con la oxaloacético decarboxilásica.

En la tabla XXVI se muestran los resultados de las determinaciones de actividad de PEPCK y OD (en presencia y ausencia de Cd^{2+}) para el extracto obtenido por congelamiento y descongelamiento (A) y para el obtenido del tratamiento sónico del residuo celular del tratamiento anterior (B).

Tabla XXVI: Comparación de actividades carboxiquinásica y oxaloacético decarboxilásica de extractos enzimáticos obtenidos por diferentes métodos.

Extracto	Proteínas Totales	Actividad de PEPCK (Intercambio)			Actividad OD						OD (Cd ²⁺) ^{*2}	
					-Cd ²⁺		+Cd ²⁺ (0.01 mM)		% de act. (Cd ²⁺) ^{*1}	PEPCK		
	(mg)	μU/ml	μU Tot.	μU/mg	U/ml	U Tot.	U/mg	U/ml			U Tot.	U/mg
A	196.4	5.5	107(15%)	0.001	1.95	17.22	0.088	2.19	35.92(82%)	0.183	109	336
B	142.3	29.8	625(85%)	4.39	0.21	4.41	0.031	0.38	7.98(18%)	0.056	81	13
C	46.0	96.9	227(44%)	4.73	1.93	4.83	0.101	6.35	15.88(93%)	0.331	229	70
D	5.2	189.0	284(56%)	54.60	0.73	1.09	0.211	0.82	1.23(7%)	0.237	12	4

Las células se sometieron a un tratamiento de ruptura por congelamiento y descongelamiento según se describe en Materiales y Métodos. En el sobrenadante de dicho tratamiento (A) se determinó la concentración proteica, la actividad carboxiquinásica y la OD en presencia y ausencia de Cd²⁺ calculándose luego el porcentaje de activación por dicho metal y la relación entre las actividades OD (en presencia de Cd²⁺) y PEPCK.

Los sedimentos del tratamiento anterior fueron tratados con ultrasonido (ver Materiales y Métodos) y el sobrenadante de dicho tratamiento (B) se trató en forma similar a (A).

Los extractos C y D son los correspondientes a la precipitación fraccionada de A y B respectivamente.

Entre paréntesis se indica la distribución diferencial porcentual para las dos actividades enzimáticas determinadas entre las preparaciones obtenidas por los diferentes tratamientos, considerándose la actividad total como la suma de las actividades obtenidas con cada extracto.

El extracto A presentó el 82% de la actividad OD activable por Cd^{2+} pero sólo el 15% de la actividad carboxiquinásica de intercambio. En cambio en B se encontró el 85% de la actividad de PEPCK aunque sólo el 18% de la actividad OD activable por Cd^{2+} .

Estos resultados sugirieron la existencia de otra actividad OD, independiente de la intrínseca de la PEPCK.

Con el objeto de investigar esta posibilidad se sometió a un extracto obtenido en la forma usual y precipitado con sulfato de amonio (corte entre 45 y 70% de saturación) a una cromatografía en FPLC utilizando una columna de intercambio aniónico (Mono Q) equilibrada con el amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.6 y eluida con un gradiente continuo de 0 a 20% de NaCl 1 M. En cada fracción se determinó la actividad carboxiquinásica por el método radioquímico de intercambio y las actividades oxaloacético decarboxilásicas en presencia de Cd^{2+} por el método manométrico.

Como se puede apreciar en la figura 50 se pudo obtener en esa forma una resolución parcial de ambas actividades. Las actividades máximas de PEPCK y OD eluyeron con una concentración de NaCl de 0.08 M y 0.09 M respectivamente.

Un experimento similar se llevó a cabo utilizando un extracto obtenido por congelamiento y descongelamiento según se indicó más arriba seguido de una precipitación

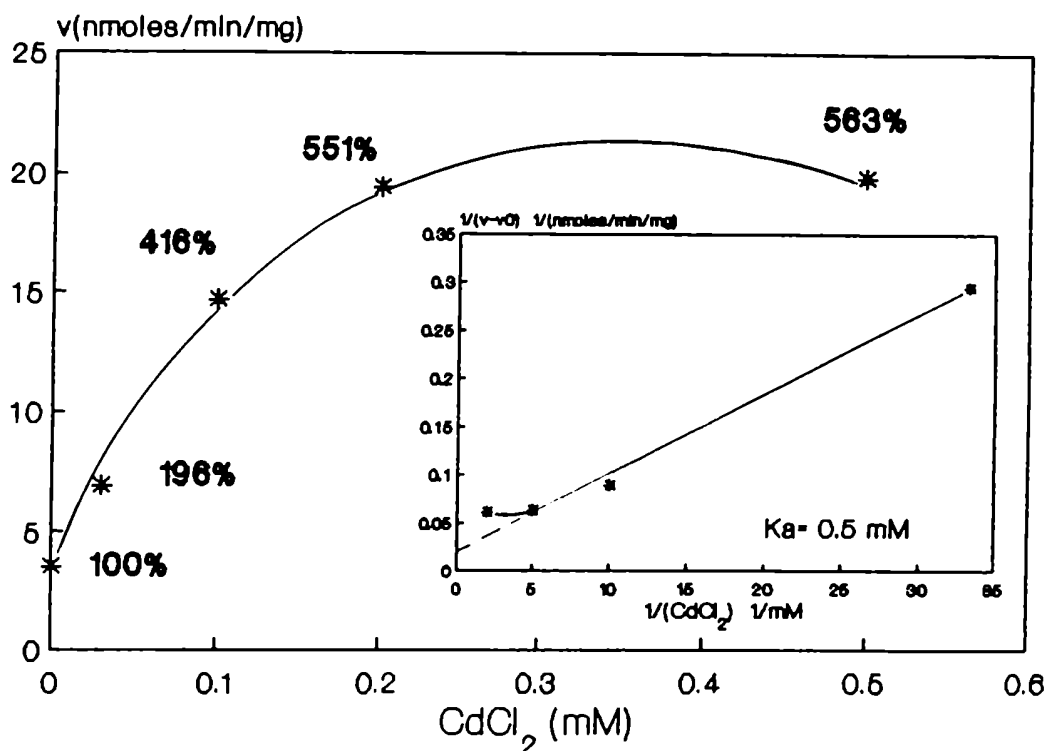


Figura 49: Efecto del Cd^{2+} sobre la actividad oxaloacético decarboxilásica.

Para este experimento se utilizó una preparación obtenida por congelamiento y descongelamiento de las células y la posterior precipitación fraccionada con sulfato de amonio según se describe en Materiales y Métodos. La concentración proteica fue de 25.5 mg/ml y se utilizaron 50 μ l de enzima en cada caso.

Para cada punto se indica la actividad porcentual relativa a un control sin metal.

Inserto: Gráfico de dobles recíprocos. Se representa en las ordenadas la inversa de la diferencia entre la velocidad en cada punto y la velocidad obtenida en ausencia de metal y en las abscisas la inversa de la concentración de Cd^{2+} . La constante de activación fue de 0.5 mM.

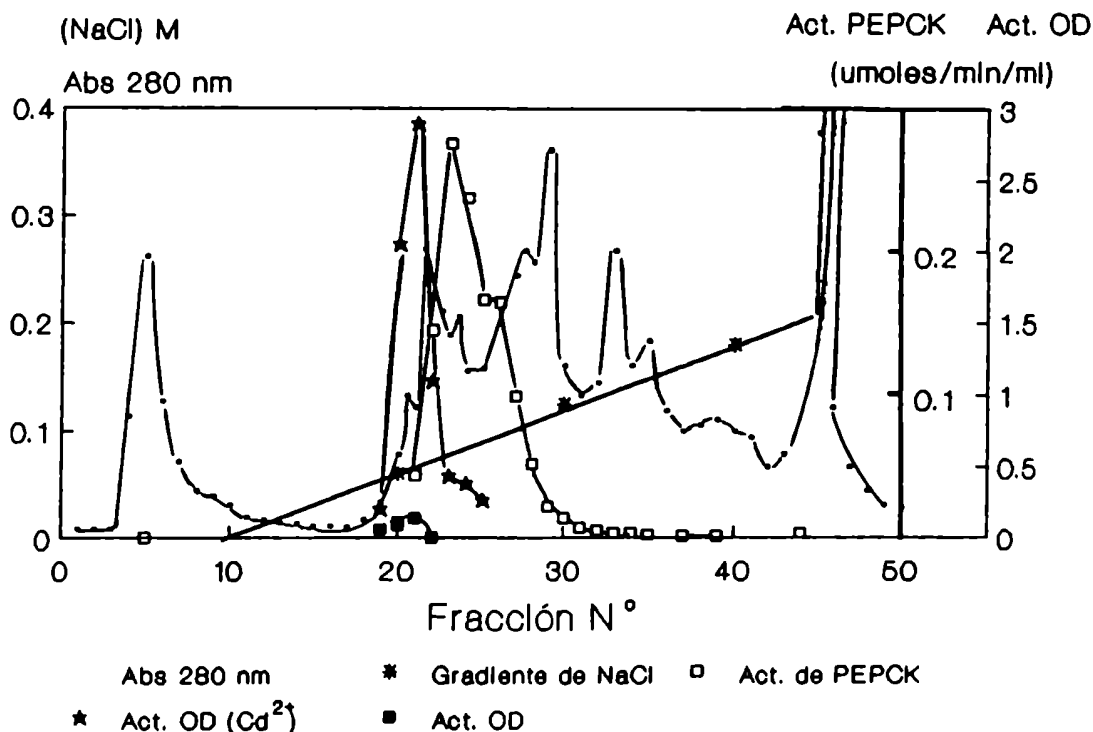


Figura 50: Experimento de FPLC de un extracto obtenido por tratamiento con ultrasonido de las células y posterior precipitación con sulfato de amonio según se describe en Materiales y Métodos. El extracto (19.3 mg de proteínas en 0.8 ml) se dializó durante aproximadamente 15 horas contra 500 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM EDTA 0.1 mM pH 7.6. La preparación dializada (1.2 ml) se centrifugó a 40000rpm durante 30 minutos. Las condiciones experimentales fueron como se describe en Materiales y Métodos (gradiente entre 0 y 20% de NaCl 1M). La actividad carboxiquinásica se determinó por el método radioquímico de intercambio.

fraccionada con sulfato de amonio.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 51. El extracto sembrado poseía una muy baja actividad de PEPCK pero una actividad OD estimulable por Cd^{2+} significativamente mayor que la obtenida en el experimento de la figura 50. Dicha actividad eluyó de la columna de Mono Q con una concentración de NaCl de 0.07 M. La actividad carboxiquinásica fue cuantitativamente despreciable.

Otra aproximación experimental a la dilucidación del problema de la posible existencia de dos actividades independientes fue la cromatografía de afinidad en columna de ATP-agarosa. Se empleó en este caso un extracto obtenido por congelamiento y descongelamiento el cual previa diálisis fue sembrado en una columna de las características indicadas en la leyenda de la figura 52 y eluida como allí se describe. Se determinó en todas las fracciones la absorbancia a 280 nm, la actividad de PEPCK por el método radioquímico de intercambio y las actividades oxaloacético decarboxilásicas en presencia y ausencia de Cd^{2+} 0.1 mM. Según se observa en la figura 52 la actividad OD en presencia de Cd^{2+} eluyó completamente en el primer pico proteico, mientras que la actividad en ausencia de Cd^{2+} también se encontró en el segundo. En cambio la mayor parte de la actividad carboxiquinásica eluyó en el segundo pico de proteínas. Se reunieron las fracciones correspondientes al pico a por un lado y al b por otro y se precipitaron por

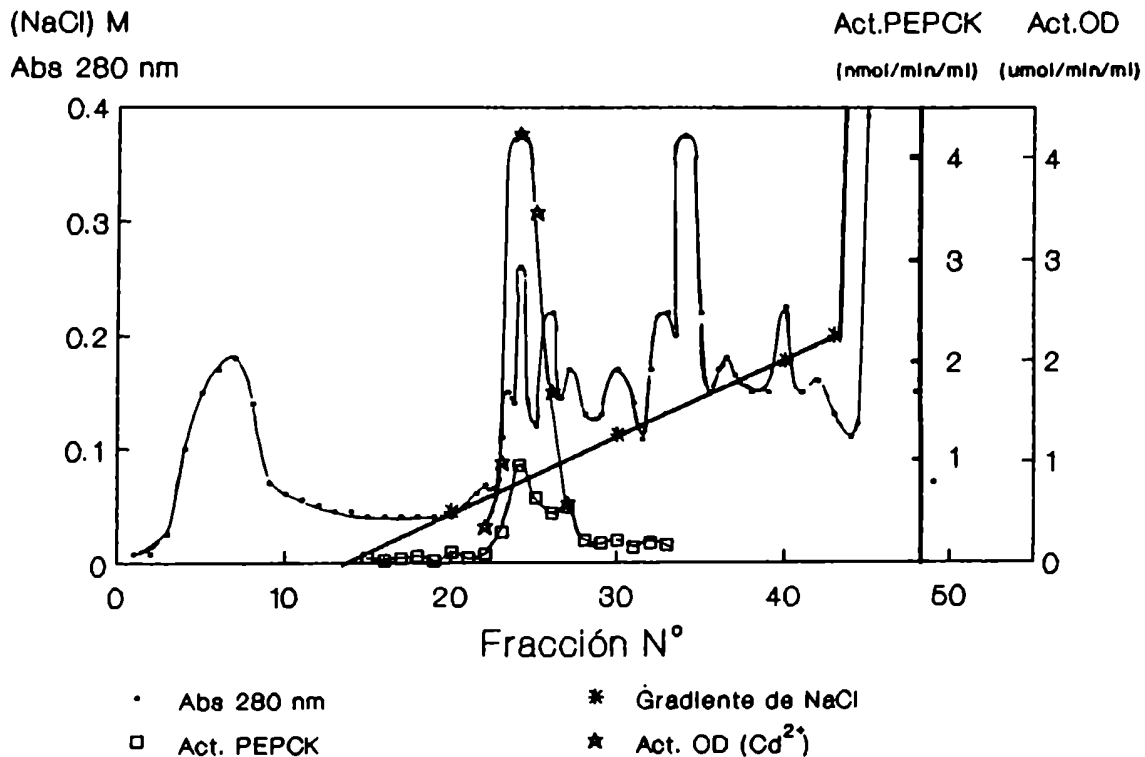


Figura 51: Experimento de FPLC de un extracto obtenido por tratamiento de las células por congelamiento y descongelamiento y posterior precipitación fraccionada con sulfato de amonio. El extracto (2 ml con 19.5 mg de proteínas) fue dializado contra 1 litro de amortiguador Tris-HCl 20 mM EDTA 0.1 mM pH 7.6 durante aproximadamente 15 horas y luego centrifugado a 40000 rpm durante 20 minutos. El volumen sembrado fue de 2.65 ml. Las condiciones de elución fueron iguales a las detalladas en la leyenda de la figura 50 y en Materiales y Métodos.

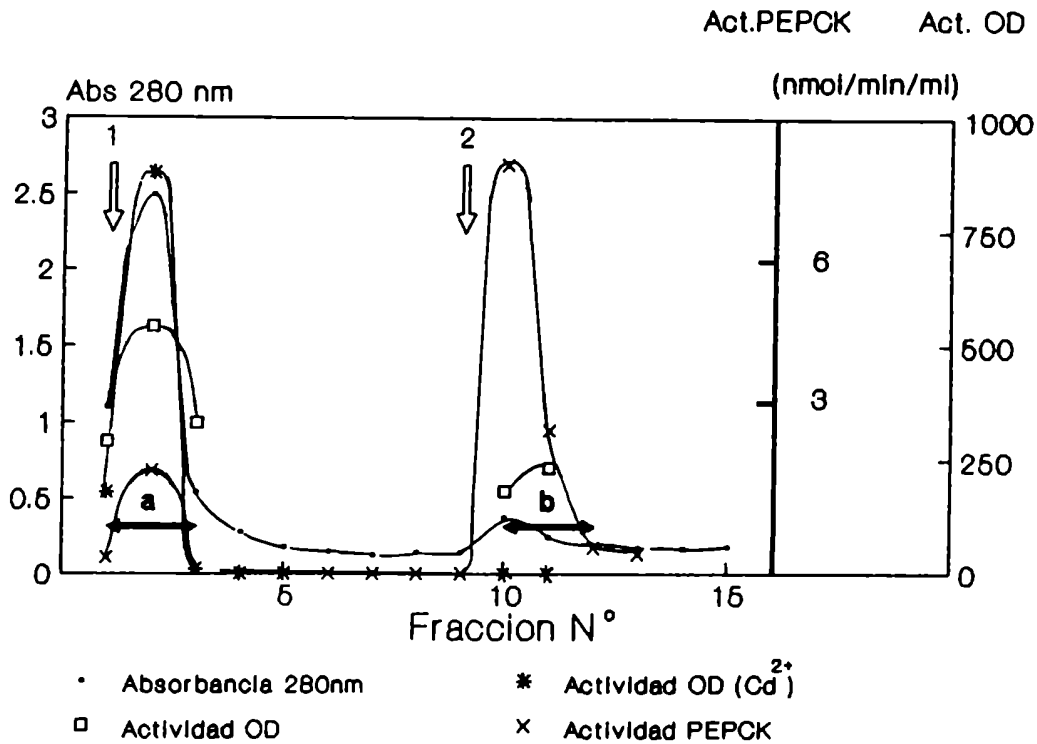


Figura 52: Cromatografía en ATP-agarosa de un extracto obtenido por tratamiento de las células por congelamiento y descongelamiento y posterior precipitación fraccionada con sulfato de amonio. La preparación (300 ul con 19.2 mg de proteínas) se dializó contra 25 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.6 EDTA 0.1 mM durante aproximadamente 3 horas en microdializador. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se describieron en la sección Método de Purificación (Resultados).

diálisis contra amortiguador borato-bórico 0.05 M pH 7.5 EDTA 0.1 mM saturado con sulfato de amonio durante 3 días. Posteriormente los extractos se centrifugaron a 30000rpm (rotor 65, ultracentrifuga Beckman) durante 30 minutos y los sedimentos se resuspendieron en amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5.

Se determinaron las actividades carboxiquinásica y oxaloacético decarboxilásica (Cd^{2+}) y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XXVII. La actividad OD (Cd^{2+}) eluyó completamente en el primer pico (a), pero éste también presenta el 18% de la actividad de PEPCCK. Si bien el extracto obtenido del primer pico de la columna de ATP-agarosa aún retiene la capacidad de activación por Cd^{2+} , ésta no llega a ser la del extracto original proveniente de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio, lo cuál podría atribuirse o a una desensibilización o a la pérdida de algún factor durante el proceso de purificación.

Con el objeto de caracterizar estas actividades OD se realizó una curva de actividad en función del pH en presencia y ausencia de Cd^{2+} con el extracto proveniente del tratamiento por congelamiento y descongelamiento precipitado con sulfato de amonio. La figura 53 muestra que en presencia de Cd^{2+} se obtuvieron dos máximos : a pH 5.4 y 6.65 con un mínimo a pH 6 mientras que en ausencia del metal la actividad máxima se obtuvo a pH 5.4.

Tabla XXVII: Actividad enzimática porcentual relativa a la actividad total recuperada del experimento de cromatografía en ATP-agarosa representado en figura 52.

Pico	% de actividad carboxiquinásica	% de actividad oxaloacético decarboxilásica (Cd^{2+})
	18	100
b	82	0

En la tabla se muestra el porcentaje en cada pico con respecto a la actividad enzimática total para cada tipo de actividad enzimática.

Para la determinación de actividad enzimática se juntaron las fracciones correspondientes a los picos a por una parte y b por la otra y se dializaron contra amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5 saturado en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durante tres días. Los extractos se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos y los sedimentos se resuspendieron en amortiguador borato-bórico 0.05 M EDTA 0.1 mM pH 7.5.

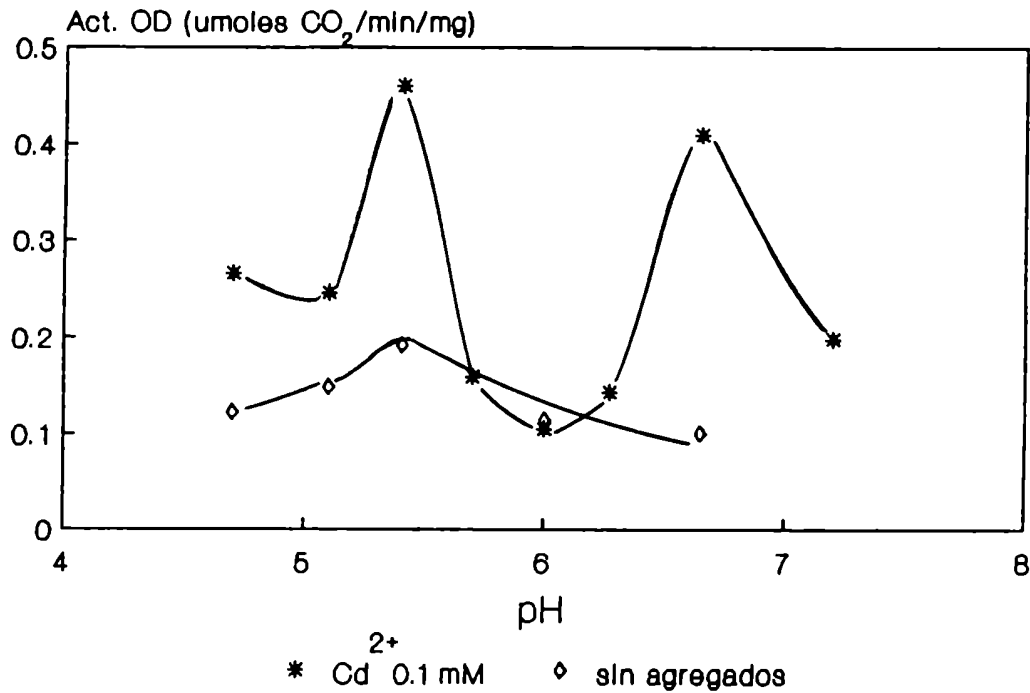


Figura 53: Efecto de la variación de pH sobre la actividad oxaloacético decarboxilásica de un extracto proveniente del tratamiento de las células por congelamiento y descongelamiento y posterior precipitación fraccionada con sulfato de amonio. La actividad enzimática se determinó como se describe en Materiales y Métodos en mezclas de reacción en presencia y ausencia de Cd²⁺ 0.1 mM variando el pH del amortiguador Tris-Acetato 0.05 M. Para cada determinación se utilizaron 20 ul del extracto (380 ug de proteínas).

Resultados

Los experimentos realizados han permitido la separación de dos actividades OD, una de ellas intrínseca de la PEPCK. La obtención de los extractos crudos por un tratamiento suave que consiste en ciclos de congelamiento y descongelamiento de las células, precipitación fraccionada con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad en ATP-agarosa constituyó un método de separación casi total de estas actividades.

DISCUSSION

El metabolismo glucídico del T.cruzi se caracteriza por la operatividad de la denominada "fermentación aeróbica", mecanismo por el cual el parásito cataboliza en forma incompleta los glúcidos y excreta al medio ácidos orgánicos como el ácido succínico entre otros.

La síntesis de ácidos orgánicos de cuatro carbonos, de acuerdo a lo discutido en la Introducción de esta Tesis sólo se explica por la existencia de una reacción de carboxilación sobre uno de los intermediarios de tres carbonos de la glucólisis: PEP o piruvato.

Se ha investigado la presencia de actividades carboxilantes en extractos crudos de epimastigotes de T.cruzi (Cataldi de Flombaum et al, 1977) encontrándose sólo las actividades de PEPCK y de enzima málica.

Diversas evidencias experimentales se oponen a la posibilidad de que sea la enzima málica la responsable de dicha reacción de carboxilación y señalan como la más probablemente involucrada en esa etapa a la PEPCK (ver Introducción).

Por esa razón, el aislamiento, purificación y estudio de las características de la PEPCK adquirió gran importancia para la dilucidación del mecanismo de la "fermentación aeróbica".

Tanto en el T.cruzi como en otros tripanosomátidos la enzima se localiza en una organela denominada glicosoma (Cannata et al, 1982) en la que también se encuentran las enzimas glicolíticas responsables de la degradación

de la glucosa hasta 3-fosfoglicerato (Taylor et al, 1980).

Esta localización subcelular de la enzima hizo necesario la utilización de un procedimiento de ruptura de los epimastigotes lo suficientemente fuerte, como lo es el tratamiento con ultrasonido para poder liberar a la PEPCCK en forma soluble. Cuando se utilizó para la ruptura de las células el tratamiento de congelamiento y descongelamiento sólo pudo liberarse en forma soluble el 15% de la actividad enzimática, solubilizándose el 85% restante por el tratamiento con ultrasonido del sedimento del tratamiento anterior (Tabla XXVI).

La enzima demostró poseer características altamente hidrofóbicas, lo que se evidenció cuando se intentó la purificación por cromatografía en columnas de fenil-Sepharosa o Sephacryl S-200 en cuyo caso, no pudo eluirse de las columnas en proporciones apreciables. En el caso de la cromatografía en Fenil-Sepharosa la columna se equilibró en amortiguador de fosfatos 0.01M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8M, EDTA 0.1mM pH 6.8 y la elución se realizó disminuyendo la fuerza iónica del eluyente por eliminación del sulfato de amonio con amortiguador de fosfatos 0.01M, EDTA 0.1mM, SCNK 10 mM y concentraciones de etilen glicol de hasta el 50%. Aún así apenas se recuperó un 10% de la actividad enzimática sembrada sin apreciable purificación de la misma (datos no mostrados).

El método de purificación involucró un primer

fraccionamiento con sulfato de amonio (corte entre 45 y 70% de saturación) y diversas etapas de purificación como filtración en geles, intercambio iónico, adsorción y afinidad hacia el ATP unido a una matriz inerte.

El método de purificación descrito ha permitido la obtención de la enzima al estado homogéneo según el criterio de pureza empleado (electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS) (figura 13). La purificación total hasta la etapa de cromatografía en columna de ATP-agarosa fue de aproximadamente 490 veces con un rendimiento del 7.2% (Tabla III). Este bajo rendimiento podría deberse a que a medida que avanza la purificación la enzima se hace muy lábil y pierde actividad con mucha facilidad. De acuerdo al rendimiento obtenido y a la actividad específica de la enzima pura pudo calcularse que la PEPCCK representa el 0.2% de la proteína celular soluble.

El análisis de los aminoácidos de la proteína purificada a homogeneidad indicó un alto contenido en medias cisteínas (3.5%) con respecto a lo obtenido con la enzima aislada de otras fuentes (0.6-2.3%) según se indica en la Tabla XXVIII. El contenido de prolina (2.7%), al igual que en el caso de la enzima de V. costicola es bastante inferior al de PEPCCKs de otros orígenes (Tabla XXVIII). Esto sería compatible con la existencia de una mayor proporción de estructuras secundarias en alfa hélice en éstas proteínas. El

Tabla XVIII: Composición de aminoácidos de la PEPCX del T.cruzi comparada con la de enzimas de otras fuentes.

Aminoácido	Composición (residuos por molécula)						
	T.cruzi	V.costicola (a)	Higado de cerdo (b)	Riñon de oveja (c)	Higado de rata (citosol) (d)	Higado de pollo (mitocondria)(e)	levadura (f)
Lisina	84	33	26	34	44	20	155
Arginina	58	21	48	38	28	52	95
Histidina	40	11	12	13	12	15	69
Tirosina	30	13	12	12	15	14	90
Triptofano	2	13	13	13	19	15	30
Metionina	22	4	15	13	13	9	41
Metionina	2	10	20	14	18	19	16
Acido aspártico	116	68	53	57	56	55	224
Acido glutámico	86	62	70	79	76	56	231
Treonina	88	33	31	38	23	27	147
Serina	84	63	31	39	34	40	142
Prolina	34	20	56	54	41	66	116
Glicina	106	103	64	63	58	63	155
Alanina	98	40	55	65	51	54	180
Valina	82	38	44	42	28	45	145
Leucina	90	36	58	52	55	60	181
Isoleucina	58	28	28	29	36	21	150
Fenilalanina	44	20	27	29	28	29	95
Glicina (%)	8.5	16.7	9.6	9.3	9.1	9.5	6.8
Prolina (%)	2.7	3.2	8.4	8.0	6.5	10.0	5.1
Medias Cisteínas (%)	3.5	0.6	2.3	1.9	2.0	1.4	1.8
Aminoácidos básicos(%)	14.5	10.5	13.0	12.6	13.2	13.2	14.1
Aminoácidos ácidos (%)	16.2	21.1	18.5	20.2	20.8	16.8	20.1
Aminoácidos hidrofóbicos (%)	33.1	33.3	45.4	42.7	43.5	46.8	40.3
Aminoácidos aromáticos (%)	6.2	7.5	7.8	8.0	9.8	8.8	9.5

(a) Salvarrey et al, 1989; (b) Chang y Lane, 1966; (c) Barnes y Keech, 1972; (d) Colombo et al, 1978; (e) Hebda y Nowak, 1982; (f) Cannata, 1970.

relativamente alto contenido de aminoácidos básicos y bajo de aminoácidos ácidos, en los límites respectivamente superior e inferior de los hallados para otras carboxiquinasas (Tabla XVIII) estaría de acuerdo con el punto isoeléctrico de 7.3 obtenido experimentalmente.

De los experimentos de cromatografía de filtración en gel, ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y de la composición en aminoácidos se calcularon los parámetros hidrodinámicos y moleculares de la PEPCK. Los resultados indican un coeficiente de sedimentación de $6.7 \cdot 10^{-13}$ seg, un radio de Stokes de 44.56 \AA , un coeficiente de difusión libre de $4.90 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$, un volumen parcial específico de $0.730 \text{ cm}^3/\text{g}$ y un peso molecular de la enzima nativa (determinado por el método de Andrews) de 116000 Da. Aplicando la fórmula de Svedberg, que permite estimar más exactamente el peso molecular de la enzima nativa utilizando el coeficiente de difusión libre, el coeficiente de sedimentación y el volumen parcial específico se obtuvo un valor de 123 kDa, aceptablemente coincidente con el obtenido por el Método de Andrews.

El peso molecular de la subunidad, determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS fué de aproximadamente 61000 Da indicando que la enzima probablemente es un dímero con subunidades de igual tamaño.

Los valores de peso molecular aquí obtenidos están en el

rango de lo informado para la PEPCK aislada de otras fuentes (ver Introducción).

Paralelamente a la realización de esta Tesis fué publicado un trabajo donde se describía un método de purificación para la PEPCK del T.cruzi similar al aquí descrito pero que sólo utiliza las primeras etapas del método desarrollado en esta Tesis: tratamiento con ultrasonido de los epimastigotes, centrifugación a 105000g, precipitación fraccionada con sulfato de amonio del sobrenadante de la ultracentrifugación (corte entre 40 y 60% de saturación), cromatografía en Sephacryl S-300 y en DEAE-celulosa (la enzima no es retenida en ésta columna) (Urbina, 1987). Sin embargo, en ese caso, con un rendimiento que es sólo ligeramente mayor al obtenido en esta tesis (9.3%) se logra una purificación considerablemente menor (91 veces).

Urbina ha determinado por cromatografía de filtración en geles un peso molecular para la enzima nativa de 82000 Da, mientras que el peso molecular determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS fué de 42000 Da. La discrepancia en los valores de peso molecular es mayor de lo que podría atribuirse a errores experimentales y por lo tanto fué de interés estudiar la posible causa de dicha diferencia.

Se investigó primero la existencia de alguna otra forma molecular con actividad de PEPCK. En efecto, se ha

informado en otros organismos de una doble localización subcelular de la actividad de PEPCK lo que podría inducir a sospechar la existencia de más de una forma molecular de la enzima (ver Introducción). Sin embargo, los estudios realizados en el T.cruzi habían indicado en éste parásito una única localización subcelular: la glicosomal (Cannata et al, 1982). Con el fin de descartar la posibilidad de que la mencionada discrepancia fuera debida a la existencia de distintas formas moleculares se realizaron los experimentos de cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC), utilizando una columna de intercambio aniónico (Mono Q). Los resultados indicaron, al menos en las condiciones de ensayo utilizadas, que no existen isoenzimas de la PEPCK en el T.cruzi, aunque existiría algún mecanismo de agregación y desagregación dependiente del medio que da origen a una forma molecular que eluye de las columnas de Mono Q con una concentración salina ligeramente diferente (Figura 45).

Otra explicación a la discrepancia mencionada podría radicar en una proteólisis parcial de la enzima durante la purificación, que no afectaría la actividad enzimática.

En extractos parcialmente purificados de Saccharomyces cerevisiae se ha encontrado una actividad proteolítica asociada a la PEPCK que alcanza su máxima actividad en presencia de beta-mercaptoetanol y SDS (Beck et al, 1982).

Por otro lado, recientemente Bontempi (1990) ha estudiado una actividad proteolítica en el T.cruzi, denominada cruzipaina de ubicación lisosomal y que es la actividad proteolítica cuantitativamente más importante en el T.cruzi.

Es de destacar que Urbina incluye durante la purificación el uso de beta-mercaptoetanol y los inhibidores de proteasas PMSF e inhibidor de tripsina y Bontempi (1990) ha demostrado que al menos en el caso de la cruzipaina los inhibidores utilizados no tienen efecto alguno y la proteinasa se activa significativamente en presencia de beta-mercaptoetanol. La ausencia de actividad proteolítica sobre un sustrato proteico como hemoglobina, de las preparaciones enzimáticas altamente purificadas, como se describió en la sección 7. , descartaría la autodegradación de las mismas . Sin embargo, la PEPCK es un buen sustrato de la cruzipaina, observándose desaparición total de las bandas correspondientes a la enzima en condiciones de incubación relativamente suaves.

En las condiciones de ensayo utilizadas y con la enzima altamente purificada no se puede afirmar que sea la cruzipaina la responsable de la aparición de formas enzimáticas de menor tamaño, dado que no se pudo detectar la aparición de bandas de tamaño intermedio en las electroforesis en geles de poliacrilamida de los extractos provenientes de la incubación con la

proteínasa (particularmente en la zona de 40 kDa).

Sin embargo, estas condiciones son bastante diferentes a las que se presentan en la célula cuando se produce la ruptura de las membranas de las organelas por efecto de los diversos tratamientos utilizados para solubilizar la actividad carboxiquinásica.

La PEPCCK del T.cruzi exhibió un comportamiento histerético que se puso de manifiesto al medir su actividad por el método continuo espectrofotométrico. En esas condiciones se observó que la actividad se incrementaba notablemente durante la incubación hasta alcanzar un valor máximo. Este comportamiento era parcialmente suprimido si la enzima se diluía e incubaba en un amortiguador apropiado previamente a la medida, en cuyo caso la actividad inicial era muy cercana a la máxima obtenida con la enzima sin dilución previa.

Además, cuando los extractos se dializaban previamente no se observaba una activación significativa durante la medición de actividad, pero el carácter histerético se recuperaba al incluir sales en la mezcla de reacción. En ese sentido fueron más efectivos el $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, SO_4Na_2 y menos el AcNH_4 .

El fenómeno mencionado podría atribuirse a varios factores entre los cuales los más inmediatos podrían ser: a) efecto de alguno de los componentes de la mezcla de reacción utilizada sobre la enzima que induciría cambios conformacionales en la misma transformándola en una forma cinéticamente más activa y b) fenómenos de

disociación o agregación producidos por la dilución de la enzima ya sea en la mezcla de reacción en el momento de la medida o por dilución previa a la misma, o una combinación de ambos efectos. En tal sentido merece ser mencionado el hecho de que la PEPCK de V. costicola (Salvarrey y col, 1989) presentó un comportamiento parecido pues la enzima se activa por dilución en un amortiguador apropiado. Los autores atribuyen esta activación a la disociación de complejos inactivos presentes en la solución enzimática concentrada a formas monoméricas activas. Tal hipótesis se basa en la presencia de dos formas moleculares diferentes en las electroforesis en condiciones no disociantes de las cuales solo una presenta actividad enzimática. La carbamoilación de la preparación enzimática previene el proceso de asociación dando lugar solo a la forma de mayor movilidad electroforética sin efecto en la actividad enzimática (Salvarrey et al, 1989).

Los experimentos con NAD^+ y NADH parecen descartar la posibilidad de que el efecto de histéresis mencionado se deba a que éstos nucleótidos, presentes en el sistema acoplado utilizado en la determinación de actividad, actúen activando o inhibiendo a la PEPCK según se trate de la coenzima oxidada o reducida respectivamente.

Diversos autores han demostrado que el ácido quinolínico, catabolito del triptofano y potencial precursor del NAD era un inhibidor tanto "in vivo" como

"in vitro" de PEPCKs de diversas especies. Nuestros estudios confirmaron la acción inhibitoria de este metabolito sobre la enzima altamente purificada del T.cruzi.

Lloyd y Barret (1983) explican el efecto del ácido quinolínico asignándole una doble función: primero como quelante de metales divalentes, pues es sabido que los ácidos heterocíclicos con un grupo carboxilo en α forman con los metales de transición fuertes complejos (Bailar, 1956) y en segundo lugar como inhibidor de tipo no competitivo. Es de destacar que no se trata en este caso de un inhibidor específico pues es sabido que el ácido quinolínico puede afectar otros sistemas enzimáticos como por ejemplo el de la glutamato deshidrogenasa (Klahr y Schoolwerth, 1972).

Experimentos de RMN- ^{13}C realizados incubando células con (^{13}C)-glucosa en presencia de ácido quinolínico no mostraron diferencias significativas en los metabolitos formados en comparación con controles incubados en ausencia del inhibidor.

El ácido quinolínico es conocido como un inhibidor de enzimas citosólicas "in vivo" por su incapacidad de ingresar a la mitocondria. Esto podría explicar la inexistencia de efectos en los experimentos "in vivo" con epimastigotes de T.cruzi, donde la PEPCK tiene localización glicosomal.

El uso de 3-mercaptopicolinato, un metabolito con mayor distribución intracelular ha permitido a Urbina (1989)

detectar en su presencia en experimentos "in vivo" una disminución en la excreción de succinato y un aumento en la síntesis de L-alanina que podrían explicarse por la inhibición a nivel de la PEPCK.

Al igual que las PEPCKs aisladas de otras fuentes, la enzima purificada del T. cruzi muestra un requerimiento absoluto por un catión divalente para su actividad de intercambio (Tabla XV), concordando con lo que ocurría con la actividad carboxiquinásica de extractos crudos (Cannata et al, 1982).

Cuando sólo se utilizó un catión, el Mn^{2+} resultó ser el más efectivo siguiéndole en importancia el Cd^{2+} y el Mg^{2+} en ese orden. Estos resultados son similares a los informados para otros sistemas (Introducción) y también a los obtenidos en los extractos crudos (Cannata et al, 1982).

En los tres casos las cinéticas fueron de tipo hiperbólico presentándose inhibición cuando la relación catión-nucleótido excedió el valor de 1.8 para el Mn^{2+} y de 0.5 para el Cd^{2+} . El valor de K_m aparente fué mayor para el Cd^{2+} (26 μM) y para el Mn^{2+} y el Mg^{2+} fué de 1.28 mM y 18.6 mM respectivamente.

En este sistema también se puso de manifiesto la existencia del efecto sinérgico de dos cationes que actúan simultáneamente tal como se describió para las enzimas aisladas de levadura de panadería (Cannata y Flombaum, 1974) y de Vibrio costicola (Salvarrey, 1986)

entre otras.

Los experimentos correspondientes a la figura 21 indicarían que cuando el Mn^{2+} es el catión que forma con el nucleótido el complejo Mn-nucleótido, sustrato de la reacción, su acción es potenciada por el Mg^{2+} o el Cd^{2+} siendo en ese sentido este último mucho más eficiente (pues se obtiene una activación similar de la enzima con una concentración de metal 100 veces menor). En efecto, la afinidad de la enzima por el Mn^{2+} aumentó considerablemente en presencia de Mg^{2+} o de Cd^{2+} de acuerdo a la variación en los K_m correspondientes (en ambos casos los gráficos de dobles recíprocos fueron bifásicos, si la concentración de $MnCl_2$ era menor de 0.1 mM el K_m en presencia de $MgCl_2$ 1 mM era de 74 μM , si era mayor el K_m era de 41 μM y en presencia de $CdCl_2$ 0.01 mM los valores fueron de 119 μM y de 30 μM respectivamente).

También se observó en ambos casos inhibición a concentraciones de Mn^{2+} superiores a 0.6 mM (figura 22). En la reacción de fijación de CO_2 también se observó el efecto sinérgico en presencia de Mg^{2+} 0.5 mM, pero en este caso se alteró la V_{max} sin modificarse el K_m para el Mn^{2+} .

Estos hechos están de acuerdo con la hipótesis ya enunciada de que los cationes divalentes podrían cumplir dos funciones: como sustrato de la enzima, formando parte del complejo con el nucleótido y como efectores alostéricos.

Como ya se ha dicho, existe una activación muy importante de la enzima por dilución, lo que podría explicarse si se supone, como ya se ha mencionado anteriormente, que se produce algún cambio conformacional o efecto de asociación-disociación dependiente de la concentración proteica que conduce a la formación de una especie más activa, siendo este fenómeno dependiente del tiempo.

El comportamiento sigmoideo de la enzima sin dilución previa en las curvas de actividad en función de la concentración de catión divalente podría explicarse en base a la hipótesis de que el Mn^{2+} o el complejo ATP-Mn presentes en la mezcla de reacción potencian de alguna forma el proceso de activación por dilución de la enzima.

La reacción catalizada por la PEPCK es ampliamente reversible. Sin embargo se acepta que en vertebrados ésta procede en la dirección de decarboxilación del oxaloacetato con formación de fosfoenolpiruvato con fines gluconeogénicos. Esto está de acuerdo con el bajo K_m obtenido para oxaloacetato (19 μM , para la enzima de hígado de pollo) (Lee et al, 1981) y al relativamente alto K_m para CO_2 medido como bicarbonato (20 mM, para la enzima de hígado de pollo) (Hebda y Nowak, 1982a; Utter y Kolenbrander, 1972).

En el caso de la enzima aislada del T. cruzi los parámetros cinéticos medidos son muy diferentes de

aquellos. Así el K_m para el HCO_3^- fué de 2.6 mM, aún menor que el obtenido para la enzima aislada de Ascaris suum (6.7 mM con IDP o 7.1 mM con GDP) (Pietrzak Rohrer et al, 1986). El K_m para PEP fué de 35 μM , considerablemente menor a los obtenidos con la enzima de hígado de mono, de cerdo o de cobayo que varían entre 120 μM y 150 μM (Hammond y Balinsky, 1978; Chang y Lane, 1966 y Holten y Nordlie, 1965) y ligeramente inferior al K_m para oxaloacetato (49 μM).

Estos hechos podrían explicar porqué a pesar de que la reacción es libremente reversible, la enzima de T.cruzi parece funcionar fisiológicamente en la dirección de síntesis de oxaloacetato, es decir, como enzima fijadora de CO_2 .

Un dato digno de mencionarse es la marcada discrepancia que se observa entre los valores de K_m para PEP informados por Urbina (1987) y los determinados en esta tesis, que supera lo atribuible a un posible error experimental (360 μM y 35 μM respectivamente).

Los pHs óptimos para las reacciones catalizadas por la PEPCK de T.cruzi fueron, para la carboxilación (6.55) y la formación de PEP (7.76) similares a los descritos por Urbina (6.9 y 8 respectivamente) y también a los determinados para la enzima aislada de levadura de panadería (6.5 y 8.3 respectivamente; Cannata y Flombaum, 1974).

El pH óptimo para la reacción de carboxilación determinado en extractos crudos fué ligeramente inferior

(6.2) al determinado con la enzima altamente purificada (Cataldi de Flombaum et al, 1977).

La actividad de la enzima fué mayor, tanto al pH óptimo como a un pH de 7, en la dirección de síntesis de PEP. Un comportamiento similar fué descripto para la enzima aislada de eucariotas superiores, por ejemplo la enzima de hígado de pollo (Sato et al, 1986).

En la reacción de carboxilación el requerimiento por el nucleótido de adenina es absoluto, en forma similar a lo que ocurre con la enzima de levadura de panadería (Cannata y Stoppani, 1963b). En las otras reacciones la enzima muestra actividad, aunque en menor grado, con otros nucleótidos, especialmente los púricos. Esta diferencia en el comportamiento de la enzima en las diferentes reacciones también se ha observado con la PEPCK aislada de Bacillus stearothermophilus (Cannata y Flombaum, resultados no publicados).

La enzima aislada del T.cruzi muestra entonces una especificidad parcial por los nucleótidos de adenina y por lo tanto es una excepción a los casos generales.

Como ocurrió con PEPCKs de otras fuentes, la enzima de T.cruzi demostró contener grupos tioles necesarios para su actividad a juzgar por la alta sensibilidad que exhibió ante los inhibidores específicos. Urbina (1987) ha obtenido inhibición de la actividad enzimática por los reactivos PCMB, CMS y DTNB a una concentración 1 mM (95, 95 y 90% de inhibición en incubaciones de tres minutos y 100, 100 y 90% de inhibición en incubaciones

de 5 minutos). Los resultados presentados en esta tesis indican una sensibilidad igual o mayor de la enzima a los mercuriales orgánicos pues en incubaciones de 6 minutos con PCMB o CMS la inhibición es total con una concentración 1 μM de los reactivos indicados.

Como ya se ha dicho la enzima presenta un alto porcentaje de medias cisteínas en relación a enzimas aisladas de otras fuentes (Tabla XXVIII). Si consideramos que tan solo una muy pequeña proporción de los mismos pueden estar involucrados directamente con la función catalítica en el centro activo, la mayor parte de ellos estarían ya sea formando puentes disulfuro o bien como grupos sulfhidrilos libres, en cuyo último caso podrían actuar como protectores intrínsecos ante la acción de los reactivos de tioles ensayados. Es decir que la sensibilidad de la enzima ante estos últimos sería todavía mayor de la experimentalmente detectada, ya de por sí muy elevada.

El hecho de que la presencia de protectores de grupos sulfhidrilos durante la determinación de la actividad enzimática no afecta mayormente a la misma parecería indicar que dichos grupos se encuentran reducidos y en condiciones óptimas de acción, al menos cuando se trata de preparaciones no demasiado purificadas (Tabla XVII). Sin embargo, cuando la enzima se diluye en amortiguador Tris-Ac 0.1 M pH 6.7 preincubándose a 0°C durante 30 minutos la presencia de protectores durante la

preincubación o la incubación produce una activación de aproximadamente el 70% dependiendo del reactivo utilizado. Es interesante destacar que cuando la enzima se preincuba sin agregados y se agrega DTT a la mezcla de incubación no se produce una modificación significativa de la actividad enzimática con respecto al control, a diferencia de lo que ocurre con el GSH. En cambio, ambos reactivos producen activación de la enzima cuando se agregan durante la preincubación (Tabla XVIII). Podría ocurrir que la ausencia de los sustratos de la reacción favoreciera de alguna manera la interacción de la enzima con el DTT. Por otro lado, éstos experimentos fueron realizados con preparaciones de un grado relativamente bajo de purificación y podría ser que en ellas existieran factores que protegen a la enzima de la oxidación durante la incubación, pero que son insuficientes cuando la enzima se diluye y preincuba a 0°C durante 30 minutos.

Los resultados de estos experimentos parecen confirmar la existencia de grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad de PEPCK. Sin embargo, sería necesario la continuación de estos estudios para determinar si estos grupos participan del mecanismo de la reacción, son grupos cercanos al centro activo de la enzima o es meramente un cambio conformacional el producido por la interacción de los inhibidores específicos con grupos lejanos al centro activo lo que lleva a la pérdida de la actividad enzimática.

La PEPCK purificada del T. cruzi al igual que la enzima aislada de levadura de panadería (Cannata y Stoppani, 1963c) e hígado de pollo (Noce y Utter, 1975) presenta una actividad oxaloacético decarboxilásica intrínseca que tiene como producto al piruvato. En las condiciones de ensayo utilizadas para la determinación del CO₂ liberado, no se forman cantidades detectables de PEP (Tabla XXV).

En el T. cruzi la actividad OD de la enzima purificada a homogeneidad es al menos un orden de magnitud mayor que la correspondiente carboxiquinásica a diferencia de lo que ocurre con las enzimas de levadura de panadería e hígado de pollo (Noce y Utter, 1975 y Cannata y Stoppani, 1963) donde la actividad OD es menor a la PEPCK. A diferencia de lo que ocurre con la enzima aislada de levadura de panadería e hígado de pollo la actividad OD asociada a la PEPCK purificada no es susceptible de activación por nucleósidos mono y difosfato (Tabla XXIII). En el caso de la enzima de levadura de panadería la enzima se activa en presencia de ATP, ADP y AMP en un 46, 62 y 4 % respectivamente.

El efecto de los cationes divalentes sobre la actividad OD fué semejante al observado en el caso de la enzima aislada de hígado de pollo donde concentraciones de Mn²⁺ de 40 uM producían una pequeña activación de la enzima, mientras que concentraciones mayores tenían efecto inhibitorio.

En el T. cruzi tanto el Cd²⁺ como el Mn²⁺ produjeron una

activación del 50 % a 10 μM en el primer caso y del 80 % a 30 μM en el segundo, pero concentraciones mayores de 50 μM inhibieron la actividad OD (Figura 47).

Un comportamiento diferente se observó cuando la preparación enzimática utilizada provenía de las primeras etapas de la purificación. En ese caso se producía un notable incremento de la actividad OD en presencia de Cd^{2+} , calculándose en ese caso una constante aparente de activación de 0.5 mM (Figura 49).

Dado que este efecto se acentuaba cuando se utilizaban preparaciones provenientes de un tratamiento suave de las células (como el de congelamiento y descongelamiento) que, por otra parte, presentaban muy baja actividad de PEPCK (Tabla XXVI), se postuló la posible existencia de una actividad OD no asociada a la PEPCK. La cromatografía en FPLC de un extracto proveniente de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio del sobrenadante del tratamiento por ultrasonido de células enteras permitió una separación parcial de las actividades OD activable por Cd^{2+} y PEPCK (Figura 50). Sin embargo, con el extracto proveniente del tratamiento por congelamiento y descongelamiento se obtuvo un único pico con casi exclusivamente actividad OD activable por Cd^{2+} (Figura 51).

La purificación por cromatografía de afinidad en ATP-agarosa arrojó similares resultados, pues aunque la actividad OD (activable por Cd^{2+}) eluyó en un primer

pico, el grueso de la actividad carboxiquinásica (desprovista de actividad OD activable por Cd^{2+}) lo hizo en el segundo (Figura 52). Es de hacer notar que en el caso del experimento descrito una pequeña proporción de la actividad de PEPCCK (18%) eluyó con el primer pico, posiblemente por haber sembrado un exceso de material, ya que ese comportamiento nunca había sido observado con otras preparaciones (Tabla XXVII).

La curva de actividad OD en función del pH indica un comportamiento diferente para la enzima en presencia y ausencia de Cd^{2+} encontrándose en el primer caso una curva con dos máximos de actividad (pH 5.4 y 6.7) y en el segundo una actividad máxima a pH 5.4.

Hasta el momento son muy raras las actividades OD descritas en la literatura respectiva. Una actividad OD de mitocondrias de hígado de rata ha sido estudiada por Corwin (1959) con un pH óptimo de 7.5 que mostró activación con Mg^{2+} antagonizada por Mn^{2+} .

Bartley y Dean (1973) demostraron la existencia de dos actividades OD en hígado de rata con diferentes pHs óptimos y requerimientos de metal. La enzima citosólica posee un pH óptimo de 5 y requiere Mn^{2+} o Mg^{2+} para alcanzar su máxima actividad mientras que la mitocondrial tiene un pH óptimo alcalino sin requerimientos de metal.

La OD de plantas y microorganismos normalmente exhibe un pH óptimo de entre 5 y 6 y un requerimiento de metal divalente, siendo el Mn^{2+} el más efectivo (Utter, 1961).

Una actividad enzimática similar se aisló de músculo de bacalao (Kosicki, 1968).

Los resultados presentados en esta tesis parecen confirmar la presencia de dos actividades OD en el T. cruzi, una de las cuales es intrínseca de la PEPCCK. Es posible que la localización subcelular de ambas actividades sea diferente, a juzgar por la liberación diferencial de las mismas según el método de ruptura celular empleado. Estas actividades también se diferenciarían por su afinidad por la ATP-agarosa y por su comportamiento en presencia de Cd^{2+} . Sería necesario continuar estos estudios con el fin de caracterizar completamente estas actividades.

El significado fisiológico de la actividad OD podría encontrarse en el aprovechamiento de los aminoácidos como reserva energética. Es decir, mientras la célula crece en un medio con glucosa utiliza ese nutriente exclusivamente, pero en ausencia del mismo comienza a utilizar los esqueletos carbonados de los aminoácidos como fuente de energía. Como es sabido, sólo se degradan en el ciclo de Krebs aquellos compuestos que pueden convertirse en piruvato y finalmente en Acetil-CoA.

Los aminoácidos, como el aspartato y otros que pueden transformarse por transaminación o desaminación oxidativa en algún intermediario del ciclo de Krebs dan lugar a la formación de oxaloacetato y como éste es sustrato de la OD dan lugar a la formación de piruvato,

que puede utilizarse como combustible.

Existirían entonces dos formas de conversión del oxaloacetato a piruvato en el T. cruzi: a) la directa, catalizada por la actividad OD, asociada a la PEPCK o independiente de aquella y b) la indirecta, por la conversión del fosfoenolpiruvato, formado en la decarboxilación del oxaloacetato por la PEPCK, en piruvato por la enzima piruvato quinasa.

La caracterización de la PEPCK de T. cruzi indica que la enzima presenta propiedades similares en general a sus homólogos de otras fuentes, excepto algunas que sugieren que estaría particularmente adaptada para actuar fisiológicamente en el sentido de la carboxilación del PEP requerido para la "fermentación aeróbica" de la glucosa. Es también posible que las actividades asociadas de oxaloacético decarboxilasas con o sin producción de PEP sean valiosas para la célula en condiciones en que el crecimiento se hace principal o únicamente a expensas de aminoácidos.

RESUMEN

1) Se purificó a homogeneidad la PEPCK del T. cruzi utilizando el siguiente procedimiento:

- a) ruptura de las células por tratamiento con ultrasonido.
- b) precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- c) cromatografía en columna de Sephadex G-200.
- d) DEAE-celulosa.
- e) Hidroxilapatita.
- f) ATP-agarosa.

El criterio de pureza utilizado fue la presencia de una única banda en las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes.

La purificación lograda fué de 488 veces con un rendimiento del 7.2 %.

2) El análisis de la composición de aminoácidos indicó una alta proporción de medias cisteínas y una relativamente baja de prolina en comparación con los valores obtenidos con enzimas de otros orígenes. El volumen parcial específico, calculado a partir de la composición de aminoácidos fue de $0.730 \text{ cm}^3/\text{g}$.

3) Se calcularon los parámetros hidrodinámicos y moleculares de la enzima por filtración en geles, ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, electroforesis en condiciones disociantes y cromatoenfocado obteniéndose los siguientes valores: coeficiente de sedimentación, $S_{20,w} = 6.7 \cdot 10^{-13} \text{ seg}$; coeficiente de difusión libre, $D_{20,w} = 4.9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$;

radio de Stokes, $a = 44.56 \text{ \AA}$ y punto isoeléctrico de 7.3.

El peso molecular de la enzima nativa, calculado utilizando la ecuación de Svedberg, fue de 123.000 Da, lo que coincide con el resultado obtenido con el Método de Andrews. El peso molecular de la subunidad fue de 61 kDa por lo que la enzima sería un dímero.

El cociente friccional de la enzima fue de 1.36 lo que indicaría una estructura levemente asimétrica.

4) Se determinó el pH óptimo para las tres reacciones catalizadas por la enzima: carboxilación [6.55], formación de PEP [7.76] e intercambio [6.48], encontrándose que la enzima es más activa en la dirección de formación de PEP.

5) La especificidad hacia los nucleótidos varió según la reacción considerada. En las reacciones de intercambio y de formación de PEP si bien la enzima mostró actividad en todos los casos esta fue mayor con los nucleótidos púricos. En el caso de la reacción de carboxilación la enzima presentó una especificidad absoluta por ADP.

No se observó inhibición significativa cuando se ensayaron los distintos nucleótidos en las reacciones de carboxilación y de formación de PEP cuando el sustrato era el nucleótido de adenina. Sin embargo, cuando el GTP era el sustrato para la reacción de formación de PEP, todos los nucleótidos presentaron un

efecto inhibitorio importante. En el caso de la reacción de intercambio tanto con ATP como con GTP como sustratos la inhibición fué mayor con los nucleótidos pirimidínicos y con el nucleótido de inosina que con los de adenina y guanina. Por otra parte ni el IDP ni el ITP ejercieron efecto inhibitorio significativo sobre la reacción de carboxilación (sustrato: ADP) o la reacción de formación de PEP (sustrato: ATP) respectivamente.

6) Al igual que la enzima aislada de otras fuentes la PEPCK presentó un requerimiento absoluto por metal divalente. En este sentido el Mn^{2+} fué el más efectivo siguiéndole en importancia el Cd^{2+} , aunque en ese caso la concentración de metal requerida para lograr la mayor activación fué significativamente menor. La enzima presentó una cinética michaeliana al ensayarla en presencia de Mn^{2+} , Cd^{2+} y Mg^{2+} .

Tanto el Cd^{2+} como el Mg^{2+} ejercieron un efecto sinérgico con el Mn^{2+} siendo los gráficos de doubles recíprocos bifásicos en ambos casos.

7) Se determinaron los parámetros cinéticos para las tres reacciones:

- a) Carboxilación: K_m PEP= 35 μ M; K_m ADP-Mn= 16 μ M y K_m $NaHCO_3$ = 2.6 mM, V_{max} = 3.2 μ moles/min/mg.
- b) Formación de PEP: K_m OA= 49 μ M, K_m ATP-Mn= 27 μ M, V_{max} = 31.7 μ moles/min/mg.
- c) Intercambio: $S_{0.5}$ OA : 41 μ M (ATP), 41 μ M (GTP) con n_H = 1.6 y K_m ATP-Mn= 37 μ M, V_{max} = 0.97 μ moles/min/mg.

8) Se estudió también el efecto histerético de activación de la enzima en la mezcla de reacción durante la determinación de la actividad de carboxilación encontrándose una relación entre dicho efecto y la concentración proteica de la muestra enzimática estudiada. El efecto de histéresis desaparecía cuando la enzima se sometía a diálisis pero se recuperaba por el agregado de sales a la mezcla de reacción, siendo en ese sentido el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ el más efectivo.

9) El quinolinato, catabolito del triptofano e intermediario en la síntesis de NAD^+ fué un inhibidor tanto de la actividad de intercambio como de la de carboxilación de la PEPCCK aislada del T.cruzi.

10) Se estudió también el efecto de inhibidores de enzimas con grupos tioles encontrándose que la enzima es muy sensible al efecto de los mercuriales orgánicos (CMS, FMA y PCMB) y también se inhibe significativamente en presencia de O-Iodosobenzoato, NEM, Iodoacetamida y DTNB. La reversión de la inhibición con DTT indicó que esta última se debía a un efecto de los reactivos sobre los grupos tioles.

11) No se encontraron distintas formas moleculares de la enzima utilizando la cromatografía líquida rápida para proteínas. Tampoco pudieron encontrarse productos de menor tamaño provenientes del tratamiento de la enzima

altamente purificada con la proteinasa cuantitativamente más importante del T. cruzi.

12) Se estudió también una actividad oxaloacético decarboxilásica asociada a la PEPCK y que posiblemente sea intrínseca de la enzima. Dicha actividad no fué modificada significativamente por los nucleósidos difosfato. Con respecto al efecto de los metales se observó una activación en presencia de Cd^{2+} y de Mn^{2+} pero sólo cuando la concentración de los metales era menor de 50 uM.

13) Se puso de manifiesto la presencia en epimastigotes de T. cruzi de una actividad oxaloacético decarboxilásica independiente de la PEPCK y altamente activable por Cd^{2+} . Dicha actividad se encontró en mayor proporción en extractos provenientes del tratamiento de las células por congelamiento y descongelamiento permaneciendo la mayor proporción de la actividad carboxiquinásica en el sedimento de dicho tratamiento. La cromatografía en ATP-agarosa de dicho extracto permitió una separación parcial de ambas actividades (carboxiquinásica y oxaloacético decarboxilásica dependiente de Cd^{2+}). La curva de pH para el extracto proveniente del tratamiento por congelamiento y descongelamiento mostró dos máximos para la actividad OD (Cd^{2+}) [5.4 y 6.65] y uno para la actividad OD en ausencia de metal [5.4].

BIBLIOGRAFIA

- Ackers, G.K. (1964). *Biochemistry*, 3, 723-730.
- Affranchino, J.L.; Schwarcz de Tarlovsky, M.S. y Stoppani, A.O.M. (1986). *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B, 381-388.
- Aguilar, Z. y Urbina, J.A. (1986). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 21, 103-111.
- Al-Ali, A.K.; Al-Husayni, H. y Powe, D.M. (1988). *Comp. Biochem. Physiol.*, 89, (2), 335.
- Andrews, P. (1965). *Biochem. J.*, 96, 595-606.
- Baernstein, H.D. (1953). *Exp. Parasitol.*, 2, 380-396.
- Bailar, J.C. (1956). En "The Chemistry of Coordination Compunds" (J.C. Bailar, ed.) Reinhold, New York.
- Ballard, F.J. y Hanson, R.W. (1967). *Biochem. J.*, 104, 866-887.
- Ballard, F.J. y Hanson, R.W. (1969). *J. Biol. Chem.*, 244, 5625-5630.
- Ballard, F.J. (1970). *Biochem. J.*, 120, 809-814.
- Barns, R.J. y Keech, D.B. (1968). *Biochem. Biophys. Acta*, 159, 514-526.
- Barns, R.J. (1971). PH D Thesis, University of Adelaida, Australia.
- Barns, R.J. y Keech, D.B. (1972a). *Biochem. Biophys. Acta*, 276, 284-296.
- Barns, R.J.; Keech, D.B. y O'Sullivan, W.J. (1972b). *Biochem. Biophys. Acta*, 289, 212-224.
- Barns, R.J. y Keech, D.B. (1972c). *Biochem. Biophys. Acta*, 289, 410-419.
- Barros, E.G. y Caldas, R.A. (1983). *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B, 449-452.
- Beaven, G.H. y Holiday, E. R. (1952). *Adv. Prot. Chem.*, 7, 319-386.
- Beck, I.; Muller, M. y Holzer, H. (1982). *Biochem. Biophys. Acta*, 705, 163-166.
- Behm, C.A. y Bryant, C. (1982). *International Journal for Parasitology*, 12, (4), 271-278.

- Bensandaun, A. y Weinstein, D. (1976). Anal. Biochem. 70, 241-250.
- Bentle, L.A.; Snoke, R.E. y Lardy, H.A. (1976). J. Biol. Chem., 251, 2922-2928.
- Bergmeyer, H. U. y Bernt, E. (1974). Methods of Enzymatic Analysis, 1, 485. Edited by Hans Ulrich Bergmeyer. (2° Ed). Academic Press.
- Bergmeyer, H. U.; Gawehn, K. y Grassl, M. (1974). Methods of Enzymatic Analysis, 2, 574. Edited by Hans Ulrich Bergmeyer. (2° Ed). Academic Press.
- Bock, P.E. y Frieden, C. (1976). J. Biol. Chem., 251, 5630-5636.
- Boiso, J. F. de; Docampo, R.; Stoppani, A.O.M. y Frasch, A.C.C. (1979). Medicina (Buenos Aires), 39, 362-368.
- Bontempi, E.J. (1990). Tesis de doctorado. F.C.E y N. U.B.A.
- Boveris, A.; Hertig, C.M. y Turrens, J.F. (1980). Abstract N°BQII, VIII Reuniao Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambú, M.G., Brazil.
- Bowman, I.B.R.; Tobie, E.J. y von Brand, Th. (1963). Comp. Biochem. Physiol., 9, 105-114.
- Brack, C. (1968). Acta Tropica, 25, 289-356.
- Brener, Z. (1973). Ann. Rev. Microbiol., 27, 347-383.
- Bridgeland, E.S. y Jones, K.M. (1967). Biochem. J., 104, 9-10.
- Brinkworth, R.I.; Hanson, R.W.; Fullin, F.A. y Schramm, V.L. (1981). J. Biol. Chem., 256, 10795-10802.
- Bryant, C. (1975). En Advances in Parasitology (Dawes, B., ed.), 16, 35. Academic Press, Orlando, Fl.
- Cáceres, O. y Fernandes, J.F. (1976). Rev. Brasil. Biol. 36, 397-410.
- Cannata, J.J.B. y Stoppani, A. O. M. (1963a). J. Biol. Chem., 238, (4), 1196-1207.
- Cannata, J.J.B. y Stoppani, A.O.M. (1963b). J. Biol. Chem., 238, (4), 1208-1212.
- Cannata, J.J.B. y Stoppani, A.O.M. (1963c). J. Biol. Chem., 238, (6), 1919-1927.

- Cannata, J.J.B. (1970). *J. Biol. Chem.*, 245, 792-798.
- Cannata, J.J.B. y Flombaun, M.A.C. de. (1974). *J. Biol. Chem.*, 249, (11), 3356-3365.
- Cannata, J.J.B.; Frasc, A.C.C.; Cataldi de Flombaun, M.A.; Segura, E.L. y Cazzulo, J.J. (1979). *Biochem. J.*, 184, 409-419.
- Cannata, J.J.B.; Docampo, R.; Valle, E.; Franke de Cazzulo, B.M. y Cazzulo, J.J. (1980). *Medicina (Buenos Aires)*, 40 (Supl.1), 143-153.
- Cannata, J.J.B.; Valle, E.; Docampo, R. y Cazzulo, J.J. (1982). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 6, 151-160.
- Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J. (1984a). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 11, 37-49.
- Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J. (1984b). *Comp. Biochem. Physiol.*, 79B, 297-308.
- Cataldi de Flombaun, M.A.; Cannata, J.J.B.; Cazzulo, J.J. y Segura, E.L. (1977). *Comp. Biochem. Physiol.*, 58B, 67-69.
- Cazzulo, J.J.; Juan, S.M. y Segura, E.L. (1977). *J. Gen. Microbiol.*, 99, 237-241.
- Cazzulo, J.J.; Valle, E.; Docampo, R. y Cannata, J.J.B. (1980). *J. Gen. Microbiol.*, 117, 271-274.
- Cazzulo, J.J. (1984). *Comp. Biochem. Physiol.*, 79B, 309-320.
- Cazzulo, J.J.; Franke de Cazzulo, B.M.; Engel, J.C. y Cannata, J.J.B. (1985). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 16, 329-343.
- Cazzulo, J.J.; Arauzo, S.; Franke de Cazzulo, B.M. y Cannata, J.J.B. (1988). *FEMS Microbiol. Lett.*, 51, 187-192.
- Cazzulo, J.J.; Cazzulo Franke, M.C. y Franke de Cazzulo, B.M. (1989). *FEMS Microbiol. Lett.*, 59, 259-264.
- Cazzulo, J. J. (1991). Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*. En : Harris, R. J.; Avila, J. L. y Wunderlich, F. (editores). Intracellular Parasites (Subcellular Biochemistry Series), Plenum Publishing Corporation, en prensa.
- Chance, B. (1954). *Methods of Biochemical Analysis*, 1, 410-424. Interscience Publishers Inc. New York.

- Chang, S.L. (1948). *J. Infect. Dis.*, 82, 102-121.
- Chang, H.C. y Lane, M.D. (1966). *J. Biol. Chem.*, 241, 2413-2420.
- Chau, H.S. y Ng, S.K. (1986). *Biochem. Cell Biol.*, 64, 898-905.
- Cohn, E.I. y Edsall, J. T. (1943). *Proteins, Aminoacids and Peptides as ions and dipolar ions*, 370-381, Reinhold Publishing Corp., New York.
- Colombo, G.; Carlson, G.M. y Lardy, H.A. (1978). *Biochemistry*, 17, 5321-5329.
- Colombo, G.; Carlson, G.M. y Lardy, H.A. (1981). *Biochemistry*, 20, 2749-2757.
- Colombo, G. y Lardy, H.A. (1981). *Biochemistry*, 20, 2758-2767.
- Cook, P.F.; Rao, J.; Hofer, H.W. y Harris, B.C. (1987). *J. Biol. Chem.*, 262, (29), 14063.
- Cooper, T.G. ; Tchen, T.T.; Wood, H.G. y Benedict, C.R. (1968). *J. Biol. Chem.*, 243, 3857-3863.
- Coronel, C.E.; Rovai, L.E.; Gerez de Burgos, N.M.; Burgos, C. y Blanco, A. (1981). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 4, 29-38.
- Corwin, L.M. (1959). *J. Biol. Chem.*, 234, 1338-1341.
- Crespo, A. y Urbina, J. (1979). Abstract N° 83 (Temas livres). Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro, Brasil.
- Davis, B.J. (1964). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427.
- deZwaan, A.; Kluymans, J.H.F.M. y Zandee, D.I. (1976). *Biochem. Soc. Symp.*, 41, 133-168.
- Dean, B. y Bartley, W. (1973). *Biochem. J.*, 135, 667-672.
- De los Santos, C.; Buldain, G.; Frydman, B. Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J.B. (1987). *Eur. J. Biochem.*, 149, 421-429.
- De Souza, W. (1984). *Cell Biology of T.cruzi. Int. Rev. Cytol.*, 86, 197-285.
- Docampo, R.; Boiso, J.F. de y Stoppani, A.O.M. (1978). *Biochem. Biophys. Acta*, 502, 466-478.

- Docampo, R.; Cruz, F.S., Leon, W. y Schmuñis, G. (1979). J. Protozool. 26, 301-303.
- Engel, J.C.; Franke de Cazzulo, B.M.; Stoppani, A.O.M.; Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J. (1987). Mol. Biochem. Parasitol., 25, 1-10.
- Ernster, L., Zetterstrom, R., and Lindberg, R. (1950) Acta Chem. Scand., 4, 942.
- Felicioli, R.A.; Barsacchi, R. e Ipata, P.L. (1970). Eur. J. Biochem., 13, 403-409.
- Foster, D.O.; Ray, P.D. y Lardy, H.A. (1966). Biochemistry, 5, 555-562.
- Foster, D.O.; Lardy, H.A.; Ray, P.D. y Johnston, J.B. (1967). Biochemistry, 6, 2120-2128.
- Frydman, B.; de los Santos, C.; Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J. (1990). Eur. J. Biochem., 192, 363-368.
- Gallwitz, W.E.; Jacoby, G.H.; Ray, P.D. y Lambeth, D.O. (1988). Biochem. Biophys. Acta, 964, 36-45.
- González Cadavid, N. y Paladini, A. C. (1964). Anal. Biochem., 9, 170-174.
- Goldie, A.H. and Sanwal, B.D. (1977). Proc. Can. Fed. Biol. Soc. Annu. Meet., 20, 105.
- Goldie, A.H. and Sanwal, B.D. (1980). J. Biol. Chem., 255, 1399-1405.
- Gutteridge, W.E. y Rogerson, G.W. (1979). En Biology of the Kinetoplastida (Lumsden, W.H. y Evans, D.A., editores), 2, 619-652. Academic Press, Londres.
- Gutteridge, W.E. (1981). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 484-492.
- Gutteridge, W.E. y Davies, M.J. (1982). FEMS Microbiology Letters, 13, 207-212.
- Haga, T.; Haga, K. y Gilman, A.G. (1977). J. Biol. Chem., 252, 5776-5780.
- Hammond, K.D. y Balinsky, D. (1978). Int. J. Biochem., 9, 199-211.
- Hammond, D.J.; Gutteridge, W.E. y Opperdoes, F.R. (1981). FEBS Lett., 128, 27-29.

- Hammond, D.J. y Gutteridge, W.E. (1982). *Biochem. Biophys. Acta*, 718, 1-10.
- Hart, D.T. y Opperdoes, F.R. (1984). *Molec. and Biochem. Parasitol.*, 13, 159-172.
- Hassan, H.F. ; Mottram, J.C. y Coombs, G.T. (1985). *Comp. Biochem. and Physiol.*, 81B, 1037.
- Hebda, C.A. y Nowak, T. (1982). *J. Biol. Chem.*, 257, 5503-5514.
- Hoare, C.Z. (1964). *J. Protozool.*, 11, 206-207.
- Holten, D.D. y Nordlie, R.C. (1965). *Biochemistry*, 4, 723-731.
- Johnson, W.V.; Kemp, J.R. y Anderson, P.M. (1990). *Arch. Biochem. Biophys.*, 280, (1), 376-382.
- Juan, S.M.; Cazzulo, J.J. y Segura, E.L. (1976). *Acta Physiol. Latinoam.*, 26, 424-426.
- Juan, S.M.; Cazzulo, J.J. y Segura, E.L. (1977). *J. Parasitol.*, 63, 921-922.
- Kamada, H. y Hamada, T. (1988). *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, (11), 2931-1932.
- Kahn, M. M. T. y Martell, A. E. (1962). *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 3037-3041.
- Klahr, S. y Schoolwerth, A.C. (1972). *Biochem. Biophys. Acta*, 279, 157-162.
- Klein, R. y Miller, P.G.G. (1981). *Parasitology*, 82, 1-30.
- Kosicki, G.W. (1968). *Biochemistry*, 7, 4299-4302.
- Krampitz, L.O. y Werkman, C.H. (1941). *Biochem. J.*, 35, 595-602.
- Krebs, A. y Bridger, W.A. (1976). *Can. J. Biochem.*, 54, 22-26.
- Lardy, H.A.; Foster, D.O.; Young, J.W.; Shrago, E. y Ray, P.D. (1965). *J. Cell and Comp. Physiol.*, 66, 39-54.
- Laemmli, U.K. (1970). *Nature (London)*, 227, 680.
- Lee, M.H.; Hebda, C.A. y Nowak, T. (1981). *J. Biol. Chem.*, 256, 12793-12801.

- Lehmann, D.L. (1963). *Ann.Trop. Med. Parasit.*, 57, 232-234.
- Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.G.; Devoux, G.; Grain, J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Polzansky, G.; Spragne, V.; Vassa, J. y Wallace, F.G. (1980). *J. Protozool.*, 27, 37-54.
- Leyden Webb, J. (1966). *Enzyme and metabolic inhibitors*. Vol. II. Academic Press, New York and London.
- Lloyd, G.H. y Barret, J. (1983). *Experimental Parasitology*, 56, 259-265.
- Lohmann, K. y Meyerhog, O. (1934). *Biochem. Z.*, 273, 60.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R. (1951). *J.Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Martin, R.G. y Ames, B.C. (1961). *J. Biol. Chem.*, 236, 1372-1379.
- Mc Daniel, H.G.; Reddy, W.J. y Boshell, B.R. (1972). *Biochem. Biophys. Acta*, 276, 543-550.
- McLaughlin, J. (1981). *Biochemistry International*, 2, 345-353.
- Meisner, H.; Lamers, W.H. y Hanson, R.W. (1983). *Trends in Biochemical Sciences*, 8, 165-167.
- Merryfield, M.L.; Kramp, D.C. y Lardy, H.A. (1982). *J. Biol. Chem.*, 257, 4646-4654.
- Meyuhas, O.; Boshiwtz, C. y Reshef, L. (1971). *Biochem. Biophys. Acta*, 284-296.
- Miles, M.A.; Souza, A.; Póvoa, M.; Shaw, J.J.; Lainson, R. y Toyé, P.J. (1978). *Nature*, 272, 819-821.
- Miller, R.S. y Lane, M.D. (1968). *J. Biol. Chem.*, 243, 6041-6049.
- Miller, P.G.G.; Linstead, D.J. y Klein, R.A. (1976). *Parasitology*, 73, XVI.
- Montamat, E.E.; Arauzo, S.S. y Blanco, A. (1987). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 22, 185-193.
- Moore, S. (1963). *J. Biol. Chem.*, 238, 235-237.
- Mottram, J.C. y Coombs, G.H. (1985). *Biochem. Biophys. Acta*, 827, 310-319.

- Nordlie, R.C. y Lardy, H.A. (1963). *J. Biol. Chem.*, 238, 2259-2263.
- Noce, P.S. y Utter, M.F. (1975). *J. Biol. Chem.*, 250, 9099-9105.
- Ochoa, S. (1955). *Methods Enzymol.*, 1, 735-739
- Oppendoes, F.R. y Borst, P. (1977). *FEBS Lett.*, 80, 360-364.
- Oppendoes, F.R. y Cottam, D. (1982). *FEBS Lett.*, 143, 60-64.
- Oppendoes, F.R. (1984). *FEBS Lett.*, 169, 35-39.
- Oppendoes, F.R.; Baudhuin, P.; Coppens, I.; De Roe, C.; Edwards, S.W.; Weijers, P.J. y Misset, O. (1984). *Journal of Cell Biology*, 98, 1178-1184.
- O'Sullivan, W. J. y Perrin, D.D. (1964). *Biochemistry*, 3, 18-26.
- Pietrzak Rohrer, S.; Saz, H.J. y Nowak, T. (1986). *J. Biol. Chem.*, 261, (28), 13049-13055.
- Punekar, N.S. y Lardy, H.A. (1987). *J. Biol. Chem.*, 262, (14), 6714-6719.
- Racagni, G.E. y Machado de Domenech, E.E. (1983). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 9, 181-188.
- Raw, I. (1959). *Rev. Inst. Med. Trop.*, Sao Paulo, 1, 192-194.
- Reinhart, G.D. y Lardy, H.A. (1980). *Biochemistry*, 19, 1477-1484.
- Rodrigues, F.; Ramirez, J.L. y Rangel-Aldao, R. (1990). *Abstracts, VI PAABS Congress, Sao Paulo, Brazil*, p70.
- Rogerson, G.W. y Gutteridge, W.E. (1979). *Int. J. Biochem.*, 10, 1019-1023.
- Rogerson, G.W. y Gutteridge, W.E. (1980). *Int. J. Parasit.*, 10, 131-135.
- Rose, I.A. (1960). *J. Biol. Chem.*, 235, 1170-1177.
- Ruiz Amil, M.; Torrontegui de, G.; Palacian, E.; Catalina, L. y Losada, M. (1965). *J. Biol. Chem.*, 240, 3485-3491.
- Ryley, J.F. (1956). *Biochem. J.*, 62, 215-222.

- Salvarrey, M. S. (1986). Tesis de doctorado. F. C. B. y F., Universidad Nacional de Rosario.
- Salvarrey, M.S.; Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J. (1989). *Biochem. J.*, 260, 221-230.
- Salzman, T.A.; Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A., Battle A.M. del C.; Docampo, R. y Stoppani, A.O.M. (1982). *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B, 663-667.
- Sato, A.; Suzuki, T. y Kochi, H. (1986). *J. Biochem.*, 100, (3), 671-678.
- Sato, Y. (1986). *Biochem. Biophys. Acta*, 872, 177-182.
- Schwarz de Tarlovsky, M.S.; Affranchino, J.L.; Stoppani, A.O.M.; Isola, E.L.D.; Lammel, E.M. y Gonzalez Cappa, S.M. (1985). *Rev. Arg. Microbiol.*, 17, 121-130.
- Shaw, J.J.; Voller, A. y Bryant, C. (1964). *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 58, 17-24.
- Shrago, E. y Shug, A.L. (1966). *Biochem. Biophys. Acta*, 122, 376-378.
- Simpson, J.W. y Awapara, J. (1964). *Comp. Biochem. Physiol.*, 12, 457-464.
- Simpson, J.W. y Awapara, J. (1966). *Comp. Biochem. Physiol.*, 18, 537-548.
- Soling, H.D. y Kleineke, J. (1976). En "Gluconeogenesis" (R.W. Hanson y M. Mehlman, eds., Wiley, New York), 369-462.
- Stoppani, A.O.M. y Boiso, J.F. de (1973). *Experientia*, 29, 1494-1496.
- Stoppani, A.O.M.; Docampo, R.; Boiso, J.F. de; y Frasch, A.C.C. (1980). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2, 3-21.
- Suratek, K.R.; Chao, K.L.; Chao, H.L.; Cornblath, M. y Tildon, T. (1970). *Biochem. Biophys. Acta*, 206, 316-321.
- Taylor, M.B.; Berghausen, H.; Heyworth, P.; Messenger, N.; Rees, L.J. y Gutteridge, W.E. (1980). *Int. J. Biochem.*, 11, 117-120.
- Taylor, M.B. y Gutteridge, W.E. (1986a). *FEBS Lett.*, 199, 237-241.
- Taylor, M.B. y Gutteridge, W.E. (1986b). *FEBS Lett.*, 201, 262-266.

- Taylor, M.B. y Gutteridge, W.E. (1987). Exp. Parasitol., 63, 84-97.
- Tiselius, A.; Hjertén, S. y Levin, O. (1956). Arch. Biochem. Biophys., 65, 132-155.
- Torrentegui de, G.; Palacián, E. y Losada, M. (1966). Biochem. Biophys. Res. Commun., 22, 227-231.
- Tortora, P.; Hanozet, G.M. y Guerritore, A. (1985), Analytical Biochemistry, 144, (1), 179-185.
- Urbina, J. (1980). Abstracts of the XXX Convención Nacional de ASOVAC, Mérida, Venezuela, p.152.
- Urbina, J.A. y Crespo, A. (1984). Mol. Biochem. Parasitol., 11, 225-239.
- Urbina, J.A. (1987). Arch. Biochem. Biophys., 258, 186-195.
- Urbina, J.A. y Avila, L. (1989). Phytochemistry, 28, (5), 1349-1353.
- Urbina, J.A.; Osorno, C.E. y Rojas, A. (1989). Studies using 3-mercaptopicolinic acid. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84, Suppl II, 59.
- Urbina, J.A.; Osorno, C.E. y Rojas, A. (1990). Arch. Biochem. Biophys., 282, (1), pag 91.
- Utter, M.F. y Kurahashi, K. (1953). J. Am. Chem. Soc., 75, 758-759.
- Utter, M.F. y Kurahashi, K. (1954a). J. Biol. Chem., 207, 787-802.
- Utter, M.F.; Kurahashi, K. y Rose, I.A. (1954b). J. Biol. Chem., 207, 803-819.
- Utter, M.F. y Kurahashi, K. (1954c). J. Biol. Chem., 207, 821-841.
- Utter, M.F. (1961). Enzymes, 2° Ed., 5, 319-340.
- Utter, M.F. y Kolenbrander, H.M. (1972). The Enzymes, 2° Edition, 6. 117-168. Boyer, P.D.(Ed). Academic Press, New York.
- Visser, N. y Opperdoes, F.R. (1980). European Journal of Biochemistry, 103, 623-632.
- Visser, N.; Opperdoes, F.R. y Borst, P. (1981). European Journal of Biochemistry, 118, 521-526.

- Von Brand, Th. (1979). Biochemistry and Physiology of Endoparasites. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- Walaas, E. (1958). Acta Chem. Scand., 12, 528-536.
- Warburg, O. y Christian, W. (1941). Bioch.Z., 310, 384-421.
- Warren, L.G. y Kitzman, W.B. (1963). J. Parasit., 49, 808-813.
- Warren, L.G. y Patrzek, D. (1963). Acta Cientifica Venezolana, Suppl. 1, 127-134.
- Weber, K. and Osborn, M.J. (1969). J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
- Whright, J.A. and Sanwal, B.D. (1969). J. Biol. Chem., 244, 1838-1945.
- Williamson, J.R. (1967). Adv. Enzyme Regul., 5, 229-255. Weber, G. (Ed.). Pergamon, London.
- Williamson, D.H.; Mayor, F. y Veloso, D. (1971). En "Regulation of gluconeogenesis", 9th Conference of the Gesellschaft fur biologische chemie (H.D. Soling y Williamson, E.B. Williams, eds.), 92-102. Academic Press, New York.
- Zeledón, R. (1960). J. Parasit., 46, 541-551.

W. J. Cannata

[Handwritten signature]

Dr. JOAQUIN J. B. CANNATA
Prof. Reg. Adjunto
Departamento de Bioquímica
Fac. de Medicina-UBA