

## Tesis de Posgrado

# Transducción de señales en Phytomonas (parásitos de plantas)

Farber, Marisa Diana

1996

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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

**Cita tipo APA:**

Farber, Marisa Diana. (1996). Transducción de señales en Phytomonas (parásitos de plantas). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2827\\_Farber.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2827_Farber.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Farber, Marisa Diana. "Transducción de señales en Phytomonas (parásitos de plantas)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2827\\_Farber.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2827_Farber.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Transducción de señales en *Phytomonas***  
**(parásitos de plantas)**

**Autor:** Marisa Diana Farber  
**Directora:** Dra. Mirtha M. Flawiá

Lugar de trabajo  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA  
Y BIOLOGIA MOLECULAR  
INGEBI - FCEyN

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

1996

lyl

<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>Sistemas de transducción de señales</b>	<b>2</b>
Transducción de señales en eucariotes	3
Transmisión del mensaje al núcleo	5
<b>Proteínas G heterotriméricas</b>	<b>6</b>
Mecanismos de acción de la proteína G	8
Diversidad de las subunidades G $\alpha$	10
Estructura de las subunidades G $\alpha$	13
Sitios de interacción de la subunidad G $\alpha$	17
Sitios de interacción de G $\alpha$ con el receptor	17
Interacción de G $\alpha$ con los efectores	18
Interacción de G $\alpha$ con G $\beta\gamma$	19
Modificaciones postraduccionales de la subunidad $\alpha$ .	20
Modificaciones lipídicas	20
Estructura de las subunidades $\beta\gamma$	20
Relación estructura-función de las G $\beta\gamma$	22
Puntos críticos de control de las señales que atraviesan la membrana	23
Interfaces Receptor- Proteína G- Efector	23
Cinética	25
Estequiometría	25
Detección de coincidencia	26
Compartimentalización de las proteínas que intervienen en la transducción de señales.	26
<b>Adenilil ciclasa</b>	<b>28</b>
Ciclasas de nucleótidos de purina : aspectos generales de los genes y las proteínas.	29
Clase I: adenilil ciclasas enterobacterianas	29
Clase II: adenilil ciclasas tóxicas, activables por Calmodulina	30
Clase III: la clase "universal"	31
Organización estructural de las adenilil ciclasas clase III	33
Estructura de las adenilil ciclasas de mamíferos	35
Regulación de la actividad enzimática de las adenilil ciclasas de mamíferos	38
Regulación de la actividad enzimática de las adenilil ciclasas de eucariotas inferiores.	44
Adenilil ciclasa en la familia Tripanosomatidae	47
<b>Proteína quinasa dependiente de AMPc</b>	<b>49</b>
Subunidad Catalítica (cPKA)	50
Unión de ATP	51
Unión de sustrato y actividad de fosfotransferasa	51
Modificaciones post-traduccionales	51
Subunidad regulatoria	52
Localización subcelular	53
Inhibición de la subunidad catalítica (hipótesis del pseudosustrato)	54
Sustrato universal de la PKA	54
PKA en Eucariotes Inferiores	55
<b>Organismo en estudio: <i>Phytomonas</i></b>	<b>56</b>
Historia	56
Los Tripanosomas	59
El género de los tripanosomátidos inferiores	63
Diversidad Biológica de los Tripanosomas de Plantas	66
Morfología	66
Localización en la planta	67

Tripanosomas del latex	67
Tripanosomas intrafluolémicos	67
Tripanosomas de frutos o granos	67
Transmisión y ciclo de vida de la Phytoomonas	68
<i>Transmisión en plantas laticíferas</i>	68
<i>Transmisión en floema , frutos y granos</i>	68
<i>Ciclo de vida</i>	69
Relación huésped-parásito	70
<i>En el latex</i>	70
<i>En el floema</i>	70
<i>En el fruto</i>	72
Cultivo	73
<i>Trips. que pueden ser aislados en un medio acelular</i>	73
<i>Trips. que requieren la presencia de células en el medio</i>	73
Caracterización Bioquímica y Molecular	73
Enzimas del ciclo de la arginina	73
Isoenzimas	73
Lectinas	74
Serología	74
Metabolismo de la glucosa	75
ADN del kinetoplasto (K DNA)	76
<u>Tamaño de los minicírculos</u>	76
<u>Análisis de la restricción con endonucleasas</u>	77
ARN ribosomal	77
Presencia de virus	78
Problemas en la clasificación de los tripanosomas de plantas	78

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>80</b>
<b>PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>81</b>
Cepas utilizadas	81
Cultivo	81
Conservación de la cepa	81
Cosecha de los cultivos	81
Ruptura de los parásitos y obtención de las fracciones celulares	82
Preparación de extractos crudos	83
Microscopía óptica	83
<b>ENSAYO DE ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA</b>	<b>83</b>
Reacción propiamente dicha	83
Purificación del AMPc formado	84
Cálculo de la actividad específica	86
<b>ENSAYO DE UNIÓN DE [<sup>35</sup>S]GTP-γS</b>	<b>87</b>
<b>ADP RIBOSILACION</b>	<b>88</b>
Ensayo de ADP-ribosilación en gel	88
<b>UNIÓN DE (α <sup>32</sup>P)GTP POR FOTOAFINIDAD</b>	<b>90</b>
<b>ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA</b>	<b>91</b>
<b>TECNICAS INMUNOLOGICAS</b>	<b>93</b>
Immunoblot (Western blot)	93
Inmunoprecipitación	96
<b>PURIFICACION PARCIAL DE QUINASAS DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMPc</b>	<b>96</b>
<b>ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE PKA</b>	<b>97</b>
<b>ENSAYOS DE AUTOFOSFORILACION</b>	<b>98</b>
<b>ENSAYO DE UNIÓN DE [<sup>3</sup>H]-AMPc</b>	<b>98</b>
<b>PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS</b>	<b>99</b>
Determinación de proteínas	99
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>100</b>
<b>CULTIVO</b>	<b>101</b>
Curvas de crecimiento	101
Morfología	104
<b>ADENILIL CICLASA DE PHYTOMONAS</b>	<b>106</b>
Propiedades generales	106
Detección de actividad - Localización subcelular	106
Propiedades cinéticas	108
Efecto de los moduladores de la actividad de adenilil ciclasa en eucariotes superiores.	110
	110
<b>PROTEÍNAS G DE PHYTOMONAS</b>	<b>117</b>
Enfoque Bioquímico	117
Ensayo de unión de GTP γ S [ <sup>35</sup> S] en membranas de Phytomonas (Binding)	117
Unión específica de GTP α [ <sup>32</sup> P] por fotoafinidad (cross-linking)	120
ADP-ribosilación	123
Enfoque inmunológico	126
Enfoque estructural	131
Resultados preliminares con una cepa patógena	134

QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMPc	136
Purificación parcial	136
Cromatografía en DEAE-celulosa	136
Unión específica de [ <sup>3</sup> H]-AMPc	138
Ensayo de autofosforilación	139
Caracterización inmunológica	140
 POSIBLE ROL DE LA VÍA DEL AMPc (experimentos "in vivo")	 143
 CONCLUSIONES	 153
 BIBLIOGRAFIA	 157

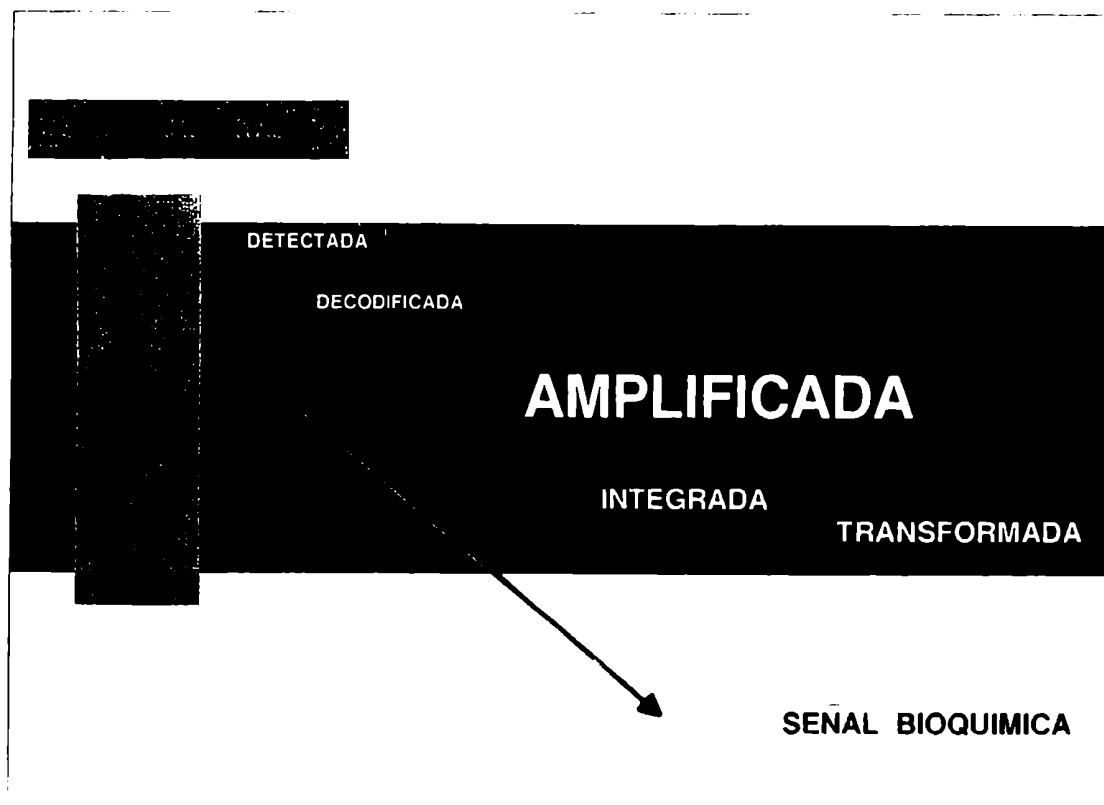


*INTRODUCCION*

## Sistemas de transducción de señales

Las células deben adaptarse al medio que las rodea y para responder en forma adecuada necesitan sentir en forma muy precisa su entorno. Al ser la membrana plasmática el punto de contacto de la célula con el exterior, es allí donde se produce la captación de las distintas señales del medio y su procesamiento en forma discriminada, para culminar en los diferentes eventos bioquímicos que darán lugar a la respuesta celular.

El conjunto de procesos involucrados en la decodificación de los diferentes “mensajes” del medio ambiente, constituyen los **sistemas de transducción de señales**. La transducción de una señal implica una modificación en la forma de la señal a medida que va pasando a través de los componentes que dan lugar a estos procesos. La raíz “**duce**” en latín significa “**guiar**”, por lo tanto la señal es guiada a través de la célula por pasos de transducción. Estos pasos a su vez, basan su eficiencia en su capacidad de amplificar e integrar dichas señales (Fig 1).

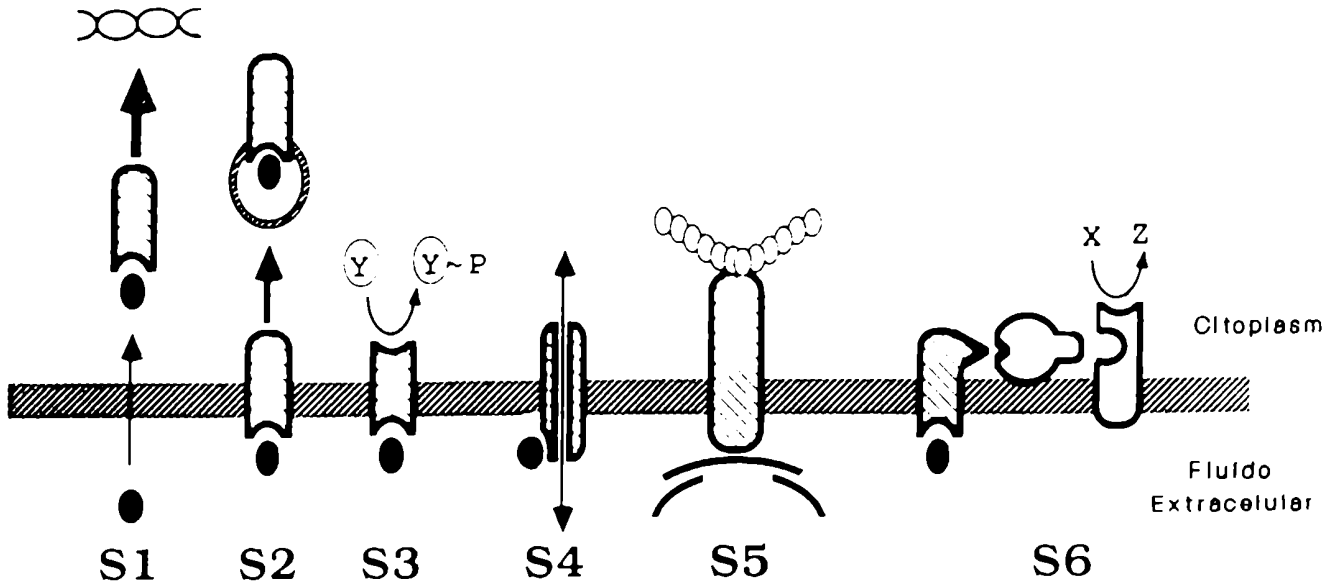




Estos sistemas aparecen en los organismo más rudimentarios y con la evolución han ido ganando en complejidad, pero se puede afirmar que se ha mantenido un principio básico de organización de los mismos.

### Transducción de señales en eucariotes

Los diferentes organismos eucarióticos han desarrollado una serie de estrategias moleculares para la transducción de señales extracelulares a través de la membrana. Los diferentes mecanismos pueden dividirse en seis grupos, de acuerdo al esquema de la Fig. 2.



La primera clase (S1) es la más sencilla y es utilizada por las hormonas esteroideas, que poseen una hidrofobicidad suficiente para atravesar la bicapa lipídica. En el citoplasma se unen a una proteína que actúa como receptor y que, además es capaz de translocarse al núcleo y pegarse al ADN. De esta forma, el receptor activa la transcripción de genes específicos y de ese modo se produce la respuesta celular (Beato, 1989). Otra estrategia (S2) implica la unión del ligando con un receptor que atraviesa la membrana y el complejo así formado se internaliza. Este mecanismo es el que se conoce como

endocitosis mediada por receptor y un ejemplo de este mecanismo es la captación de colesterol por la lipoproteína de baja densidad (LDL); el complejo formado se une al receptor de LDL y el conjunto se internaliza en forma de vesículas; en el citoplasma se libera el colesterol mientras que el receptor en general se recicla y la LDL se degrada en lisozomas (Brown et al, 1983).

En algunos casos la llegada del mensaje a la cara externa del receptor transmembrana dispara una actividad enzimática de su región intracelular (S3), cuyo mejor ejemplo son los receptores con actividad de quinasa de tirosina (Y). En dicho caso, luego de la unión del ligando (EGF, PDGF, insulina, etc.), se produce la dimerización del receptor y la autofosforilación de los residuos tirosinas, a los cuales se unirán proteína que contengan el dominio SH2 (homólogos de Scr), las cuales de esta manera son reclutadas al residuo tirosina fosforilado del receptor. Las vías reguladas por este mecanismo son, entre otras, el camino de las quinasas 3 de fosfoinosítidos, la vía de la quinasa C de proteínas (a través de fosfolipasa  $C\gamma$ ), la vía Ras (Marshall , 1995).

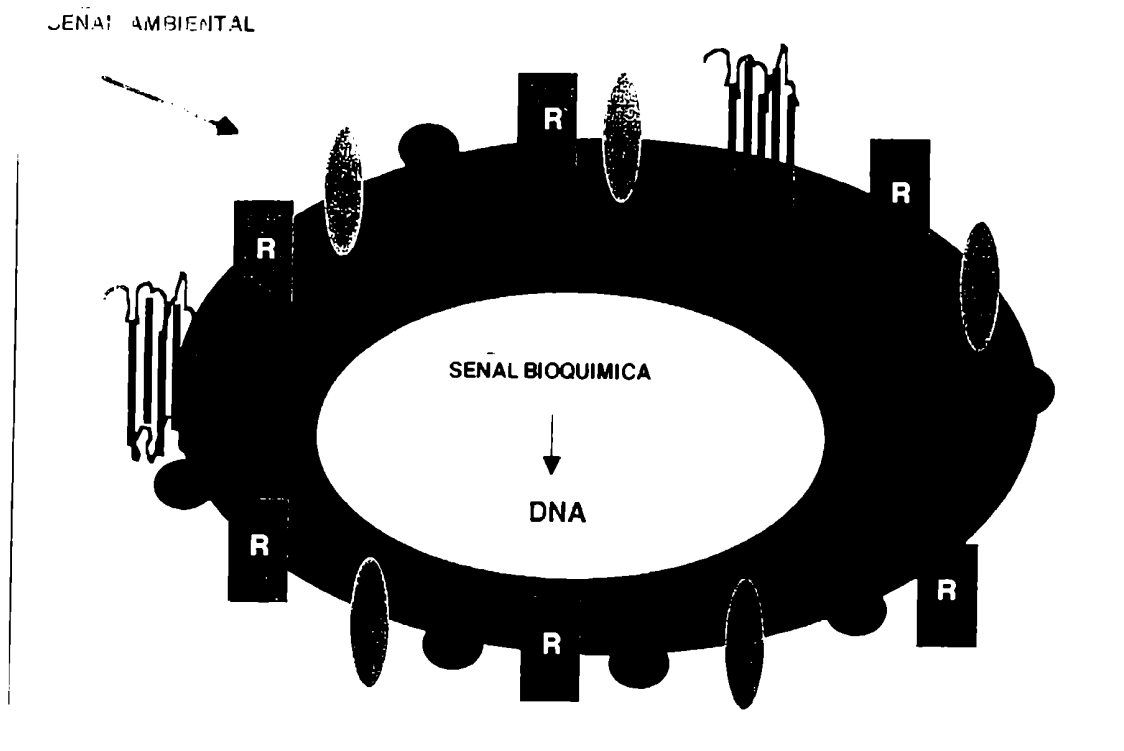
Un mecanismo diferente (S4) se da en las sinapsis y placas neuromusculares; en esos casos los neurotransmisores (acetil colina, ácido  $\gamma$  aminobutírico, etc.) se unen a una proteína transmembrana que actúa como canal iónico. Al unirse el ligando, el canal se abre rápidamente y permite el paso de iones que producen un cambio en el potencial eléctrico de la membrana (Barnard et al, 1987).

La estrategia S5, involucra a los receptores de la familia de las integrinas. Estos receptores ligan proteína de la matriz extracelular a microfilamentos del citoesqueleto, y regulando la forma de la célula, la movilidad, el pegado a la matriz extracelular y el crecimiento.

El 90% de las señales extracelulares que actúan a través de receptores están acopladas a proteínas que unen e hidrolizan GTP, llamadas proteínas G (S6). Dentro de esta estrategia, uno de los caminos más estudiados es el mediado por AMPc, cuyos componentes serán detallados en esta introducción.

## Transmisión del mensaje al núcleo

En forma frecuente, la estimulación de receptores resulta en una alteración de la transcripción de genes específicos. Esto se debe a que los segundos mensajeros o bien proteínas que actúan en alguna vía de transducción de señales, modulan la actividad de factores de transcripción. (Fig 3)

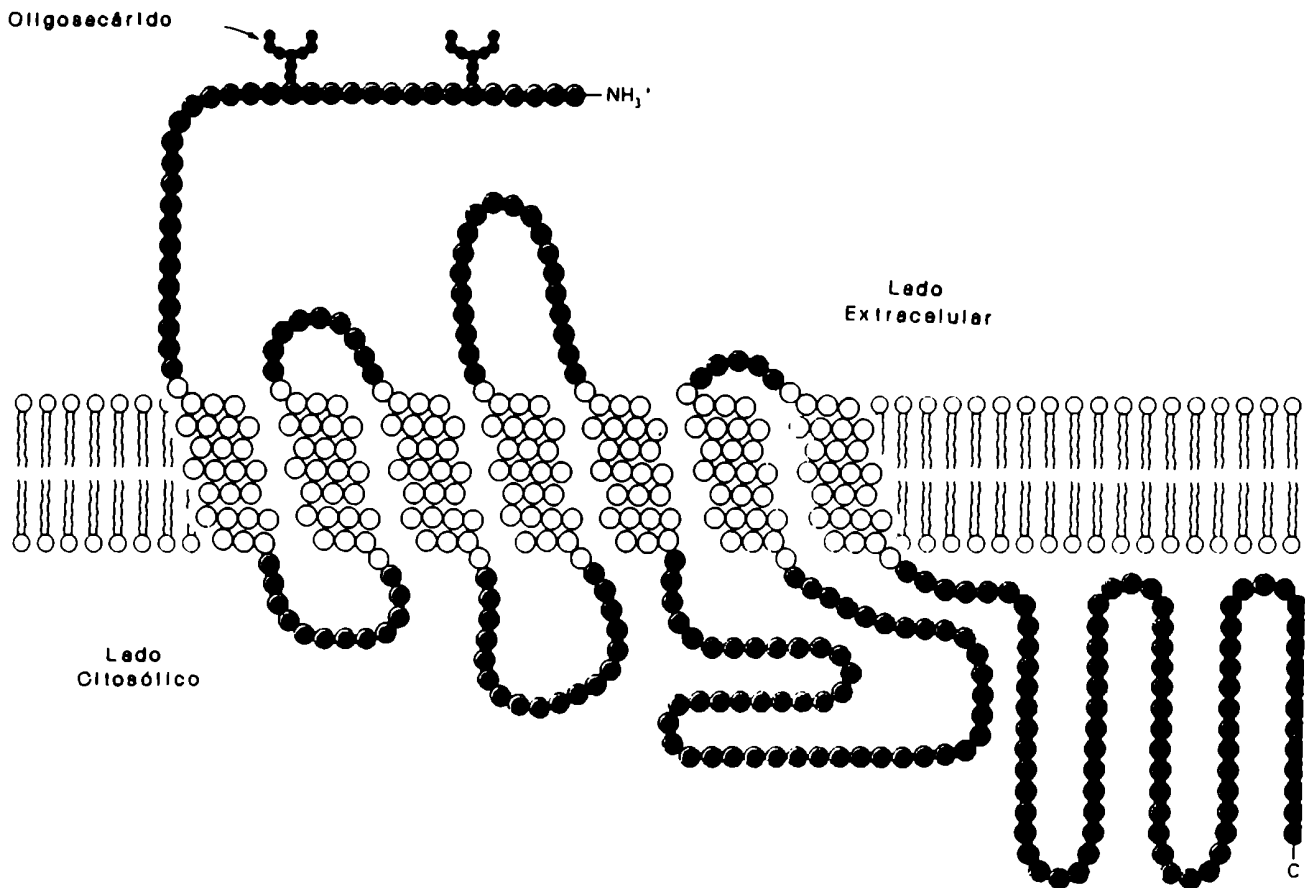


Así, el AMPc induce la expresión de numerosos genes y ese efecto es mediado por una proteína que se une a un consenso determinado en la región promotora de esos genes. Ese consenso se denomina CRE o elemento de respuesta a AMPc y la correspondiente proteína que se une al mismo, CREB (Montminy y Bilezikjian, 1987).

La activación de la quinasa C de proteínas por ésteres de forbol, también induce la expresión de genes; estos genes poseen un consenso denominado TRE que es reconocido por factores de transcripción como AP-1, cuya actividad es regulada por PKC (Angel et al, 1987). El factor AP-1 es un dímero formado por los productos de los protooncogenes c-jun y c-fos.

## Proteínas G heterotriméricas

Cientos de señales químicas y físicas bombardean constantemente la superficie celular. Muchas de ellas no entran a la célula, pero en cambio se unen a un receptor de la superficie e inician el flujo de información que progresa hacia el interior de la célula. Los receptores para muchas hormonas (tales como catecolaminas, gonadotrofinas, hormona paratiroidea, y glucagón), olores y luz, tienen una estructura característica: una cadena polipeptídica que atraviesa 7 veces la membrana, con su extremo carboxi-terminal del lado citoplasmático (Dohlman et al. 1991). Las vueltas o loops que conectan cada paso intermembrana con el siguiente del lado extracelular, participan de la interacción de estos receptores con el ligando, y la especificidad para el acople a la proteína G está dada por las zonas transmembrana V y VI y por el tercer "loop" citoplasmático (Kobilka, 1988)(Fig 4)



La estimulación de estos receptores activa a un grupo de proteínas que se acoplan a los mismos, denominadas proteínas G (por su capacidad de unirse a GTP), que regulan a una variedad de enzimas y canales iónicos. Estas enzimas y canales se denominan efectores, porque los cambios en sus respectivas actividades provoca una modificación en la composición iónica o en los niveles de los segundos mensajeros (tales como AMPc o inositol fosfatos), que son los que desencadenan la respuesta celular.

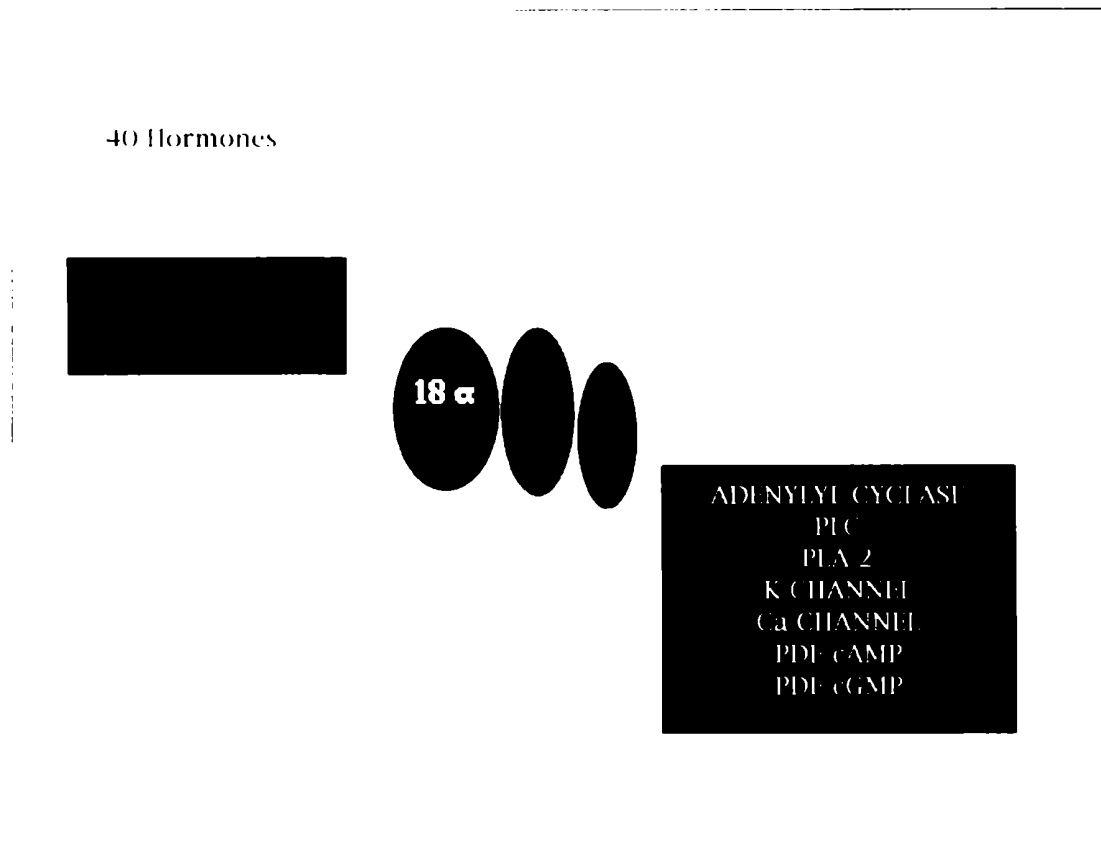
Las proteínas capaces de unir GTP constituyen la gran superfamilia de las GTPasas, que incluye a las pequeñas proteínas que unen GTP (productos de los oncogenes y proto-oncogenes ras, proteína de peso molecular 21000 aproximadamente), varios factores involucrados en la síntesis de proteínas (ej. el factor de elongación bacteriano, EF-Tu) y las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas.

Las proteínas G heterotriméricas están constituidas por:

- **una subunidad  $\alpha$** , la cual posee el sitio de unión para el nucleótido de guanina, la actividad GTPásica intrínseca, y son sustrato de la ADP-ribosilación por toxinas bacterianas (en la actualidad se han identificado 18 tipos diferentes de subunidades  $\alpha$ ),

- **el complejo de subunidades  $\beta\gamma$** , que se comporta como un monómero funcional (se han identificado 5 subunidades  $\beta$  y 7 subunidades  $\gamma$ ). El complejo  $G\beta\gamma$  aumenta la afinidad de  $G\alpha$  por su receptor; regula a los efectores ya sea en forma directa o en conjunto con la subunidad  $G\alpha$ . También se los ha implicado en el reclutamiento a las membranas de las quinasas que fosforilan a los receptores acoplados a proteínas G.

La Fig 5 resume las interacciones descriptas.



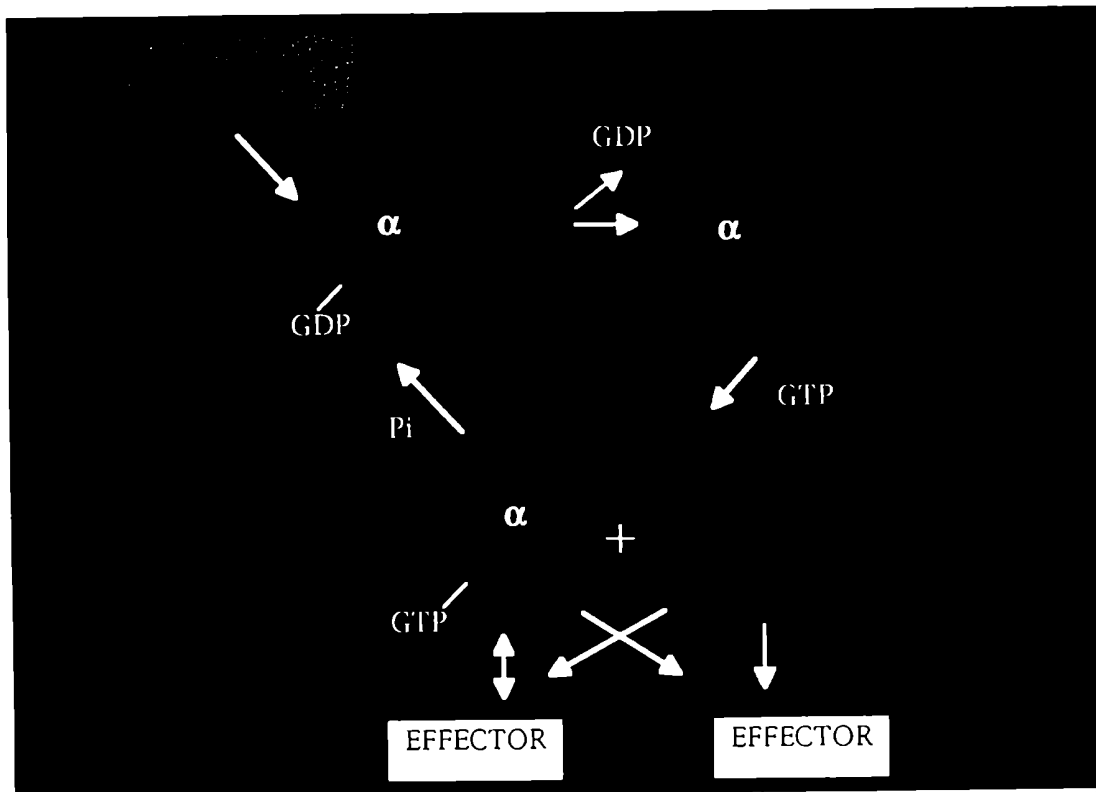
### Mecanismos de acción de la proteína G

En la Figura 6 se ilustra el ciclo de activación y desactivación de las proteínas G, que transmiten la señal desde el receptor al efector. Cuando el GDP está unido, la subunidad  $\alpha$  se asocia con la subunidad  $\beta\gamma$  y forma un heterotrímero inactivo que se une con el receptor. Tanto  $\alpha$  como  $\beta\gamma$  se pueden unir al receptor. La subunidad  $\alpha$  unida a GDP puede interaccionar con el receptor, pero su asociación es altamente estimulada por  $\beta\gamma$ .

Cuando una señal química o física estimula al receptor, este se activa y cambia su conformación. La subunidad  $\alpha$  unida a GDP responde también con un cambio conformacional que implica una disminución en la afinidad por GDP, y en consecuencia, la liberación del mismo. Como la concentración de GTP en las células es mucho mayor que la de GDP, el GDP es reemplazado por GTP. Una vez que este último se unió, la subunidad  $\alpha$  adopta su conformación activada y se disocia tanto del receptor como de  $\beta\gamma$ . Las subunidades libres, tanto  $\alpha$  como  $\beta\gamma$ , están listas entonces para interaccionar y regular el sistema efector apropiado. El estado activado dura hasta que el GTP es

hidrolizado a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad  $\alpha$ . Todas las isoformas de la subunidad  $\alpha$  son GTPasa, aunque la velocidad de hidrólisis varíe ampliamente de una subunidad a otra (Carty et al. 1990, Linder et al., 1990). Una vez que el GTP se transforma en GDP, las subunidades se reasocian, se transforman en inactivas y regresan con el receptor. Es importante señalar que la velocidad de hidrólisis de GTP es un mecanismo de tiempo que controla la duración de la activación, tanto de  $\alpha$  como de  $\beta\gamma$ . La reasociación apaga el sistema y lo deja listo para responder nuevamente. Por lo tanto, aunque  $\beta\gamma$  no une GTP, su tiempo de activación depende de la velocidad de hidrólisis de la subunidad  $\alpha$ , que es la que determinará su velocidad de reasociación.(Fig6)

Fig.6



## Transducción de señales a través de las subunidades de proteínas G.

Por largo tiempo prevaleció la hipótesis de que el mecanismo de transducción de la señal vía proteínas G era la activación del efector respectivo por parte de la subunidad  $\alpha$  unida a GTP, mientras que  $\beta\gamma$  era sólo un regulador negativo. Se pensaba que la liberación de  $\beta\gamma$  libre a partir de una proteína G abundante como  $G_i$ , desactivaba otras subunidades  $\alpha$  formando heterotrímeros inactivos (titulando otras subunidades  $\alpha$ ). En realidad este mecanismo es válido para la desactivación de la adenilil ciclasa (Gilman 1987). Este paradigma cambió fundamentalmente con el descubrimiento de que la subunidad  $\beta\gamma$  podía activar el canal de  $K^+$  muscarínico y el hecho de que ambas subunidades pudiesen regular efectores positivamente (Logothetis et al., 1987). Este resultado fue confirmado luego por otros laboratorios y recientemente en estudios usando subunidades  $\beta\gamma$  recombinantes y canales iónicos (Reuveny et al. 1994, Wickman et al., 1994). Subsecuentemente, se demostró que la subunidad  $\beta\gamma$  era un regulador positivo de un gran número de efectores además del canal de  $K^+$  incluyendo adenilil ciclasa, fosfolipasa  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), fosfolipasa  $A_2$  (PLA $_2$ ), fosfoinosítido 3-quinasa (PI3-quinasa), y quinasa del receptor  $\beta$  adrenérgico (Clapham y Neer, 1993). La subunidad  $\beta\gamma$  incluso actúa a través de *ras* para activar a la vía de la quinasa activada por mitógenos (MAP) (Crespo et al. 1994; Faure et al., 1994). Está claro que varios efectores pueden ser regulados tanto por la subunidad  $\alpha$  como la  $\beta\gamma$ , pero el patrón de regulación es extraordinariamente específico del subtipo de efector: un subtipo de adenilil ciclasa es activada por  $\alpha$  y no tiene regulación por  $\beta\gamma$ , un segundo subtipo es activada por  $\alpha$  y posteriormente activada sinérgicamente por  $\beta\gamma$ , y un tercer subtipo es activada por  $\alpha$  pero inhibida por  $\beta\gamma$  (Tang y Gilman 1991). Asimismo PLC $\gamma$  no es activada por ninguna subunidad de proteína G, mientras que PLC $\beta$  se activa independientemente tanto por  $\alpha$  como  $\beta\gamma$  (Smrcka y Sternweis, 1993).

### Diversidad de las subunidades $G\alpha$

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad se han identificado unos 18 tipos diferentes de subunidad  $\alpha$ . Las mismas pueden ser divididas en 4 clases principales de acuerdo a la similitud



de sus respectivas secuencias aminoacídicas, que están en un rango de 56% a 95% de identidad (Simon et al 1991). Con la excepción de las proteínas G que se encuentran en los órganos sensoriales (tales como  $\alpha_i$ ,  $\alpha_{gust}$ , o  $\alpha_{olf}$ ) y algunos tipos de subunidades  $\alpha$  que se expresan predominantemente en células hematopoyéticas ( $\alpha_{16}$ ) o en neuronas ( $\alpha_o$ ), la mayoría se expresan ampliamente. La células individuales contienen usualmente por lo menos 4 o 5 tipos de subunidades  $\alpha$ .  
Tabla 1.

Tabla 1. Clases de subunidades G $\alpha$

Clase	Miembros	Toxina	Funciones
$\alpha_s$	$\alpha_s$	Cólera	Estimula AC, regula Canales de $Ca^{2+}$
	$\alpha_{olf}$	Cólera	Estimula AC
$\alpha_i$	$\alpha_i$ ( $\alpha_{i1}$ , $\alpha_{i2}$ , $\alpha_{i3}$ )	Pertusis	Inhibe AC, abren canales $K^+$
	$\alpha_o$ ( $\alpha_{oA}$ , $\alpha_{oB}$ )	Pertusis	Cierra canales, inhibe recambio de PI
	$\alpha_t$ ( $\alpha_{t1}$ , $\alpha_{t2}$ )	Per/Col	Estimula cGMP Fosfodiesterasa
	$\alpha_{gust}$	Pertusis	Efector no conocido
$\alpha_z$	$\alpha_z$		Efector no conocido
	$\alpha_q$ , $\alpha_{11}$ , $\alpha_{14}$ , $\alpha_{15}$		Activan Fosfolipasa C
$\alpha_{16}$			
$\alpha_{12}$	$\alpha_{12}$ , $\alpha_{13}$		? (Se la relaciona a $\alpha_{13}$ con el intercambio $Na^+ / K^+$ *)

\*Según Voyno-Yasenestskaya et al. 1994

Las Fig. 7 y 8 resumen las interacciones de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$  con sus correspondientes efectores, respectivamente.

Fig. 7

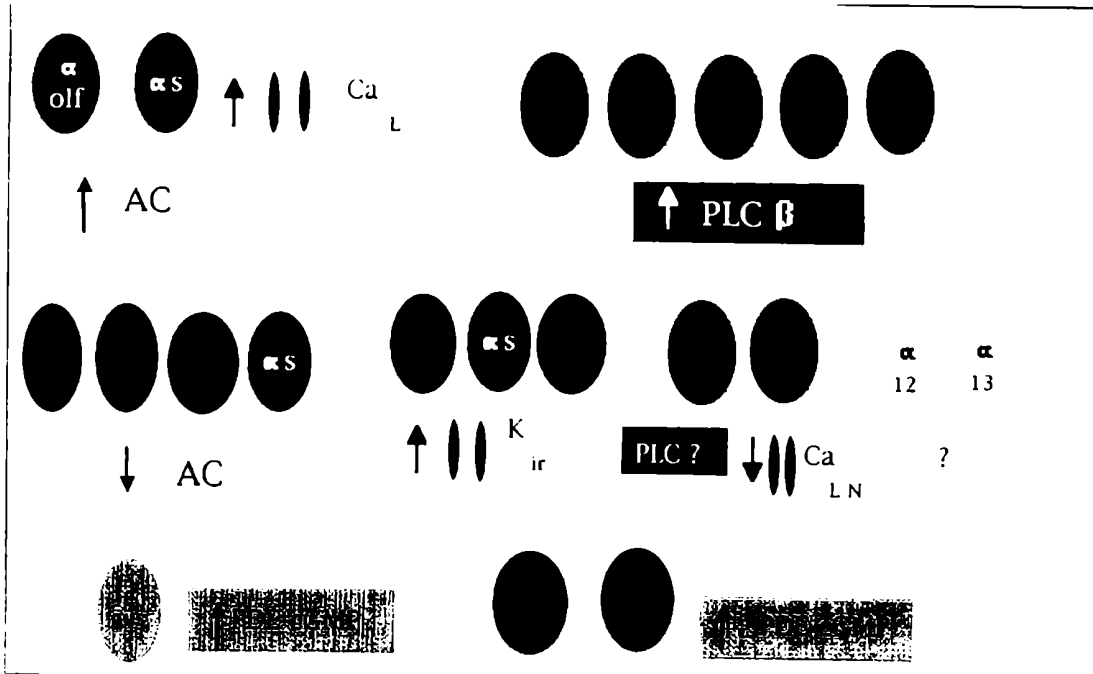
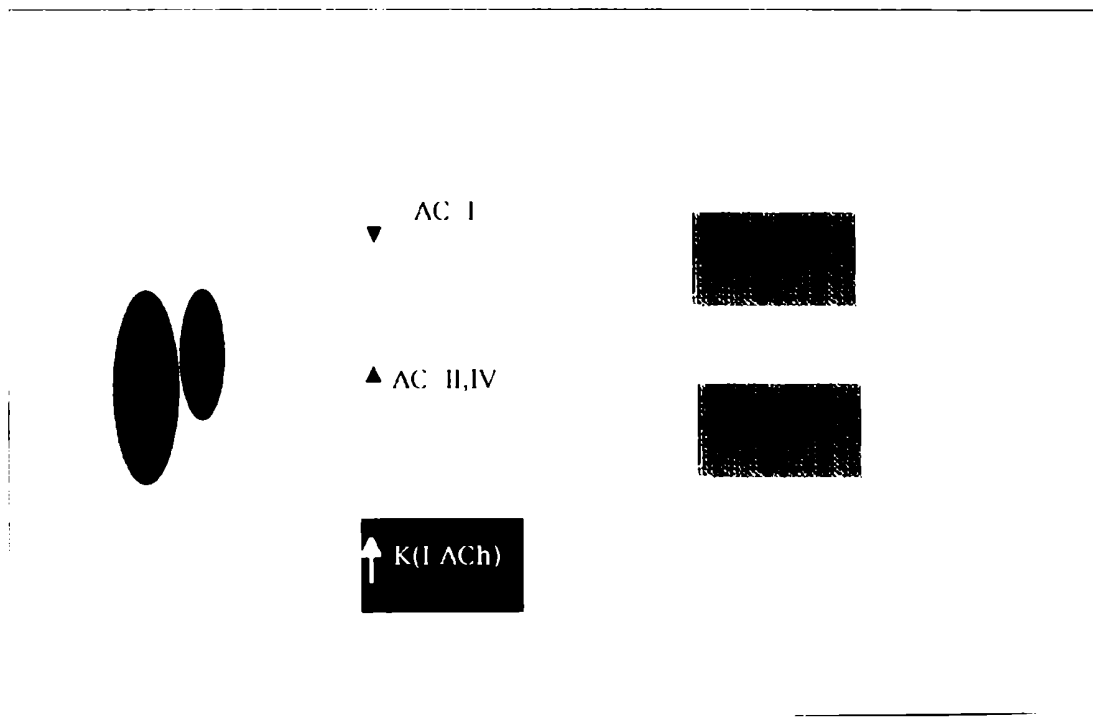


Fig 8



## Estructura de las subunidades $G\alpha$

Las subunidades  $\alpha$  de los heterotrómeros son una familia de proteínas de entre 39 y 52 kDa, con una similitud a nivel de su secuencia aminoacídica que va de un 56 a 95% de identidad.

Algunos subtipos de subunidad  $\alpha$  pueden ser ADP-ribosiladas en forma específica por toxinas bacterianas.

La reacción de ADP-ribosilación es una modificación proteica ampliamente distribuida en la naturaleza. La transferencia de un grupo ADP ribosa a partir de  $NAD^+$  como sustrato es parte de un mecanismo molecular diseñado para modular la estructura y la actividad de distintas proteínas (Ueda y Hayaishi, 1985).

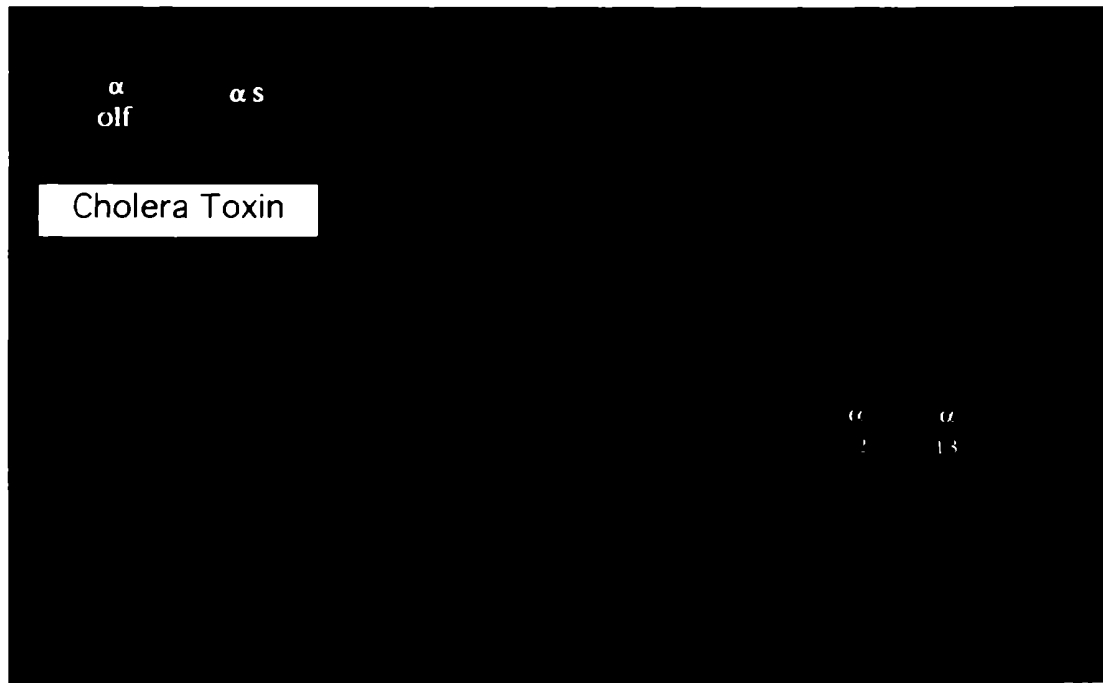
En el caso de algunas proteínas G, esta reacción es mediada por toxinas bacterianas (pertúsica y/o colérica), que conducen a la modificación de los niveles celulares de AMPc, siendo la causa de la alteración que estas bacterias provocan en el hombre.

La toxina del Cólera puede ADP-ribosilar a  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha o l f}$  y  $G_{\alpha t}$  en una reacción ligando independiente en la Arg localizada muy cerca del grupo fosfato  $\gamma$  (Arg 174  $G_{\alpha t}$ , Arg 201  $G_{\alpha s}$ ). Esta modificación lleva a la activación constitutiva de la proteína G debido a la disminución de la actividad GTPasa intrínseca (Hepler, y Gilman, 1992). La ADP ribosilación de las  $G_{\alpha s}$  presentes en la mucosa intestinal es la reacción crítica que determina la activación de adenilil ciclasa, que desemboca en la diarrea (Northup et al. 1980).

También pueden ser ADP-ribosiladas por Cólera, pero de manera ligando dependiente,  $G_{\alpha i}$  y  $G_{\alpha o}$ , las cuales no son sustrato de esta reacción en condiciones normales, esto indica que el residuo Arg conservado entre todas las subunidades puede ser desenmascarado por interacción con el receptor activado y estaría cumpliendo un rol muy importante en la regulación de la hidrólisis del GTP (Kaziro et al. 1991)

También  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha t}$ ,  $G_{\alpha g u s t}$ , y  $G_{\alpha o}$  pueden ser ADP-ribosiladas por la toxina Pertusis en el residuo Cys que se encuentra a cuatro aminoácidos del COOH terminal, causando el desacople Receptor/prot. G, (West et.al. 1985) (en el caso de  $G_i$  que regula la adenilil ciclasa, la ADP-ribosilación bloquea la inhibición, por lo tanto el efecto es un aumento de los niveles de AMPc). La actividad de la toxina Pertusis se incrementa por la presencia de complejos  $G\beta\gamma$  (Conklin y Bourne 1993).Fig 9

Fig 9: ADP-ribosilación mediada por toxinas bacterianas



Las recientes descripciones de la estructura cristalina de G $\alpha$ t unida a GTP $\gamma$ S (Noel et al. 1993), unida a GDP (Lambright, et al. 1994) y de la unida a AlF $_4^-$  (Sondek, et al 1994), han permitido el conocimiento detallado de la estructura de G $\alpha$ t. La proteína consiste en 2 dominios: uno que asemeja la estructura de ras p21, llamado dominio GTPasa y un dominio  $\alpha$ -helicoidal adicional (Fig. 11 -2-). Esta estructura general también se observó en la estructura cristalina de G $\alpha$ i1 unida a GDP y unida a AlF $_4^-$  (Coleman et al. 1994).

El dominio GTPasa, común a todos los componentes de la familia GTPasa, consiste en 5  $\alpha$ -hélices que rodean a 6 cadenas de hojas  $\beta$  y contienen las secuencias consenso involucradas en la unión de GTP de todas las GTPasas (Fig.10- 11-):

- GXGXXGKS: Lazo que une fosfato
- DXXG: unión de Mg $^{2+}$
- NKXD: unión del anillo de guanina.

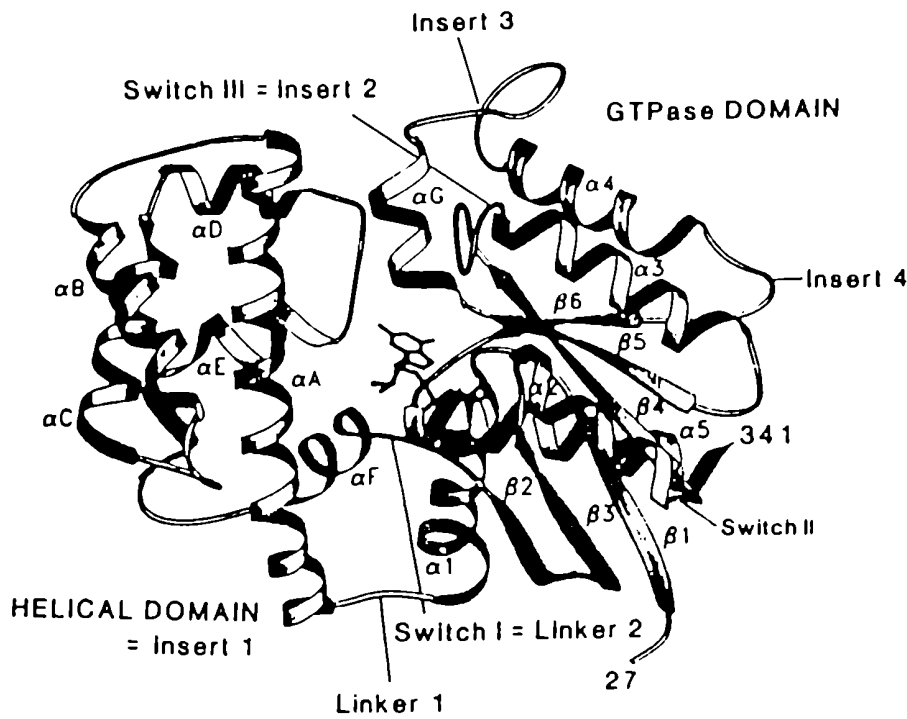


Fig. 10: Estructura cristalina de Gat- GDP

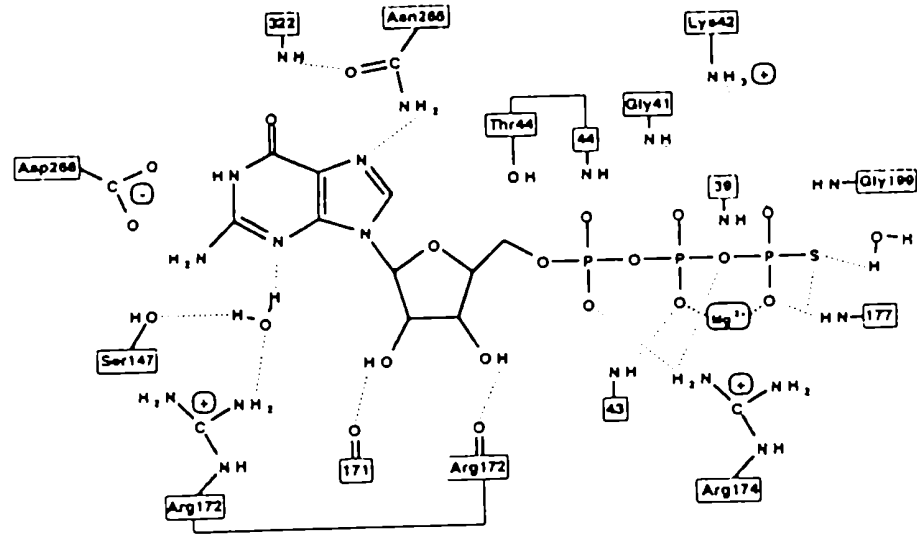


Fig. 11: Sitios de contacto del GTP con la subunidad Gat, basada en la estructura cristalina. Ilustración esquemática de los principales puntos de contacto entre Gat y GTPγS

También presenta otro sitio de unión del anillo de guanina, TCAT cuya secuencia homóloga en ras p21 es TSAK y TSALK en EF-Tu. Otra

región involucrada en la unión de  $Mg^{2+}$  y los fosfatos es RXXT. En *Gat* la cadena lateral de la Arg 174 (Arg 178 *G $\alpha$ i*), que es sustrato de la ADP ribosilación por toxina del Cólera, se une por puente hidrógeno a los Oxígenos de los fosfatos  $\alpha$  y  $\gamma$  y al puente oxígeno de los fosfatos  $\beta$  y  $\gamma$ . Esta Arg jugaría un importante rol en la hidrólisis del GTP, ya que ras p21, en donde este residuo no está presente, tiene una actividad GTPasa intrínseca mucho mas baja que *G $\alpha$* , y la ADPribosilación por cólera o la mutación de esta Arg disminuye la actividad de *Gat* en forma dramática. En ras p21 y otras proteínas G pequeñas que no poseen este residuo existe una proteína activadora de la actividad GTPasa (GAP) que interacciona con esta región aumentando la velocidad de hidrólisis.

Existen además 4 regiones principales que se insertan con respecto a la estructura de ras p21 y que son características de las proteínas G heterotriméricas (I1-I4) Fig 2. Cada uno de estos fragmentos insertados le agregan importantes funciones a la proteína G. El primero de estos fragmentos es el más grande (unos 120 aa) y se pliega en un dominio helicoidal independiente que se conecta con el dominio GTPasa por dos lazos flexibles (L1 y L2). Entre estos dos dominios hay una profunda hendidura en la cual el nucleótido de guanina esta fuertemente unido. Este dominio interviene tanto en la unión del GTP como en la actividad GTPasa. Los fragmentos 2-4 son escasos aa dentro de regiones del dominio GTPasa. el fragmento 2 toma parte en el mecanismo interruptor dependiente de GTP (ver a continuación), y el 4 interviene en la activación del efector. El fragmento 3 tiene una función aún desconocida.

Las funciones claves de la proteína G son unir GDP en el estado inactivo, cambiar el GDP por el GTP en presencia de el respectivo receptor activado e hidrolizar el GTP después de haber activado al efector correspondiente. Las formas *G $\alpha$ -GDP* y *G $\alpha$ -GTP* representan las conformaciones inactiva y activa respectivamente. La diferencia fundamental entre las dos conformaciones es el grado de exposición del nucleótido al solvente. En ambas conformaciones, la ribosa y el anillo de guanina están profundamente enclavados entre los dos dominios, pero el fosfato  $\beta$  y el  $Mg^{2+}$  del GDP están expuesto en la superficie en la conformación inactiva. En la conformación activa el  $Mg^{2+}$  y los fosfatos están ocultos por una serie de tres cambios conformacionales alrededor del fosfato  $\gamma$ : un segmento que incluye la

Arg 174 y Thr 177, llamado interruptor 1(Switch 1); una región que incluye la Gly 199 y  $\alpha$ -hélice 2, llamada interruptor 2(Switch 2); y un segmento dentro del fragmento 2, llamado interruptor 3 (Switch 3). La conformación  $G\alpha$ -GTP tiene una menor afinidad por el receptor y por las subunidades  $G\beta\gamma$  y puede activar al efector.

Las proteínas G heterotriméricas tienen una velocidad de hidrólisis de GTP intrínseca mucho mayor que ras p21 y otras proteínas G pequeñas ((Wittinghofer A 1994). Esto se debería a una estructura proteica más ordenada alrededor de los fosfatos  $\beta$  y  $\gamma$  y a la presencia de 2 residuos, Glu 39 y Arg 174, los cuales están conservados en todas las proteínas heterotriméricas (Arg 178 en  $G\alpha_i$  por ej.), pero no se hallan en ras p21. La Arg 174 está estratégicamente localizada de manera tal que a través de su interacción con el puente oxígeno de los fosfatos  $\beta$ - $\gamma$  y el hidroxilo del fosfato  $\gamma$ , estabiliza el estado de transición ( $GDP.PO_3$ ) promoviendo así el clivaje del enlace. La definición del rol de esta Arg permite comprender el efecto de la toxina del cólera (Sondek et al. 1994; Coleman et al. 1994)

### **Sitios de interacción de la subunidad $G\alpha$**

#### **Sitios de interacción de $G\alpha$ con el receptor**

La unión de ligando a su receptor induce una conformación en la cual se expone un sitio de alta afinidad del receptor por la proteína G en su forma heterotrimérica unida a GDP. Se supone que existe una interacción que implica a varios sitios (interacción multisitios) entre el receptor activado y la proteína G (Dratz, et al 1993), y que la activación de la proteína G por parte de este receptor causa a su vez cambios estructurales dentro de  $G\alpha$  que resultan en el intercambio de GDP por GTP. Los sitios de contacto entre  $G\alpha$  y el receptor han sido objeto de intensas investigaciones.

A partir de varios trabajos, existen evidencias claras acerca del papel determinante del extremo COOH de  $G\alpha$  en la interacción de las proteínas G y su respectivo receptor (Conklin y Bourne, 1993; Neer, 1994). Esta interacción puede ser interrumpida por la ADP-ribosilación mediada por la toxina pertusis, de la Cys347 de la  $G\alpha$ , por unión de anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales

dirigidos contra el extremo COOH terminal, así como también por mutagénesis dirigida del COOH terminal.

Un péptido sintético del extremo COOH terminal de  $G\alpha_i$  (340-350), se puede unir y estabilizar en forma directa a la rodopsina fotoactivada (Hamm et al 1988), y otro péptido correspondiente al extremo COOH terminal de  $G\alpha_s$ , tiene la capacidad de evocar la unión de alta afinidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Rasenick et al. 1994).

A través de ensayos con quimeras de  $G\alpha_q/G\alpha_{i2}$  (Conklin et al., 1993) también se demostró el rol del extremo COOH terminal en la determinación de la especificidad de la interacción proteína G/receptor, ya que al reemplazar 3 aminoácidos de esta región en  $G_q$  por cuatros residuos correspondientes a  $\alpha_{i2}$ , permitió que  $\alpha_q$  interacciones con receptores que normalmente interaccionan con  $\alpha_{i2}$ . Si embargo no sería esta zona el único indicador de especificidad, ya que  $G\alpha_{oA}$  y  $G\alpha_{oB}$ , aunque tienen la misma región COOH terminal, interactúan con receptores diferentes para mediar la inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$  (Kleuss et al. 1991). A su vez múltiples regiones de  $G\alpha_{i6}$  serían necesarias para interactuar con el receptor C5a (Lee et al. 1995). Por lo tanto parecería que están involucradas otras regiones además de la ya mencionada, en esta interacción. La estructura cristalina de  $G\alpha_i$  sugiere otros sitios adicionales de interacción (Lambright et al., 1994). Una región en particular es la correspondiente a los residuos 212-215, la cual haría contacto con la región COOH terminal de  $G\alpha_t$ , mediante fuerzas de Van del Waals. Esta región sería importante ya que es parte del switch II, el cual se altera durante la activación. También estarían involucradas en esta interacción las regiones que contactan el anillo de guanina. A su vez la cristalización del heterotrímero  $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_1$  (Wall, et al. 1995) también parecería confirmar que además de la región COOH terminal, uno de los lazos citoplasmáticos del receptor interaccionaría con la zona switch II, lo cual implicaría la proximidad del receptor también con la región NH2 de la subunidad  $\alpha$  y con parte de la subunidad  $\beta$ .

### **Interacción de $G\alpha$ con los efectores**

La subunidad  $\alpha$ , luego de liberarse del receptor activado y de las subunidades  $\beta\gamma$ , interactúan y regulan un amplio rango de enzimas y canales iónicos (Ver fig 7). Usando quimeras  $G\alpha_i/G\alpha_s$ , se demostró



que el extremo COOH terminal de  $G_{\alpha s}$ , específicamente la región 235-356, era la dominio activador de la actividad de adenilil ciclase (Osawa et al. 1990), y que mutaciones de los residuos dentro de esta región disminuían la capacidad de estimular esta actividad (Ito y Gilman 1991). A través de la construcción de quimeras, Berlot y Bourne (1992), pudieron especificar la localización de las regiones activadoras del efector. Encontraron así que eran tres las regiones discretas de  $G_{\alpha s}$  involucradas: región I, residuos 236-240; región II, residuos 276-285 y región III, residuos 349-356. La estructura cristalina de  $G_{\alpha i 2}$  sugiere además una región adicional, todas correspondientes al switch II y regiones cercanas.

Los estudios realizados sobre la interacción de  $G_{\alpha t}$  con la fosfodiesterasa de GMPc (PDE), permitió obtener información detallada acerca de la manera en que  $G_{\alpha}$ -GTP puede activar a su efector. Se han identificado por lo menos dos regiones capaces de activar al efector. La PDE, está constituida por dos subunidades catalíticas y dos  $\gamma$  inhibitorias que mantienen a la fosfodiesterasa inactiva, siendo la región COOH terminal de la subunidad  $\gamma$ , el principal sitio de interacción con las subunidades catalíticas. Por lo tanto, para activar a la PDE,  $G_{\alpha t}$ -GTP debe desplazar este dominio del sitio de interacción con la subunidad catalítica.  $G_{\alpha t}$ -GTP se une a la PDE $\alpha$  en una región adyacente al extremo COOH terminal. Esta interacción no está presente en  $G_{\alpha t}$ -GDP, ya que esta conformación es incapáz de activar a la fosfodiesterasa (Skiba et al. 1995).

### **Interacción de $G_{\alpha}$ con $G_{\beta\gamma}$**

El extremo NH<sub>2</sub> terminal de la subunidad  $G_{\alpha}$  es el sitio de interacción con  $\beta\gamma$ . Si se digiere con tripsina 2 kDa del NH<sub>2</sub> terminal, se produce la pérdida de la interacción con  $\beta\gamma$ . Los residuos 7-10 son críticos para este ensamblado. La miristoilización de la subunidad  $\alpha$  contribuye a estabilizar la interacción.

Dado que el GTP desfavorece la interacción entre  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ , se especula que  $\beta\gamma$  se une a un bolsillo hidrofóbico que está presente en la conformación  $G_{\alpha}$ GDP, pero que se encuentra cerrado en  $G_{\alpha}$ -GTP. Este bolsillo está formado por parte del switch 2. (Neer 1994).

Se ha sugerido, por otra parte que  $G_{\gamma}$  interactúa directamente con  $G_{\alpha}$ , basándose en ensayos de cross-linking. Recientemente, usando la expresión individual de  $G_{\beta 1}$  y  $G_{\gamma 2}$ , se demostró que  $G_{\gamma}$

estaba directamente asociada con  $G\alpha_o$  y que esta interacción requería que  $G\gamma$  estuviese isoprenilada y en cambio no tuvieron evidencia de una interacción directa con  $G\beta$  (Rahmatullah y Robishaw, 1994).

Sin embargo ni  $G\beta$  ni  $G\gamma$  solos pueden interactuar funcionalmente con  $G\alpha$ . En estos estudios la isoprenilación tenía muy poco efecto en la interacción de  $\beta\gamma$  con el  $G\alpha$  (Wildman et al 1993).

## **Modificaciones postraduccionales de la subunidad $\alpha$ .**

### **Modificaciones lipídicas**

Algunas subunidades  $\alpha$  están miristoiladas en la glicina N-terminal ( $\alpha_o$ ,  $\alpha_i$ ,  $\alpha_z$ ); mientras que otras no presentan esta modificación ( $\alpha_s$ ,  $\alpha_q$ ). La subunidad  $\alpha_t$  puede presentar un grupo miristilo o ácido laurico. La miristoilización es necesaria para el anclaje a la membrana y facilita la unión con  $\beta\gamma$  (Casey, 1994). La miristoilización es una modificación covalente irreversible y aparentemente no tendría un rol regulatorio.

Algunas subunidades  $\alpha$  son palmitoiladas en la Cys3. Al contrario de la miristoilización, esta modificación es reversible. La activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos conlleva a la rápida depalmitoilización de  $\alpha_s$ , y en estas condiciones  $\alpha_s$  no puede activar a la adenilil ciclasa. La depalmitoilización sería un mecanismo de desensibilización de las células.

Un receptor que interactúa con dos proteínas G podría causar la depalmitoilización de una de las subunidades  $\alpha$  con una cinética diferente o una potencia distinta respecto de la otra, favoreciendo así la respuesta de esta última (Casey 1994).

### **Estructura de las subunidades $\beta\gamma$**

La subunidad  $\beta$  es de aproximadamente 36 kDa. Se ha propuesto que su estructura está formada por dos regiones muy distintas:

- la porción NH<sub>2</sub>-terminal, la cual se piensa que forma una hélice anfipática en forma de espiral enroscada (Lupas et al. 1992);
- la porción COOH-terminal, que consiste en 7 unidades repetitivas de 43 aminoácidos cada una. Estas unidades repetitivas son ejemplos de una clase de secuencias que usualmente terminan con Trp-Asp (**WD**), las cuales se encuentran presentes en familias de

proteínas que no están únicamente involucradas en la transducción de señales, sino también en el control de la división celular, transcripción, procesamiento de ARN mensajeros inmaduros, ensamblaje del citoesqueleto y fusión de vesículas. En general la mayoría de las proteínas que poseen estas secuencias repetitivas (WD), intervienen en el ensamblaje de complejos macromoleculares (Neer et al. 1994).

La subunidad  $\gamma$  constituye un grupo relativamente diverso de proteínas de 6 a 9 kDa de peso molecular. Todas sufren modificaciones postraduccionales, lo que le otorga mayor diversidad a esta familia de subunidades. Están isopreniladas en la Cisteína de la porción COOH-terminal, (la cual es parte de la secuencia consenso **CAAX-COOH**, común a todas las proteínas sujetas a este tipo de modificaciones postraduccionales), y metiladas en el COOH terminal después de la proteólisis de los tres últimos aminoácidos (Neer, 1994). La isoprenilación toma la forma de un grupo farnesilo o geranilo, según la identidad de X (Cys, Met, Leu, Ser o Ala). Si la isoprenilación de la subunidad  $\gamma$  está bloqueada, el complejo  $G\beta\gamma$  se forma, pero no podrá interactuar en forma apropiada con la membrana lipídica (Higgins y Cassey, 1994). Recientemente, se ha hipotetizado acerca de la presencia de modificaciones lipídicas adicionales, aún no identificadas (Wilcox, et al. 1994).

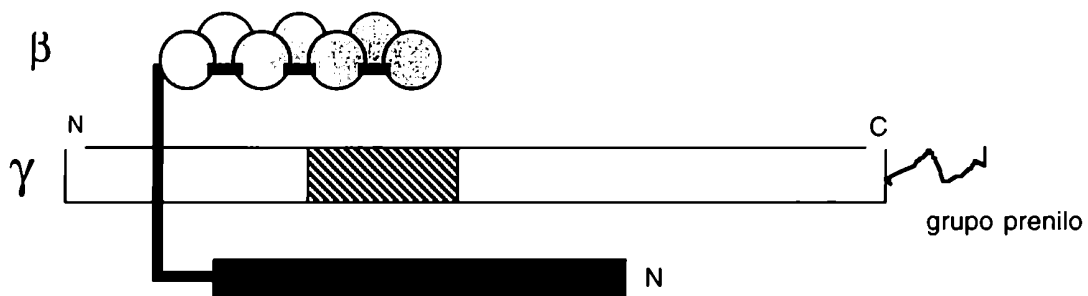
Las subunidades  $\beta\gamma$  interactúan fuertemente a través de mecanismos no covalentes, y sólo se pueden disociar bajo condiciones desnaturalizantes.

Se conocen cinco subunidades  $\beta$  de mamíferos, las cuales presentan entre un 53% a 90% de identidad entre sí (Watson et al. 1994). Por el contrario, las 6 subunidades  $\gamma$  conocidas son mucho más disímiles entre ellas de lo que lo son, incluso, las subunidades  $\alpha$  entre sí (Cali et al. 1992). Con esta cantidad de subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  se podrían producir 30 combinaciones diferentes, pero en realidad, no se pueden formar todos los pares posibles. Por ejemplo, la subunidad  $\beta_1$  puede interactuar con  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$ , pero la  $\beta_2$  aunque muy similar a la anterior, sólo es capaz de interactuar con  $\gamma_2$  y no  $\gamma_1$ . (Schmidt et al, 1992, Pronin y Gautam, 1992).

No ha habido prácticamente diferencia por parte de los diferentes pares de  $\beta\gamma$  reconstituidos, en la habilidad para activar a los efectores o interactuar con  $\alpha$ , , excepto  $\beta_1\gamma_1$ , que ha resultado

menos efectivo en algunos casos. Sin embargo  $\beta_1\gamma_1$  se encuentra únicamente en retina, por lo tanto su selectividad no es de ayuda en el intento de desentrañar la función específica de  $\beta\gamma$  en otras células (Clapham y Neer 1993, Wickman et al. 1994).

La asociación entre  $\beta$  y  $\gamma$  ocurre en el citosol, antes del anclaje del dímero a la membrana y antes del procesamiento proteolítico de la subunidad  $\gamma$ , donde los últimos tres aminoácidos que son removidos parecen ser necesarios para dicho ensamblaje. Sin embargo, ni la prenilación, ni la metilación estarían involucradas en el mecanismo de esta asociación. (Fukada et al. 1994).



**Fig12:** Modelo de la subunidad  $\beta\gamma$ . Los círculos representan las secuencias repetitivas (WD repeats). La porción NH<sub>2</sub> se representa como un rectángulo. El área rayada es la zona de  $\gamma$  que determina la especificidad de interacción con  $\beta_1$  o  $\beta_2$ , deducido a partir de ensayos con quimeras de las subunidades  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$  (Spring y Neer, 1994).

### Relación estructura-función de las $G\beta\gamma$

La presencia de una estructura con secuencias del tipo WD repeats, las cuales como ya se dijo previamente, contribuirían al ensamblamiento de complejos macromoleculares, tendría relevancia en dos funciones descritas para el complejo  $\beta\gamma$ .

En un primer lugar, facilita la asociación de  $\alpha$  con los receptores de membrana para formar un complejo ternario receptor /  $\alpha\beta\gamma$ , el cual une al ligando con mayor eficiencia (recopilación de Neer, 1994).

En un segundo lugar, facilita la formación de un complejo que incluye al receptor y a una quinasa específica, que fosforila al receptor unido a su ligando (Pitcher et al., 1992). Por ejemplo, en el caso del receptor  $\beta$ -adrenérgico, la subunidad  $\beta\gamma$  se une a la quinasa  $\beta$ ARK (quinasa del receptor  $\beta$ -adrenérgico-), a través de una región que contiene secuencias homólogas a una proteína de plaquetas llamada pleckstrina (Touhara et al. 1994). Estos dominios, presentes también en otras proteínas, como las proteínas activadoras de la actividad GTPasa de ras, la espectrina y la fosfolipasa  $C\gamma$ , también unen  $\beta\gamma$ , aunque más débilmente que  $\beta$ ARK. La hipótesis que se plantea, sería que los diferentes dominios pleckstrinas interactúen con diferentes miembros de la familia de proteínas "WD repeats" para formar complejos multiproteicos.

### **Puntos críticos de control de las señales que atraviesan la membrana**

#### **Interfaces Receptor- Proteína G- Efector**

Las respuestas a los estímulos externos la mayoría de las veces son muy selectivas. Un ejemplo es el corazón, el cual responde con exactitud a dos señales opuestas. La estimulación de su receptor  $\beta$ -adrenérgico aumenta la velocidad y la fuerza de la contracción, mientras que la estimulación con receptores muscarínicos colinérgicos ejercen el efecto contrario. Cada uno de estos receptores está acoplado a diferentes proteínas G: el  $\beta$ -adrenérgico interactúa con  $G_s$ , mientras que el muscarínico lo hace con  $G_i$ ,  $G_o$  y  $G_q$ . En la célula intacta no parecería existir un entrecruzamiento entre estas vías. Otro ejemplo es la línea celular GH3 derivada de la pituitaria, donde los receptores muscarínicos y el de la somatostatina regulan al mismo canal de  $Ca^{2+}$ , pero cada uno de ellos usa una forma diferente de  $\alpha_o$  y también diferentes  $\beta\gamma$  (Kleuss et al., 1991,1992,1993).

La forma más simple de lograr la especificidad sería que cada tipo de receptor interaccionara con un sólo tipo de proteína G. Sin embargo existen más receptores que proteínas G (Fig 5 ). Por ej.  $G_s$  puede ser estimulada por más de 30 receptores. A su vez un mismo receptor puede activar más de una proteína G. La capacidad intrínseca de activar a estas proteínas por parte de un receptor, puede ser verificada en ensayos de reconstitución en vesículas lipídicas, con los respectivos componentes del sistema purificados.

Cuando se se comenzó con estos ensayos se pensó que quedarían contestadas todas las preguntas respecto de la especificidad de las interacciones. Pero la realidad resultó ser más complicada, ya que estos experimentos demostraron una inesperada falta de especificidad (Asano et al, 1984, Cerione et al. 1985).

En una vesícula lipídica, el receptor  $\beta$ -adrenérgico puede activar tanto a Gs como Gi, aunque la activación de Gs es 2 a 3 veces superior a la activación de Gi. Pero en las células cardíacas, la concentración de Gi es mayor que la de Gs. Además, las subunidades de  $\beta\gamma$  liberadas, tanto de Gs como de Gi podrían activar al canal de  $K^+$ . Todavía no está claro porqué el receptor  $\beta$ -adrenérgico sólo activa la adenilil ciclasa y no los canales de  $K^+$ .

Como ya se expuso al comienzo, las regiones citoplasmáticas de los receptores acoplados a proteínas G son las que determinan la especificidad. Esta especificidad depende no sólo de la presencia de una secuencia de reconocimiento correcta, sino también de la intervención de otras regiones. En ensayos con quimeras de los receptores muscarínicos y  $\beta$ -adrenérgicos se comprobó que la selectividad de estas regiones puede disminuir notoriamente alterando las regiones por fuera de las secuencias de reconocimiento de las proteínas G (Wong y Ross, 1994).

Hay varios ejemplos de receptores que interactúan con más de una proteína G, incluso en células intactas, dando inicio a más de una señal. Por ej. el receptor de la hormona paratiroidea, transfectado en células COS7, se acopla a dos proteínas G de clases diferentes, para activar a la adenilil ciclasa y a la fosfolipasa C. Mientras que el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico transfectado en las mismas células, sólo activa la adenilil ciclasa (Abou-Samra et al, 1992).

El patrón de respuestas celulares puede ser predicho sólo parcialmente, a partir de las propiedades del receptor en vesículas fosfolipídicas. Los efectores, en cambio, discriminan mejor entre las subunidades  $\alpha$  que los receptores: sólo  $\alpha_s$  activa la adenilil ciclasa y sólo  $\alpha_q/\alpha_{11}$  activa PLC  $\beta$ . Al contrario, varios tipos de  $\beta\gamma$  activan por igual a diferentes efectores. Pero si un receptor activado puede a su vez interactuar con varios tipos de proteínas G, la respuesta se extiende a varios efectores. Por lo tanto, la estricta especificidad de la interface efector/proteína G, no puede impedir la amplitud de la señal que comenzó en la interfase receptor/ proteína G. Es claro entonces que otros factores, además del mecanismo "llave-cerradura" del receptor y la proteína G, están jugando un rol importante en la

forma final de la respuesta de la célula a cualquier estímulo externo. Algunos de ellos se discuten a continuación.

### **Cinética**

Las diferentes subunidades  $\alpha$  tienen diferentes velocidades de hidrólisis de GTP (Carty et al., 1990; Linder et al., 1990). Si un receptor activa a dos subunidades  $\alpha$  que tienen un tiempo de vida media del estado de activación muy distinto, una señal desaparecerá muy rápidamente mientras que la otra podría sostenerse y convertirse en la predominante. Estas diferencias intrínsecas pueden ser moduladas por proteínas intracelulares, incluso esta función sería cumplida en algunos casos por los mismos efectores. Se ha demostrado que dos efectores (PLC y fosfodiesterasa de GMPc de la retina) aumentan la actividad GTPasa de su respectiva proteína G activadora (Arshavsky y Bownds, 1992; Berstein et al, 1992). Por lo tanto, aceleran la desactivación de la subunidad  $\alpha$  limitando el tiempo de su propio estado activado. Un efector puede afectar profundamente la hidrólisis de una proteína G pero no la de otra. La regulación recíproca entre las subunidades  $\alpha$  y sus efectores es potencialmente un elemento importante en la especificidad.

La interacción con otras proteínas, podrían modular la habilidad de un efector en particular, de actuar como proteína activadora de la actividad GTPasa. Posiblemente la interacción del efector con la subunidad  $\beta\gamma$  podría tener este efecto.

### **Estequiometría**

Una célula se distingue de la otra por su particular dotación de receptores, subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  y efectores que la misma expresa, aunque esta dotación puede cambiar sustancialmente con el desarrollo o el estado metabólico. La estequiometría precisa entre los componentes puede determinar la vía cuya respuesta será la preponderante.

Cuando se transfectó a las células CHO con el receptor muscarínico M2 de porcinos, la estimulación del recambio de fosfoinositoles resultó ser muy dependiente del número de receptores, mientras que la inhibición de la adenilil ciclasa no se vió especialmente modificada por el número de receptores (Ashkenazi et al., 1987). Este resultado sugiere que en estas células, la inhibición de la adenilil ciclasa está limitada por la enzima o la proteína G,

mientras que la activación de la PLC está limitada por el número de receptores. Por lo tanto, las células que naturalmente tengan menos receptores M2 podrían responder a la acetilcolina sólo con una disminución en los niveles de AMPc, mientras que las que presenten más receptores podrían mostrar ambas respuestas.

### **Detección de coincidencia**

Un detector de coincidencia, es un dispositivo que responde en forma enérgica ante la presencia simultánea de dos señales, pero lo hace pobremente o no lo hace ante cada una por separado. Cuando una sólo molécula efectora es regulada por más de una proteína G, el efector puede actuar como un detector de coincidencia para integrar y modular el impacto relativo de diferentes receptores (Bourne y Nicoll, 1993). La adenilil ciclasa tipo II es parcialmente activada por  $\alpha_s$ , pero sinérgicamente por  $\beta\gamma$ . La activación completa depende de la presencia coincidente de  $\alpha_s$  activada y un exceso de  $\beta\gamma$  (Tang y Gilman, 1991) (Ver también en Adenilil ciclasa - Patrones de regulación y consecuencias funcionales). En un trabajo de Federman y col. (1992) se demuestra que dicho mecanismo podría operar en células transfectadas. En principio una neurona puede contener adenilil ciclasa tipo II, la cual es regulada por  $\alpha_s$  y  $\beta\gamma$ , y otro efector que también se estimula por el receptor  $\beta$ -adrenérgico, pero regulado sólo por una subunidad. Este último puede constituir la respuesta predominante cuando no hay una señal coincidente, pero será menos importante cuando se de la convergencia de múltiples señales.

### **Compartimentalización de las proteínas que intervienen en la transducción de señales.**

En las células intactas, algunos grupos de receptores, proteínas G y efectores, pueden estar organizados en microdominios y no tener acceso a otros sectores, donde se encuentran otros grupos.

Esta organización está ausente cuando se trabaja con vesículas fosfolipídicas e incluso en membranas aisladas. La obtención de membranas aumenta la movilidad de las proteínas de membrana en más de un orden de magnitud (Beth et al., 1986) y puede destruir estos microdominios. Incluso las células transfectadas no son un espejo fiel de la organización en condiciones fisiológicas, ya que la sobreexpresión puede saturar los compartimentos normales y ubicar los componentes de la vía de transducción en lugares anormales.



Estudios funcionales revelan la presencia de "pools" intracelulares de segundos mensajeros como AMPc en células testiculares de Leydig (Dufau et al., 1978), y en miocitos cardíacos (Buxton y Brunton, 1983). Diferentes receptores generan redistribuciones espaciales diferentes en dichas células (Lechleiter et al. 1991). La falta de competición por proteínas G por parte de diferentes receptores, incluso en condiciones donde en las que las concentraciones de proteínas G fueron provocadamente limitantes, es un argumento también a favor de la compartimentalización. Sería de esperar la existencia de dicha competición si todos los componentes se movilizaran libremente (Graeser y Neubig, 1993).

Existen varios ejemplos de distribución asimétrica de receptores y proteínas G. Por ej. en neuritas y células neuronales PC12, la proteína  $G_o$  está altamente concentrada en los conos de desarrollo (Strittmatter et al., 1990). Se ha demostrado, en algunos casos, que las subunidades  $\beta\gamma$  obtienen en fracciones junto con el citoesqueleto (Carlson et al., 1986).

En general existen pocas evidencias acerca de la existencia de microdominios o ensamblajes multiproteicos, que respalden la idea de la importancia de los mismos como estructura estable en los diferentes caminos de transducción de señales. A este respecto, Jahangeer y Rodbell (1993) solubilizaron grandes complejos conteniendo proteínas G y han sugerido que los mismos representan estructuras multiméricas de proteínas G que se disgregarían en monómeros después de la activación.

## Adenilil ciclasa

El concepto de señalización a través de **segundos mensajeros** se originó con el descubrimiento del AMPc (Sutherland y Rall, 1957). Hasta ese entonces existía el convencimiento, por parte de la comunidad científica, que la acción hormonal sólo podía ser estudiada en presencia de una estructura celular organizada. Sin embargo, la obtención por parte de Sutherland, de un sistema libre de células, donde pudo reproducir la síntesis del glucógeno mediada por hormonas ampliamente conocidas, fue la primera demostración de la acción de señales externas (hormonas en este caso) a **nivel molecular**.

El AMP cíclico (AMPc) tiene un rol universal en el control de la expresión de los genes, así como en la integración de las funciones metabólicas, tanto en células eucariotas como procariontas.

Esta ubicuidad explica el gran interés que se desencadenó sobre las enzimas que producen AMPc a partir de ATP, las **Adenilil Ciclasas (AC)**. La literatura existente acerca de los aspectos estructurales de las subunidades catalíticas de las ciclasas fue escasa durante mucho tiempo, debido a que son enzimas muy esquivas, que se sintetizan en muy baja cantidad y son muy inestables durante la purificación. Sin embargo, el clonado relativamente reciente de los genes que codifican para adenilil ciclasas de varios organismos, desde bacterias a vertebrados superiores, ha permitido la identificación de aspectos reveladores concernientes a la estructura de estas proteínas.

Las ciclasas pueden ser clasificadas en tres **clases** bien definidas:

-ciclasas relacionadas con las adenilil ciclasas enterobacterianas (**clase I**);

-adenilil ciclasas tóxicas aisladas a partir de bacterias patógenas (**clase II**);

-un gran grupo que comprende las ciclasas de eucariotas y procariontas, el origen de las cuales podría ser anterior a su separación filogenética (**clase III**).

## **Ciclasas de nucleótidos de purina : aspectos generales de los genes y las proteínas.**

### **Clase I: adenilil ciclasas enterobacterianas**

Después del descubrimiento del AMPc, Mackman y Sutherland demostraron que las células de *Escherichia coli* privadas de glucosa, acumulaban AMPc. Posteriormente Ullmann y Monod establecieron que parte del fenómeno de la represión catabólica era controlada por AMPc. Esta observación dio un fuerte impulso a los estudios que involucraban al AMPc como un mediador de la expresión de los genes. A partir de entonces numerosos experimentos han ido revelando varios aspectos de la síntesis del AMPc y su papel en el control transcripcional en bacterias (Danchin y Ulmann, 1985). Por ej. en *E.coli*, el AMPc se une a una proteína receptora llamada CAP, y el complejo formado activa la transcripción de varios operones relacionados al metabolismo de azúcares (Ullman y Danchin, 1983).

El primer gen reconocido sin ambigüedades como secuencia codificante de una adenilil ciclasa (gen *cya*) fue clonado en 1981. Wang y col. (1981) aislaron de una biblioteca de lambda, un fragmento de ADN de *Salmonella typhimurium* que contenía la mayor parte del gen *cya* correspondiente, mientras que Roy y Danchin (1981, 1982) identificaron el gen *cya* completo de *E coli*, a partir de una biblioteca plasmídica. Posteriormente Aiba y col secuenciaron el gen completo deduciendo que se trataba de una proteína de 862 aminoácidos (1985).

Los trabajos posteriores realizados en otras bacterias inclusive algunas no pertenecientes a las enterobacterias, permite concluir que la estructura tanto de los genes como de la proteína se encuentra bastante conservada en todas las bacterias, especialmente en lo que respecta a su regulación por glucosa.

La clase de las adenilil ciclasas enterobacterianas constituye un grupo de proteínas que comprenden dos dominios funcionales :un dominio catalítico NH<sub>2</sub> terminal y un dominio COOH-terminal regulatorio sensible a la glucosa. Los trabajos posteriores realizados en otras bacterias, inclusive algunas no pertenecientes a las enterobacterias, permite concluir que la estructura tanto de los genes como de la proteína se encuentra bastante conservada en todas las

bacterias, especialmente en lo que respecta a su regulación por glucosa.

El análisis de la regulación de la actividad de adenilil ciclasa sugiere que in vivo esta actividad puede variar en un rango amplio. Se sabe que las células deficientes en el receptor CAP producen 30 a 100 veces más cantidad del nucleótido, la cual no puede ser adjudicada al incremento de la síntesis de la adenilil ciclasa (Ulmann y Danchin, 1983). Esto indica que el extremo carboxilo actúa junto con otros factores, como un inhibidor tónico de la actividad catalítica, la cual bajo condiciones apropiadas exhibe un aumento en su capacidad de síntesis.

Cuando se analiza la cadena polipeptídica de las adenilil ciclasas, se observa la ausencia de un tramo de aminoácidos hidrofóbicos como sería de esperar para una proteína unida a membrana. En realidad las adenilil ciclasas bacterianas tienen una localización fundamentalmente citoplasmática aunque puede aparecer, según los casos, asociada a membranas o en ambas fracciones.

Además de la glucosa, la adenilil ciclasa de bacteria también es regulada por otros nutrientes como fructosa (Gershanovitch, et al. 1989), 2-cetoglutarato (De Crombrughe et al. 1984).

## **Clase II: adenilil ciclasas tóxicas, activables por Calmodulina**

La tos convulsa es una enfermedad causada por la *Bordetella pertussis*, una bacteria Gram negativa que secreta al medio varias proteínas que tienen actividad de toxinas. Dentro de estas proteínas Wolff y Cook, en 1973, reconocieron la presencia de una actividad de adenilil ciclasa. Hewlett y Wolff purificaron un polipéptido del medio de cultivo de la bacteria y caracterizaron parcialmente su actividad demostrando que era expremadamente eficiente en la conversión de ATP en AMPc. En 1980 se hizo la más fascinante e inesperada observación acerca de esta enzima: era activada por una proteína del huésped, la calmodulina, la cual no se encuentra presente en bacterias (Wolff et al. 1980). Dos años más tarde, Leppla demostró que otra adenilil ciclasa tóxica, secretada por un organismo Gram positivo, el *Basillus anthracis*, el agente etiológico del ántrax, también dependía de la activación por parte de la calmodulina del huésped (Leppla, 1982).

A pesar de ser ambas proteínas las adenilil ciclasas mejor conocidas desde el punto de vista bioquímico, tomó varios años antes de que los genes cya pudieran ser clonados (Mock et al. 1988).

La estructura de la adenilil ciclasa de la *Bordetella pertussis* es la de un polipéptido bifuncional de 1,706 residuos aminoacídicos, en el cual los 400 residuos del extremo NH<sub>2</sub>-terminal exhiben la actividad cicladora de ATP activable por calmodulina, mientras que el resto de la molécula contiene el dominio responsable de la actividad hemolítica del patógeno (Glaser, et al, 1991)

### Clase III: la clase “universal”

Es una clase ancestral de ciclasas de nucleótidos de purinas, que comprende tanto adenilil ciclasas como guanilil ciclasas de eucariotas y procariotas. Es una familia con una diversidad de tamaños muy grande, a menudo con más de 100 residuos, pero el dominio catalítico es de sólo 300 a 250 aminoácidos. Esto indica que, como en el caso de las clase I y II el dominio catalítico está ligado a otros polipéptidos que tengan otras funciones probablemente regulatorias. Además de esta cadena regulatoria dentro de la misma molécula, la mayoría de las adenilil ciclasas pertenecientes a la clase III, se asocian a una variedad de subunidades que controlan la síntesis de AMPc, en función del ciclo celular o el estadio de diferenciación de la célula.

En *S. cerevisiae*, existen mutantes del ciclo celular que tienen también afectada la síntesis de AMPc [CYR1 y TSM085]. Como la mayoría de los genes de estos organismos no están interrumpidos por intrones, esto permitió el clonado de ADN cromosomal por complementación directa de las mutantes adecuadas. Masson y colaboradores clonaron el alelo salvaje complementando la cepa TSM085 (Masson et al. 1984) y Wigler y colaboradores determinaron la secuencia completa del gene por complementación directa con la mutante CYR1 de *S.cerevisiae* (Kataoka, et al. 1985).

Esta adenilil ciclasa era completamente diferente de la clase I relativa a las enterobacterias, no sólo por las diferencias en las secuencias de los dominios catalíticos, sino porque la organización del gen era diferente: el dominio catalítico está ubicado en el COOH-terminal en la ciclasa de *S.cerevisiae* (mientras que el mismo se encuentra en el NH<sub>2</sub>-terminal en *E.coli*), y el extremo amino terminal contiene repeticiones de un motivo rico en leucinas que juega un rol

regulatorio (Ross et al 1991). La proteína de levadura era la única en su clase hasta que Garber, Goeddel y colaboradores reconocieron los genes clonados a partir de varios metazoarios, como pertenecientes a guanilil ciclasas que claramente derivaban del mismo ancestro que las adenilil ciclasas de levadura (Chinkers, et al 1989,). Otro miembro de esta nueva clase fue descubierta por Young et al. (1989) al clonar el gen de adenilil ciclasa de *Schizosaccharomyces pombe* por hibridización usando la secuencia del dominio catalítico de *S.cerevisiae* como sonda.

Finalmente, se pudo aislar el primer gen correspondiente a un eucariota superior. Las adenilil ciclasas de eucariotas multicelulares permanecieron muy esquivas por mucho tiempo, debido a la dificultad que presenta la purificación de su correspondiente subunidad catalítica. Las adenilil ciclasas de mamíferos son activadas por el diterpeno forskolina, y el desarrollo de una matriz de afinidad conjugada a forskolina (Pfeuffer et al., 1991) facilitó la purificación de pequeñas cantidades de la enzima, lo que resultó en el clonado de la adenilil ciclasa de cerebro bovino por parte del laboratorio del Dr. Gilman (Krupinski, et al 1989), la cual exhibía aspectos claramente relacionados con las adenilil ciclasas correspondientes a la clase III.

Posteriormente, Beuve y col. (1990) describen un gene de adenilil ciclasa aislado de la bacteria Gram negativa *Rhizobium meliloti* , que también era miembro de esta clase. Esta es una observación muy importante ya que se supone que que los procariotas se separaron de los eucariotas por lo menos hace 2.5 billones de años. A partir de aquí se aislaron y secuenciaron muchos genes o ADN copia de adenilil ciclasa o guanilil ciclasas que pertenecen a esta clase "universal" no sólo de eucariotas (Tabla 1), sino también de procariotas tales como *Corynebacterium liquefaciens* (Peters et al. 1991). Estos resultados respaldan la hipótesis acerca de la presencia de las ciclasas en las células antes de la separación entre eucariotas y procariotas.

**Tabla 1: Adenilil ciclasas de eucariotas (Clase III), clonadas hasta la actualidad.**

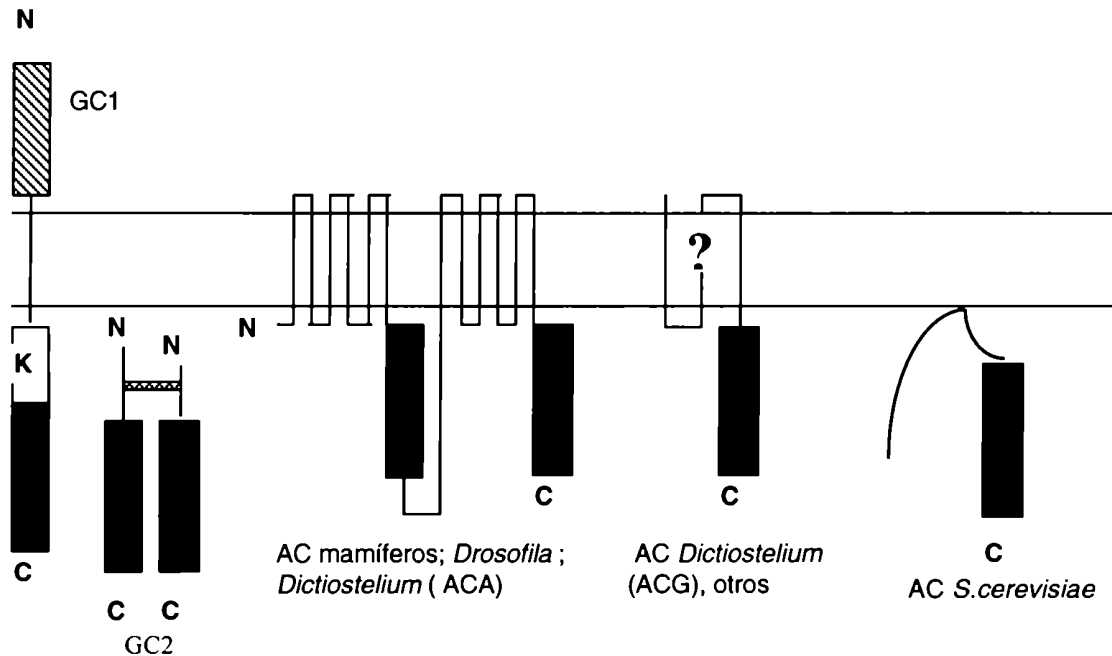
<b>Organismo</b>
<i>S.cerevisiae</i> (CYR1) (Kataoka T. et al., 1985)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Yamawaki-Kataoka Y. et al., 1989)
<i>S. kluyveri</i> (Young D. et al., 1991)
<i>Neurospora crassa</i> (Kore-Eda S. et al. 1991)
<i>Drosophila melanogaster</i> : rutabaga (Levin et al., 1992)
<i>Dictiostellium discoideum</i> (2 genes): ACA y ACG (Pitt G.S. et al. 1992)
<i>Plasmodium falciparum</i> (Read L.K. et al., 1991)
<i>Trypanosoma brucei</i> : ESAG4, GRESAG 4.1 (Pandavoine et al., 1992)
<i>Trypanosoma equiperdum</i> (Ross et al., 1991)
<i>Leishmania donovani</i> : RAC A y RAC B (Sanchez M. et al., 1995)
<b>Mamíferos:</b>
Tipo I (cerebro) (Krupinski J. et al., 1989)
Tipo II (cerebro, pulmón) (Feinstein et al., 1991)
Tipo III (neuroepitelio olfatorio) (Bakalyar y Reed, 1990)
Tipo IV (cerebro, tej. testicular y otros) (Gao y Gilman, 1991)
Tipo V (corazón, cerebro y otros) (Ishikawa et al., 1992)
Tipo VI (corazón, cerebro y otros) (Premont et al., 1992; Katsushika et al., 1992)
Tipo VII (cerebelo) (Krupinsky et al., 1992)
Tipo VIII (cerebro) (Cali, et al., 1994)

### **Organización estructural de las adenilil ciclasas clase III**

El origen tan extendido de las adenilil ciclasas clase III. se refleja en la amplia variación en su organización estructural y su peso molecular. Habitualmente están compuestas por más de 1000 residuos (Krupinsky, 1991), aunque el dominio catalítico está formado sólo por 250 a 300 aminoácidos. Como ya fue citado anteriormente, Garbers, Goeddel y colaboradores encontraron que el centro catalítico de la guanilil ciclasas estaban fuertemente relacionadas con las adenilil ciclasas clase III. En general, la organización de los genes revela en ambos tipos de enzimas, la conservación de la localización de al menos un dominio catalítico en

el carboxilo terminal de la proteína, acoplado a una gran variedad (en largo y en secuencia) de regiones amino terminal. El origen común de las adenilil ciclasas y las guanilil ciclasas sugiere la existencia de una actividad de ciclasa de nucleótido de purina trifosfato ancestral como precursora.

La adenilil ciclasa más pequeña es la de *Rhizobium meliloti* y la de *B.liquifaciens*, las cuales sólo presentan los dominios catalíticos y tienen localización citoplasmática. Las restantes pueden ser agrupadas en tres clases generales de adenilil ciclasas unidas a membranas (Fig 13).



**Fig13:** Las guanilil y adenilil ciclasas clase III varían según su organización topológica. Se han descrito 2 tipos para las guanilil ciclasas, una unida a membrana compuesta por un polipéptido con un sólo tramo transmembrana (GC1) que resulta de la asociación de tres dominios (uno es el receptor de péptido, otro dominio con funciones de quinasa de proteína y un dominio con actividad de guanilil ciclasa, ej.:receptor del factor natriurético), la otra citoplasmática (GC2), es un heterodímero con un hemo como grupo prostético. Las situación de las adenilil ciclasas (AC), es más compleja: pueden presentarse con una estructura correspondiente a las halladas en mamíferos (Ver Fig 2), o con una estructura de un polipéptido con un sólo dominio catalítico acoplado a una diversidad de dominios (por ej. Dictiostelium ACG, S.cerevisiae)



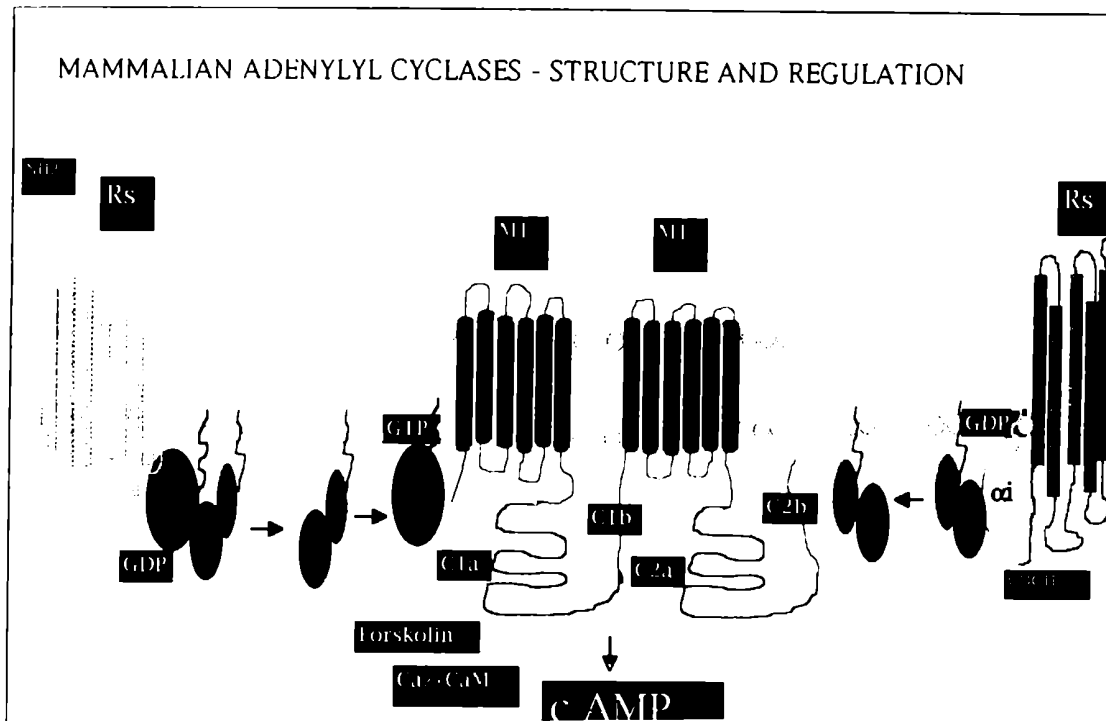
Las adenilil ciclasas de levadura son proteínas periféricas de membrana. Una de las adenilil ciclasas de *Dictiostelium* y aparentemente las correspondientes a los clones aislados en *T. brucei*, *T. equiperdum* y *Leishmania donovani*, presentan un sólo tramo que atraviesa la membrana (una estructura similar a las Guanilil ciclasas unidas a membrana). La estructura de las adenilil ciclasas de mamíferos se detalla a continuación.

### **Estructura de las adenilil ciclasas de mamíferos**

Finalmente la estructura más extendida entre los eucariotas superiores incluye una región citoplasmática NH<sub>2</sub>-terminal corta, seguida por 6 tramos que atraviesan la membrana (M1) y un dominio citoplasmático grande (C1) de unos 40 kDa. Este motivo se repite: un segundo grupo de 6 tramos transmembrana (M2) seguido por un segundo dominio citoplasmático (C2). Se han clonado 10 ciclasas que presentan esta organización: 8 provienen de mamíferos, una es el producto del gen rutabaga de *Drosophila* y el otro es una de las dos ciclasas clonadas en *Dictiostelium* (Tabla 2). Si bien la estructura topológica se encuentra conservada desde *Dictiostelium* a mamíferos, hay dos regiones dentro de los dominios catalíticos, designadas como C1a y C2a en la Fig2, que son las zonas más altamente conservada en lo que respecta a secuencia aminoacídica (93% de identidad entre las adenilil ciclasas de mamíferos). Dicha similitud también se extiende para los dominios respectivos de *Drosophila* (rutabaga) y *Dictiostelium* (ACA). Asimismo los dominios C1a y C2a presentan una alta homología entre sí y con los dominios catalíticos de las guanilil ciclasas de membrana y con los dominios que se encuentran en cada una de las subunidades citosólicas de la guanilil ciclasa heterodimérica (Chinkers y Garbers, 1991) ( Fig 13). Por lo tanto se puede predecir que uno o ambos dominios de la adenilil ciclasa de mamífero son el sitio de catálisis de la síntesis de AMPc.

Este grupo complejo y ampliamente distribuido de adenilil ciclasas, por lo menos en lo que respecta a mamíferos, es el que responde a la regulación estimulatoria e inhibitoria de las hormonas y neurotransmisores, actuando a través de la intermediación tanto de receptores (generalmente con 7 tramos transmembrana) como de las proteínas G (Gilman, 1987) Fig14.

Fig 14



Esta estructura es única para una "simple" enzima. La misma recuerda a la de ciertos canales y transportadores dependientes de ATP, particularmente la Glicoproteína P (resistencia a drogas) y el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística. Esta característica plantea especulaciones acerca del papel de la adenilil ciclasa como un posible canal o transportador, pero aún no existe evidencia que apoye esta conjetura. Sin embargo, es de interés señalar que la adenilil ciclasa de *Paramecium* sería también un canal de K<sup>+</sup> (Schultz, JE et al., 1992), aunque desafortunadamente su estructura todavía no se conoce.

A pesar de las similitudes señaladas más arriba, que llevan a la conclusión que los dominios C1a y C2a representan los dominios catalíticos, no se ha podido detectar una actividad enzimática significativa al expresar cualquiera de estos dominios como proteínas discretas. La misma situación se repite cuando se expresan los dominios completos C1 o C2 o M1C1 o M2C2 (la mitad de la molécula). sin embargo la expresión conjunta de construcciones que codificaban para M1C1 y M2C2 en células Sf9, usando baculovirus recombinantes, permitió la detección de la proteína por inmunoblotting y una cantidad considerable de actividad enzimática que podía ser regulada en una forma tipo específica, por proteína G o calmodulina (Tang, et al 1991). En consecuencia se asume que la interacción entre los dominios C1 y C2 es esencial para la catálisis. Esto es consistente con el hecho de que ninguna de las subunidades por separado de la guanilil ciclasa soluble, es suficiente para la catálisis (Nakane et al. 1990), y que la guanilil ciclasa de membrana es un oligómero (Chinkers et al. 1992). Es también notorio que mutaciones puntuales ya sea en C1a o C2a, afectan severamente la actividad enzimática de la adenilil ciclasa ( con retención de la actividad de unión de Gas), y que la mutación en cualquiera de los dominios puede elevar el Km para los sustratos (Taussig y Gilman 1995). Por lo tanto se puede especular que ambos dominios son capaces de unir ATP. Se desconoce si ambos dominios pueden catalizar la síntesis de AMPc o si uno es el catalizador dominante, mientras que el otro es regulatorio.

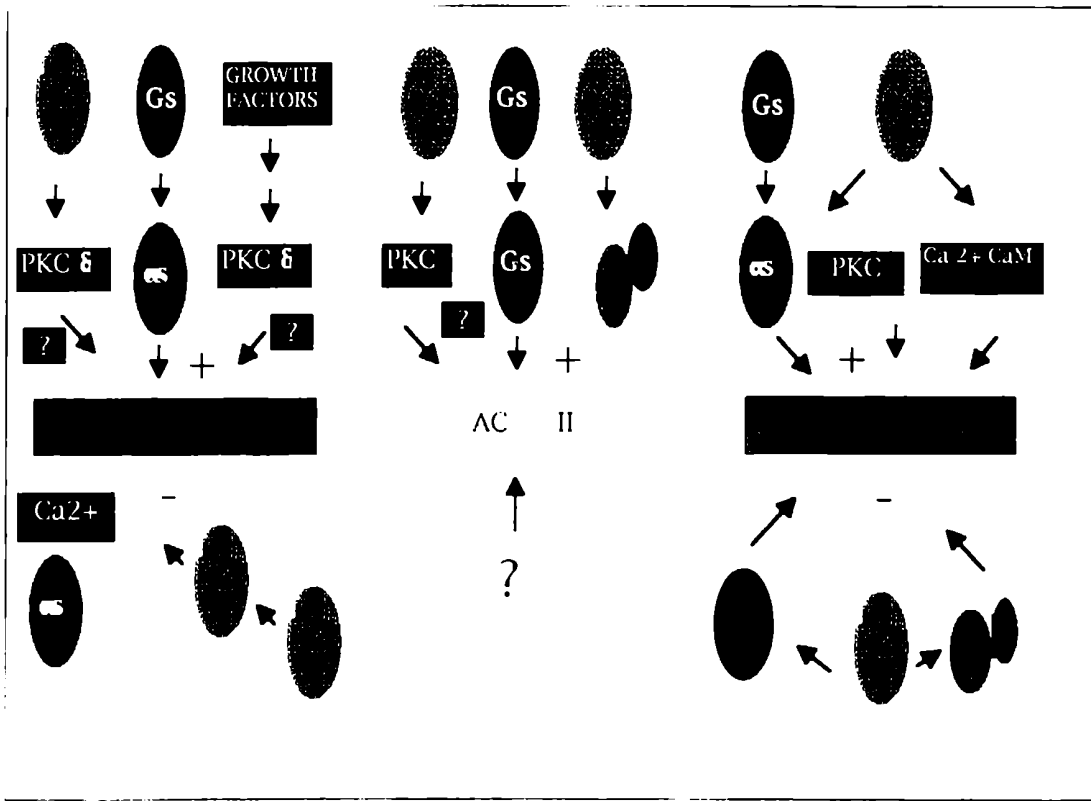
En el último trabajo del laboratorio del Dr. Gilman, lograron la coexpresión de la primera mitad de una isoforma de adenilil ciclasa con la segunda mitad de otra isoforma, creando lo que se ha dado en llamar "quimeras no covalentes". La expresión concurrente de la primera mitad de la adenilil ciclasa tipo I( la cual ha su vez ha sido truncada para remover el dominio C1b) con la segunda mitad de una adenilil ciclasa tipo II (la cual no contiene el dominio C2b), permite obtener una adenilil ciclasa que responde muy bien con forskolina y Gas activada. Por lo tanto los dominios variables C1b y C2b no serían necesarios para responder a estos reguladores (Tang et al. 1995). Los autores asumen a partir de este resultado que G $\alpha$ s interactúa con C1a y/o C2a y quizás regula la interacción entre estos dominios. Un péptido correspondiente a los residuos 495-522 del dominio C1b de la adenilil ciclasa tipo I, une calmodulina e inhibe la actividad enzimática estimulada por ésta ((Vorherr, T et al. 1993). Mutaciones puntuales en esta región también interfieren con la activación de la

adenilil ciclasa por parte de calmodulina ( Wu et al. 1993). El dominio C1b parecería ser un (o él) sitio de interacción de calmodulina con las adenilil ciclasas que son sensibles a esta proteína.

**Regulación de la actividad enzimática de las adenilil ciclasas de mamíferos**

Todas las isoformas de las adenilil ciclasas de mamíferos son activables tanto por forskolina como por la subunidad  $\alpha$  unida a GTP de la proteína G estimuladora (Gs). Todas se inhiben por ciertos análogos de adenosina llamados inhibidores del sitio P. Sin embargo todas la isoformas son posteriormente reguladas de acuerdo a un patrón tipo-específico, por otras señales, particularmente aquellas que dependen de  $Ca^{2+}$  o las provenientes de otras subunidades de proteína G (no  $G\alpha_s$ ). Fig 15

Fig 15



## *Regulación por subunidades de Proteínas G*

La activación de las proteínas G heterotriméricas resulta en la disociación de dos mitades regulatorias, la subunidad  $\alpha$  unida a GTP, y el dímero formado por las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . La regulación de las adenilil ciclasas por acción de las  $G\alpha_s$  ha sido estudiada desde hace bastante tiempo y fue la base del descubrimiento de estas proteínas G. Sin embargo, la interacción directa de otras subunidades de proteínas G con isoformas específicas de las adenilil ciclasas es un dato más reciente.

Smiegel (1986) y Katada y col. (1987), fueron los primeros en notar la inhibición de las adenilil ciclasas de tipo I por parte del complejo  $\beta\gamma$  de la proteína G, aunque en ninguno de estos casos era claro que el efecto se ejercía en forma directa. En realidad, Katada y col. atribuían la inhibición a un "secuestro" de la calmodulin por parte de  $\beta\gamma$ . Posteriormente Tang y col. (1991) notaron una inhibición prominente de la adenilil ciclasa tipo I expresada en células Sf9, y la purificación de la proteína expresada permitió a los autores demostrar la interacción directa de la misma con el complejo de subunidades  $\beta\gamma$  (Taussig et al, 1993).

La inhibición de la adenilil ciclasa por parte de  $\beta\gamma$  está confinada por ahora a las enzimas de tipo I. Notablemente, sin embargo, cuando se probaron los efectos de  $\beta\gamma$  sobre otras isoformas, se observaron sorprendentes efectos estimulatorios sobre las adenilil ciclasas tipo II (Tang y col. 1991) y tipo IV (Gao y Gilman, 1991). Los efectos de  $\beta\gamma$  sólo, eran escasos, pero la magnitud de la estimulación era en cambio sustancial (5 a 10 veces) en presencia de  $G\alpha_s$ . La estimulación de la adenilil ciclasa de tipo II por parte de  $\beta\gamma$  requiere una concentración mayor de  $\beta\gamma$  que de  $G\alpha_s$ , y la fuente de  $\beta\gamma$  sería presumiblemente los oligómeros  $G_i$  o  $G_o$ , los cuales se encuentran en altas concentraciones en el cerebro.

Las proteínas G designadas como  $G_i$  ( $G_{i\alpha 1}$ ,  $G_{i\alpha 2}$  y  $G_{i\alpha 3}$ ), fueron descubiertas como sustratos de la toxina pertusis y por su regulación inhibitoria sobre la actividad de adenilil ciclasa. Sin embargo cuando se experimentó con estas subunidades, resultó muy difícil observar una inhibición sustancial de la enzima por parte de las subunidades  $\alpha$  de estas proteínas. Aún así, Wong y col. (1991) mostraron que la transfección de células con ADN copia que codificaba para una  $G_{\alpha i}$  constitutivamente activada, disminuía las concentraciones

intracelulares de AMPc, sugiriendo que estas proteínas podrían inhibir la actividad de adenilil ciclasa. Ahora se sabe que las fallas para reconstituir la respuesta *in vitro*, era debido al uso de concentraciones inadecuadas de G $\alpha$ i purificadas a partir de sus fuentes naturales, o del uso de G $\alpha$ i no miristoilada obtenida de la expresión en *E. coli*, y/o de efectuar estas pruebas con isoformas que no eran susceptibles a la inhibición por G $\alpha$ i. Cuando se probaron concentraciones adecuadas de las subunidades miristoiladas expresadas en *E. coli*, sobre las isoformas V y VI, se observó una inhibición muy importante de la actividad previamente estimulada con G $\alpha$ s o forskolina. (Taussig et al. 1993, Taussig et al. 1994). Las 3 isoformas de G $\alpha$ i son igualmente potentes y eficaces. Las tres G $\alpha$ i también pueden actuar sobre la isoforma de tipo I, pero el efecto no es tan notorio como el observado con  $\beta\gamma$ . Más aún, la inhibición la adenilil ciclasa de tipo I es inefectiva cuando se analiza sobre la actividad estimulada por G $\alpha$ s, y sólo se observa en presencia de calmodulina o forskolina. La adenilil ciclasa tipo I puede ser inhibida por G $\alpha$ o, mientras que esta subunidad no tiene efecto sobre la isoforma V. Tanto la isoforma I como la V son también inhibidas por G $\alpha$ z, el único miembro de la subfamilia G $\alpha$ i que no es sustrato de toxina pertusis (Kozasa y Gilman, 1995).

### **Regulación por Ca<sup>2+</sup>**

Las variaciones del Ca<sup>2+</sup> intracelular pueden ejercer profundos efectos en las concentraciones celulares de AMPc si están presentes las isoformas de adenilil ciclasas apropiadas. Las tipo I y VII ( y la tipo III en menor medida), se estimulan por concentraciones nomolares de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina, y la concentraciones intracelulares de AMPc se incrementan notoriamente cuando las células transfectadas que expresan estas isoformas son expuestas a la acción de agonistas que elevan el Ca<sup>2+</sup> intracelular. Las otras isoformas (II,IV,V y VI) son insensibles a calmodulina.

Todas las adenilil ciclasas son inhibidas por altas concentraciones de Ca<sup>2+</sup> (100-1000mM) como resultado de la competición por Mg<sup>2+</sup>, el cual es requerido para la catálisis. Por el contrario las isoformas V y VI son inhibidas por bajas concentraciones micromolares de Ca<sup>2+</sup> (Yoshimura y Cooper, 1992, Ishikawa, et al. 1992). Este efecto es independiente de calmodulina y presumiblemente mediado en forma

directa. A continuación de una elevación de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en algunas células intactas, se ha observado inhibición de la acumulación de AMPc (Debernardi et al, 1991, Boyajian, et al. 1991). En algunos casos esto se ha correlacionado con la expresión las adenilil ciclasas de tipo V o VI ( Yoshimura y Cooper, 1992, Ishikawa, et al. 1992, Debernardi et al, 1993).

### ***Regulación por fosforilación***

Los cambios en las concentraciones intracelulares de AMPc como respuesta a reguladores exógenos son altamente dependientes del estado de fosforilación de los componentes del sistema hormona-adenilil ciclasa. Esto es particularmente obvio en el caso de los receptores para ligandos estimulatorios o inhibitorios, los cuales se desensibilizan y se regulan negativamente por fosforilación por parte de varias quinasas de proteínas; estas incluyen a las quinasas de proteína dependientes de AMPc, a la quinasa C de proteínas y a una variedad de quinasas de receptores específicas que tienen como sustrato preferencial al receptor unido a su ligando específico (Dohlman et al, 1991). Aunque existen algunos reportes acerca de la fosforilación de las subunidades de las proteínas G (Danidl-Issakani, et al. 1989), estos son muy escasos. Comienza en este momento a haber disponibilidad de ciertos reactivos para investigar la fosforilación de las adenilil ciclasas.

La posibilidad de una retroalimentación negativa de la actividad de adenilil ciclasa en respuesta a la fosforilación por parte de la quinasa de proteína dependiente de AMPc, es un mecanismo obvio, pero sin embargo la evidencia experimental del mismo es aún muy minoritaria. Su existencia es sugerida por los estudios hechos en hepatocitos de pollo y algunas variantes en la de la línea celular del linfoma S49 (Premont et al, 1992). Estas células tienen varias isoformas de la adenilil ciclasa pero comparten el tipo VI. Esta isoforma contiene dos sitios consensos para la fosforilación por parte de una quinasa de proteína dependiente de AMPc, uno de los cuales también está conservado en la isoforma tipo V (ambas están estrechamente relacionadas).

La potencial regulación de la adenilil ciclasa por parte de la quinasa C de proteína ha sido más extensamente explorada. Existen 3 reportes que indican que la actividad de adenilil ciclasa de tipo II expresada por transfección puede aumentar sustancialmente al

estimular a la quinasa C de proteína (Jacobowitz et al. 1993, Lustig, et al, 1993). Este efecto podría ser indirecto o mediado por una isoforma específica de la quinasa, ya que los intentos de detectar fosforilación de la enzima por el agregado de quinasa C activada han dado hasta ahora resultados negativos.

Kawabe y col (1994) pudieron fosforilar in vitro a la isoforma V usando quinasa C de proteína, demostrando a su vez un incremento en la actividad enzimática. Este efecto fue específico para las isoformas  $\alpha$  y  $\delta$  de la quinasa C, lo que sugiere un mecanismo de entrecruzamiento de señales entre esta adenilil ciclasa y los caminos mediados por Gq (para la quinasa C- $\alpha$ ) y los caminos mediados por los factores de crecimiento quinasa de tirosinas (para la quinasa C- $\delta$ ). A pesar de ser un fuerte estímulo in vitro, el efecto es muy modesto in vivo (Jacobowitz et al., 1993).

Existe menos consenso acerca del efecto de la quinasa de proteína C sobre la isoforma I. Algunos autores han observado un aumento de la actividad de la adenilil ciclasa estimulada con forskolina (Choi, et al 1993) o calmodulina (Jacobowitz et al. 1993,) en respuesta a la activación de la quinasa C, en cambio otros no han podido detectar ningún efecto.

### **Patrones de regulación y Consecuencias funcionales**

Según lo expuesto y como puede apreciarse en la Fig. 15, se observan tres patrones diferentes de regulación de las adenilil ciclasas de mamíferos, los cuales son evidentes para las isoformas I, II, V y VI (los tipos restantes han sido omitidos porque fueron menos estudiados, a pesar de eso el tipo IV sería parecido al II, y el VIII al I).

Como se desprende también de la Fig 3, lo único que se mantiene constante es que todas las adenilil ciclasas unidas a membranas aisladas hasta el momento son activadas por G $\alpha$ s. Con respecto a las otras dos subfamilias de proteínas G cuyo mecanismo de señalización se comprenden al menos parcialmente, se pueden plantear cuatro posibilidades: que tanto Gi como Gq estimulen la actividad de adenilil ciclasa; que ambas inhiban la actividad; que Gi inhiba/Gq estimula; que Gi estimule/Gq inhiba. Tres de estos cuatro posibles patrones se encuentran representados por las cuatro primeras adenilil ciclasas estudiadas en detalle. Aparentemente el



sistema ha ido evolucionando permitiendo un extensa integración y entrecruzamiento de vías, pudiéndose considerar a la adenilil ciclasa como un punto determinado, o un paso final común donde convergen un número muy grande de elementos regulatorios.

Hace cinco años la visión que prevalecía era la de dos tipos básicos de adenilil ciclasas : estimable o no por calmodulina, y ambas inhibidas por Gi. Estos patrones básicos están representados por un lado para la isoforma I y por el por las isoformas V y VI.

Sin embargo el escenario ha cambiado, y para la isoforma I el efecto estimulador del  $Ca^{2+}$  puede provenir de la calmodulina o de la quinasa C de proteína. La inhibición (por lo menos in vitro) puede estar mediada más por  $\beta\gamma$  que por  $G_{\alpha i}$ . Esta isoforma específica de cerebro puede estar inhibida por  $G_{\alpha o}$ , la cual se expresa predominantemente en cerebro. Se especula que el efecto inhibitorio mediado por  $\beta\gamma$ , proviene de la activación de Gi o Go, porque son estas proteínas las que se expresan en mayor concentración con respecto al resto de las proteínas G (particularmente en cerebro), y los efectos  $\beta\gamma$  requieren concentraciones proteicas mayores que las requeridas por  $G_{\alpha s}$  o  $G_{\alpha q}$ .

Estudios de aprendizaje y memoria en varios modelos animales han demostrado un posible rol para la adenilil ciclasa activable por calmodulina( *Aplysia*: Abrams y Kandel 1988, *Drosophila*: Livingstone et al. 1984, mamíferos: Frey et al 1993).

La regulación de la isoforma de adenilil ciclasa tipo II merece especial atención: esta enzima es activada por  $G_{\alpha s}$ ,  $\beta\gamma$  e indirectamente por quinasa C. El efecto de  $\beta\gamma$  depende de la activación concurrente por parte de  $G_{\alpha s}$ . Esta adenilil ciclasa estaría diseñada para detectar activaciones coincidentes provenientes de diferentes señales regulatorias. La capacidad de  $\beta\gamma$  de actuar como un detector asociado depende de su afinidad por la enzima.  $G_{\alpha s}$  activa la adenilil ciclasa a concentraciones picomolares, mientras que la acción de  $\beta\gamma$  es efectiva a concentraciones nanomolares. La liberación, tanto de  $G_{\alpha s}$  como de  $\beta\gamma$  al activarse el oligómero Gs no podría aportar suficiente cantidad de  $\beta\gamma$  para estimular la adenilil ciclasa. La activación por parte de  $\beta\gamma$  podría por lo tanto, estar dependiendo de la liberación de subunidades de otras proteínas G presentes en concentraciones significativamente mayores que las correspondientes a Gs, tales como Gi o Go. Esta regulación podría representar la explicación para un fenómeno extensamente descrito en los años

'70s : la estimulación sinérgica que implicaba una acumulación de AMPc en preparados de cerebro como consecuencia de la estimulación con pares de neurotransmisores o neuromoduladores, los cuales ahora se sabe, son regulados por vía en las que intervienen proteínas Gs y Gi.

### **Regulación de la actividad enzimática de las adenilil ciclasas de eucariotas inferiores.**

*S. cerevisiae*: En vista de la aparente universalidad en la organización de las adenilil ciclasas de eucariotas superiores, fue inesperado descubrir que, a pesar de que la adenilil ciclasa de la levadura *S. cerevisiae* está unida a membrana (Mitts et al 1990) y es dependiente de ATP-Mn<sup>2+</sup> como las adenilil ciclasas de mamíferos, sin embargo no es regulada por Gi o Gs. Por el contrario, otras proteínas que unen GTP, similares al producto del oncogen ras de eucariotas superiores, son las que regulan la enzima de levadura. En *S. cerevisiae* existe una cascada de reacciones que controlan la actividad final GTPasa (que es la que activa en forma directa a la adenilil ciclasa) (Tanaka et al. 1990), e involucran otras proteínas además de las proteínas RAS. Esta variación respecto de los mamíferos, no se repite para la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Engelberg et al. 1990). La función de RAS en otras levaduras no es conocida en profundidad. *S. cerevisiae* contiene dos genes RAS, RAS1 y RAS2, los cuales activan la adenilil ciclasa (Toda et al, 1985). El dominio que responde a la acción de RAS está localizado en la zona con repeticiones ricas en leucinas (estructuras consenso de interacción proteína - proteína) presentes río arriba del dominio catalítico. La interacción con RAS está mediada por una proteína CAP de 70 kDa que se asocia a esta enzima (Field et al, 1990, Fedor-Chaiken et al. 1990). Esta proteína explica por qué las proteínas ras de mamíferos son capaces de estimular la adenilil ciclasa de levadura bajo condiciones en las cuales es incapáz de estimular la adenilil ciclasa de vertebrados (Marshall et al. 1988). En general de los datos experimentales acerca de la regulación de la adenilil ciclasa de *S. cerevisiae* permiten componer el siguiente modelo donde la enzima es dividida en tres dominios funcionales:

- un dominio NH<sub>2</sub>-terminal que ejerce una inhibición tónica de la enzima, la cual puede ser mitigada por RAS;

- un dominio de unión a membrana localizado en la parte central de la proteína;

- un dominio catalítico localizado en el extremo COOH. Si bien la mayoría de los datos experimentales convalidan este modelo, experimentos del grupo del Dr. Bourne sugieren que el modo de interacción de la proteína con la membrana no está aún bien definido.

Esta regulación diferencial respecto de la verificada para mamíferos, no se repite para la levadura *Schizosaccharomyces pombe*.

***Neurospora crassa***: Los estudios en *Neurospora crassa*, muestran que la adenilil ciclasa está débilmente unida a membrana, depende de ATP-Mn<sup>2+</sup>, no es regulable por GTP (Flawiá y Torres, 1972a; Flawiá y Torres, 1972c), y es activable por Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina (Reig, 1984). Experimentos de reconstitución de sistemas heterólogos indican que además de las características mencionadas, la ciclasa de *N. crassa* es capaz de interactuar con factores regulatorios (Rodopsina/transducina - receptor y proteína G del sistema de transducción visual respectivamente-)(Muschietti, et al. 1989). También fue clonado un gen que codifica para una proteína de la familia ras "NC-ras" (Altschuler et al., 1990) , aunque no se ha demostrado que regule la actividad de la adenilil ciclasa.

***Mucor rouxii***: en este hongo, el nivel de AMPc aumenta cuando se alarga el tubo germinal (Cantore, et al. 1980) y cuando se pasa de una atmósfera anaeróbica a una aeróbica, se produce una transición de levadura a forma filamentosa con disminución de los niveles de AMPc (Paveto et al. 1975).

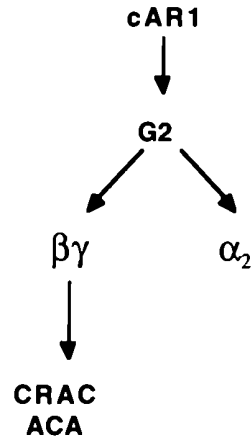
***Candida albicans*** : Se ha reportado la existencia en *Candida albicans* de una actividad de adenilil ciclasa activable por glucagon en presencia de GTP y la caracterización parcial de una proteína G con posibles funciones de Gs (Paveto C, et al. 1990, Paveto C. et al. 1992).

***Dictiostelium discoideum***: En un medio rico en nutrientes, estas amebas crecen en forma exponencial, bajo condiciones en las cuales el alimento es escaso se desencadena un "programa de desarrollo". En los estadios iniciales, el AMPc actuando como una señal extracelular, coordina una compleja coreografía en la cual más

de un millón de células individuales se unen para formar una estructura multicelular. Estos centros de agregación a su vez, secretan periódicamente AMPc, el cual difunde al exterior y actúa como quimioattractante. Las amebas más cercanas también propagan la señal a células más lejanas produciendo y secretando AMPc adicional. Un proceso reversible de adaptación asegura que la señal sea retransmitida hacia el exterior, lo que resulta en ondas concéntricas de AMPc que emanan del centro de agregación (quimiotaxis y agregación). El AMPc también está involucrado en la diferenciación posterior resultante, que culmina con un cuerpo de fructificación que libera esporas (Devreotes P., 1989). Todos los componentes involucrados en estos caminos de transducción están mediados por proteínas G y son altamente homólogos a los descritos para mamíferos. Se han identificado los genes que codifican para cuatro receptores de AMPc (cARs) correspondientes a la familia de los receptores de 7 dominios transmembrana (Klein et al., 1988; Saxe et al., 1991 a,b). Ocho subunidades a de proteínas G (Pupillo et al., 1989, Hadwiger et al., 1991; Wu y Devreotes, 1991; Wu et al., 1994) y una subunidad b (Lilly et al., 1993). Dos adenilil ciclasas (Pitt et al. 1992) y una fosfolipasa C $\delta$  (Drayer et al., 1993). Como ya fue señalado anteriormente, la adenilil ciclasa involucrada en la agregación (ACA) presenta una topología igual a la descrita para las adenilil ciclasas de mamíferos y a su vez está regulada por nucleótidos de guanina. Se sabe que la interacción entre cAR1 y G2 es esencial para los estadios tempranos de desarrollo (Kumagai et al, 1989,1991), mientras que se requiere G4 para las etapas tardías de la diferenciación y para la quimiotaxis mediada por folato (Hadwiger y Firtel, 1992, Hadwiger et al, 1994).

La subunidad  $\alpha$  que activa a la adenilil ciclasa no ha podido ser aún identificada. Más aún, en un trabajo reciente a partir de la construcción de una mutante que no tiene subunidad G $\beta$ , se demuestra que la activación de ACA es mediada por el complejo  $\beta\gamma$ . En las células intactas la subunidad G2 $\alpha$  sería requerida para regular la liberación transiente de  $\beta\gamma$  como consecuencia de la excitación de G2 por parte de cAR1 (Wu et al. 1995). Se requiere a su vez la presencia de un componente adicional, CRAC (regulador citosólico de la adenilil ciclasa), para conferir la regulación por nucleótidos de guanina a la adenilil ciclasa, que cumpliría las funciones de la proteína CAP de levadura (Lilly y Devreotes, 1994). Esta proteína contiene un dominio

homólogo a pleckstrina, los cuales están señalados como posibles sitios de interacción con el complejo  $\beta\gamma$  (Touhara et al. 1994).



### Adenilil ciclasa en la familia Tripanosomatidae

Como ha sido expuesto anteriormente (Tabla 2), se han clonado algunos genes con homología de secuencia con la adenilil ciclasa fundamentalmente de levadura, en tres miembros de esta familia (*T. brucei*, *T. equiperdum*, *L. donovani*).

La actividad de adenilil ciclasa ha sido demostrada en los dos estadios del ciclo de vida de *T. brucei*: (procíclico y sanguíneo). Dichas actividades se corresponderían con los genes ESAG 4 y GRESAG 4.1, donde la actividad correspondiente al estadio sanguíneo es activada por calcio (ESAG 4), mientras que la correspondiente a las formas procíclicas es independiente de esta activación (GRESAG 4.1). Ambas actividades fueron detectadas en la membrana, específicamente en la superficie del flagelo (Pays, et al 1989, Paindavoinis et al., 1992, Rolin et al, 1993).

En *T. cruzi*, la actividad de Adenilil ciclasa medida en membranas en presencia de  $Mn^{2+}$  (da Silveyra, 1977), fue posteriormente caracterizada y purificada a homogeneidad. Un anticuerpo monoclonal obtenido contra esta proteína fue capaz de inhibir las actividades de Adenilil ciclasa en *T. cruzi* y en otros organismos (Torrueala et al, 1986).

Por medio de reconstitución de sistemas heterólogos, se comprobó que la adenilil ciclasa de epimastigotes de *Tcruzi* era capaz de interactuar con factores regulatorios extraídos de membranas de hígado de rata (Eisenschlos, 1986 a). La posterior caracterización de proteínas de tipo Gs y Gi (Eisenschlos, 1986b, Coso et al. 1992), indicarían la presencia de un sistema regulatorio similar al descrito para eucariotas superiores.

## Proteína quinasa dependiente de AMPc

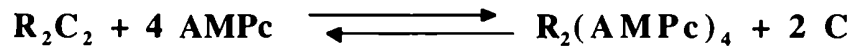
La fosforilación de proteínas juega un rol fundamental en la ejecución y regulación de muchas funciones celulares. Consecuentemente, las enzimas que catalizan la transferencia de grupos fosfatos a sus sustratos específicos han sido objeto de profundo estudio. Si bien la especificidad por un determinado sustrato está dada por una secuencia consenso característica, el sitio aceptor del grupo fosfato es siempre un sólo aminoácido. Esta condición permite agrupar a las quinasas en tres grandes grupos:

- 1- Quinasas que fosforilan Serina/Treonina ( la mayoría de ellas tienen predilección por el sitio serina por sobre la treonina). Ejemplos: quinasas de proteínas dependientes de nucleótidos cíclicos: PKA y PKG que se activan por AMPc y GMPc respectivamente, PKC (quinasa C de proteínas), CaMK (quinasa dependiente de  $Ca^{++}$ -calmodulina), CK (Caseína quinasa), MAPK (quinasas activadas por mitógenos), CDK (quinasa dependiente de ciclinas), CAK (quinasa activadora de CDK), DNA-PK (quinasa de proteínas dependiente de DNA), etc. Dentro de este grupo también se encuentran las ERKs (quinasa regulada por señales extracelulares) un subgrupo de las MAPK, que fosforilan secuencias en un contexto Ser/Tre.
- 2- Quinasas que fosforilan Tirosina. Ej. la familia de las Src, los receptores tirosina quinasa como el receptor para EGF, insulina, PDGF, etc.
- 3- Quinasas que fosforilan Histidinas/Aspártico. Son proteínas que se autofosforilan en un residuo histidina y transfieren el fosfato a un aspártico.

Dentro del primer grupo, como ya se citó, se encuentran la quinasa de proteínas dependiente de AMPc (PKA), que reconoce como sustratos péptidos que contienen dos aminoácidos básicos, fundamentalmente arginina, separados por uno o dos residuos del sitio de fosforilación (comunmente una serina y menos frecuente una treonina) (Toner-Webb y Taylor, 1987).

La PKA es un tetrámero formado por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C). La subunidad regulatoria posee dos sitios de unión de cAMP; la unión del mismo a la subunidad R altera su afinidad por la subunidad C y promueve la disociación de

esta enzima en un dímero de subunidad regulatoria y dos subunidades catalíticas monoméricas activas:



**$R_2C_2$ : Holoenzima inactiva**

**$R_2(\text{AMPc})_4$ : subunidad regulatoria libre**

**C: subunidad catalítica libre activa**

### Subunidad Catalítica (cPKA)

La fosforilación de sustratos por parte de la subunidad catalítica de PKA (cPKA) dispara un amplio rango de respuestas fisiológicas que son controladas por el camino del AMPc. Con la excepción de la quimiotaxis en *Dictyostelium discoidium* (Klein et al., 1988) y la regulación de ciertos canales iónicos (Hockberger y Swandulla, 1987) todos los eventos regulados por AMPc requieren la activación de la PKA.

La subunidad catalítica es una enzima monomérica de 349 aminoácidos (Shoji et al., 1981) y se han podido identificar tres isoformas en tejidos de mamíferos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), todas con aparentemente la misma especificidad de sustrato. Tanto  $\alpha$  como  $\beta$  se expresan en todos los tejidos, aunque  $\beta$  es la isoforma predominante en cerebro. Tienen entre ellas un 93% de identidad en su secuencia aminoacídica. La subunidad  $\gamma$ , que ha sido clonada recientemente se expresa específicamente en testículos.

La subunidad catalítica contiene una región de unos 250 aminoácidos, que es común a todas las quinasas de proteínas, conocida como "núcleo catalítico" (Hanks, et al. 1988), conformado por varias secuencias consenso, que representan dominios característicos involucrados en la catálisis, principalmente el sitio de unión de ATP y el sitio de unión de sustrato y de fosfotransferasa. También presenta modificaciones post-transduccionales en zonas conservadas, que consisten en la miristoilización de la glicina de la región amino terminal y la fosforilación de dos sitios internos.



### **Unión de ATP**

Se ha identificado un sitio conservado de unión a  $Mg^{++}$ -ATP en la porción amino terminal constituido por una tríada de glicinas que formarían un codo alrededor del nucleótido (Taylor et al., 1990; Hanks et al., 1988) localizada 20 residuos antes de la lisina 72(invariable) que interacciona con el  $\gamma$ -fosfato del ATP (Zoller, M. J. et al. 1979).

### **Unión de sustrato y actividad de fosfotransferasa**

Se ha demostrado la participación de el residuo Glu 170 y un grupo de 6 residuos ácidos en el extremo carboxilo de la molécula, que participan en el reconocimiento del sustrato. (Buechler, JA. y Taylor, S.S. , 1990), donde el rol de la Glu 170 es la interacción directa con el lado básico del péptido sustrato. Se ha propuesto un rol similar para la Glu 332 (Taylor et al. 1990). También intervendrían en el reconocimiento otros residuos como la cisteína 199 y la treonina 197(Mobashery y Kaiser, 1988).

### **Modificaciones post-traduccionales**

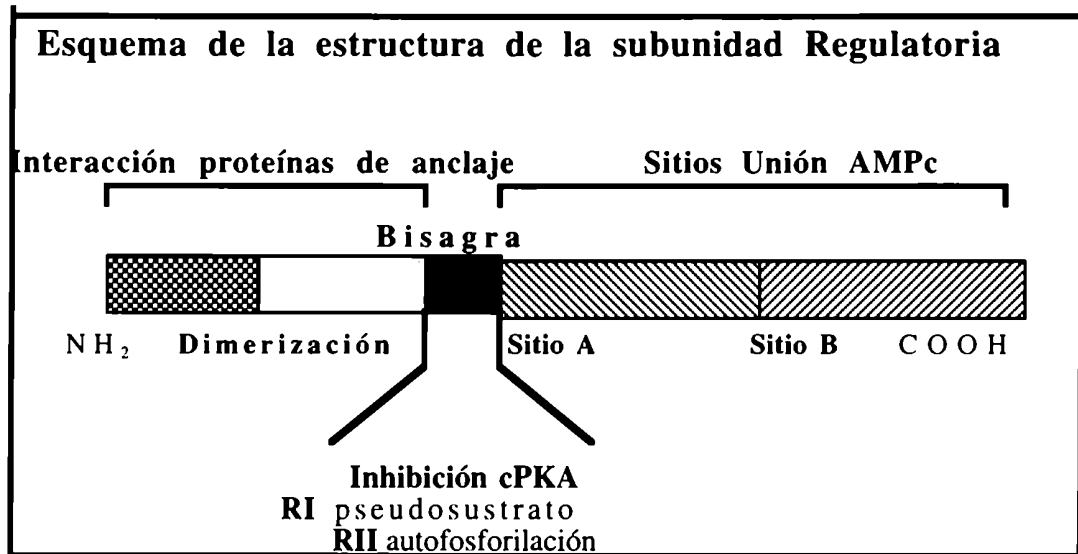
La cPKA presenta dos sitios de autofosforilación muy resistentes a las fosfatasa (Shoji et al. 1983). Estos sitios son la Ser 339 y la Thr 197

El rol de la fosforilación de la Ser aún no está claro, sin embargo el de la Thr es importante para la interacción con la subunidad R (Levin, LR et al , 1990) y jugaría un rol crítico para la activación de la subunidad C (Steinberg, R et al., 1993)

Otra modificación importante en la cPKA es el agregado de un grupo N-tetradecanoil (miristilo) en su amino terminal (Beeke y Corbin, 1986; Shoji et al, 1983) cuya función no es esencial para la actividad biológica. (Clegg et al., 1989). Más aún la subunidad catalítica recombinante expresada en *E.coli* es activa esté o no miristoilada (Duronio et al., 1990). Posiblemente la miristoilización de la subunidad catalítica en conjunto con el anclaje de la subunidad regulatoria, promueve la correcta localización de la PKA.



correspondientes a la zona carboxilo terminal son dos secuencias repeditas en tándem, que son el producto de una duplicación génica, y se pliegan para formar los dominios de unión del AMPc (Weber et al. 1982; Titani et al., 1984).



### Localización subcelular

La localización de la PKA está dirigida por la subunidad R (Sarkar et al. 1984). Aunque ambas isoformas son citoplasmáticas, algunos tejidos contienen más del 75% del tipo RII en forma particulada, asociada ya sea a la membrana plasmática, componentes del citoesqueleto, gránulos secretorios, o membranas nucleares.

La localización de la RII está dada por la asociación de esta subunidad con proteínas específicas denominadas “proteínas de anclaje” o “AKAPs” (A Kinase Anchoring Proteins) (Scott, et al. 1994; Coghlan, et al. 1993; Carr, et al. 1991). Se cree que la función tejida específica está dada por esta localización subcelular a través de las proteínas de anclaje, lo que haría que los sustratos fueran más accesibles a la quinasa. Se ha demostrado que varias de las proteínas identificadas como de anclaje para la RII, son sustrato de la PKA, por lo tanto estas proteínas tendrían un rol muy importante en la transducción de señales por AMPc.

## **Inhibición de la subunidad catalítica (hipótesis del pseudosustrato)**

Como ya se indicó la función principal de la subunidad regulatoria es la inhibición de la subunidad catalítica en ausencia de AMPc. La región principal esencial para la interacción con la subunidad catalítica, es la región conocida como "bisagra", que está ubicada entre los residuos 90 y 100 en la subunidad regulatoria. Esta zona es sensible al clivaje proteolítico, en particular a la tripsina. Esta región está protegida del ataque proteolítico cuando la R forma parte de la holoenzima. Por modificación de las argininas de RII con 2,3-butanodiona, se demostró que estos residuos eran importantes en la interacción con C (97). Por otra parte, las secuencias presentes en esta región resultaron semejantes a las presentes en los sustratos que son fosforilados por la subunidad C (98). La subunidad RI posee en esta región una secuencia de pseudosustrato o pseudofosforilación Arg-Arg-Gly-Ala/Gly-Ile-Ser en la cual la Ser que es fosforilable está reemplazada por una Ala o Gly. La RII tiene un sitio para la autofosforilación en la secuencia Arg-Arg-Val-Ser-Val-Cys. La autofosforilación de la serina reduce unas 10 veces la afinidad de R por cPKA(84).

Además de la subunidad regulatoria, la subunidad catalítica puede ser inhibida por la proteína inhibitoria termoestable PKI, la cual posee un sitio de pseudofosforilación como la RI, y es un inhibidor competitivo con respecto a los péptidos sustratos (101,102). Esta inhibición no es revertida por AMPc.

## **Sustrato universal de la PKA**

La PKA fosforila muchas proteínas. Aunque los sustratos muestran poca similitud, deben tener alguna estructura en común que es reconocida por el sitio activo de la PKA. Kemp (1975) estudiando variantes de la  $\beta$ -caseína, tuvo la primera evidencia de la importancia de la estructura primaria en la región de la serina fosforilable y no la estructura tridimensional del sustrato como se especulaba con anterioridad. Posteriormente se identificó a la piruvato quinasa como sustrato de la PKA y finalmente que un fragmento de esta enzima obtenido con bromuro de cianógeno, era mejor sustrato aún que la proteína completa. (109). Cuando se determinó la secuencia de aminoácidos de la piruvato quinasa de

hígado porcino y de rata, fue posible sintetizar péptidos que resultaron ser excelentes sustratos, con valores de  $K_m$  de 4,7 mM, en el orden de la concentración de la piruvato quinasa in vivo. Se definió así un heptapéptido con una secuencia consenso (Kemp et al. 110) que se denominó Kémptido y que se utiliza como sustrato universal para la PKA.

**Secuencia del Kémptido : Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly**

### **PKA en Eucariotes Inferiores**

En *Sacharomyces cerevisiae* existen tres genes que codifican para la subunidad cPKA: TPK1, TPK2, TPK3, mientras que uno solo codifica para R de tipo II: BCY1 (Toda et al, 1987). En esta levadura el AMPc juega un rol crítico en la progresión del ciclo celular (Matsumoto et al. , 1983). También han sido clonadas PKA en *Dictiostelium discoideum*, *Drosophila* y *Caenorabditis elegans*, todas de tipo I.

En epimastigotes de *T.cruzi* de un aislamiento humano de Venezuela se detectó una proteína de unión a AMPc, y que no coeluye con los picos de actividad quinasa en DEAE-celulosa (Rangel-Aldao et al, 1983). En epimastigotes de la cepa infectiva Tul2 de *T. cruzi* se caracterizó una actividad de PKA de tipo II, donde se reconoció por anticuerpos policlonales dirigidos contra la subunidad RII de corazón bovino, un péptido de 56 kDa que era capaz de autofosforilarse (Ulloa et al. 1988), y se purificó a homogeneidad la cPKA de peso molecular aproximado de 40KDa, que fue reconocida por el anticuerpos policlonales dirigidos contra la subunidad catalítica de mamíferos (Ochatt, C et al. 1993). Estos datos indican que la PKA de *T. cruzi* es un tetrámero con una estructura  $R_2C_2$  de aproximadamente 200kDa.

## Organismo en estudio: *Phytomonas*

### Historia

El descubrimiento de los protozoarios de la familia Trypanosomatidae que parasitan plantas ocurrió por casualidad en 1909, en la misma época en que Carlos Chagas publica en Brasil sus importantes contribuciones relativas al *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad que este desencadena.

Este descubrimiento está íntimamente ligado a otro tripanosomatideo, el *Trypanosoma evansi*, agente etiológico de la "surra" en equinos y bovinos que había invadido la isla Mauricio, en el Océano Indico. El Dr. Lafont, oficial médico de las tropas coloniales francesas, era director del laboratorio de Bacteriología en la isla, y a inicios de 1909 estaba interesado en estudiar el latex de plantas laticíferas, empleadas comunmente en medicina popular. La presencia de abundante almidón en el latex, le hizo pensar que este podría ser un buen medio de cultivo para microorganismos, y encargó a su asistente David que examinara el latex de estas plantas en busca de microorganismos móviles.

A fines de abril de 1909, David examina al microscopio una gota de latex de *Euphorbia pilulifera* y reconoce la presencia de un protozoario alargado, de 20 mm de largo por 2 mm de ancho, con un único flagelo de 11 a 15 mm y un núcleo y kinetoplasto típicos.

Lafont identifica al protozoario como *Leptomonas davidi*, en honor a su descubridor (Lafont, 1909).

También en 1909, con la publicación del trabajo de Lafont, Donovan en la India, confirma la infección de *E. pilulifera* en Madras y sugiere el nombre de *Phytomonas* para los tripanosomatideos que parasitan plantas (Donovan, 1909).

La búsqueda de plantas laticíferas infectadas se intensifica rápidamente y varios investigadores comienzan a encontrar estos parásitos en Africa, Asia, Europa, Oceanía y América. Pero estas investigaciones eran todas realizadas por médicos, veterinarios y otros investigadores ligados a protozoología animal, los cuales trataban de comprobar la atractiva hipótesis de que las plantas fuesen los reservorios naturales de las leishmanosis y tripanosomiasis. Recién 15 años después del primer descubrimiento, comienzan a surgir los primeros trabajos realizados por botánicos o fitopatólogos.

En 1927, Aragao en el Inst. Oswaldo Cruz, describe en Brasil la presencia de parásitos en una euforbiacea de interes económico, la mandioca (*Manihot palmata*) y les da el nombre de *Leptomonas francai*.

En 1931, Stahel, un médico holandés que trabajaba en Suriname, describe en las plantas de café con síntomas de necrosis del floema del café, la presencia de parásitos en los vasos conductores de savia, representando el primer descubrimiento de flagelados en plantas no laticíferas y también la primera asociación a una patología bien definida (Stahel , 1931). A pesar de la importancia económica de lo hallado, ya que todos los cafetales de Suriname eran diezmados por esta afección, este descubrimiento no tuvo la menor repercusión, probablemente debido a la declinación del cultivo del café en este país.

En 1957, Gibbs describe en Africa un tripanosomatideo que parasita exclusivamente a los frutos del tomate (*Lycopersicum sculentum*) dándole el nombre de *Leptomonas serpens*.

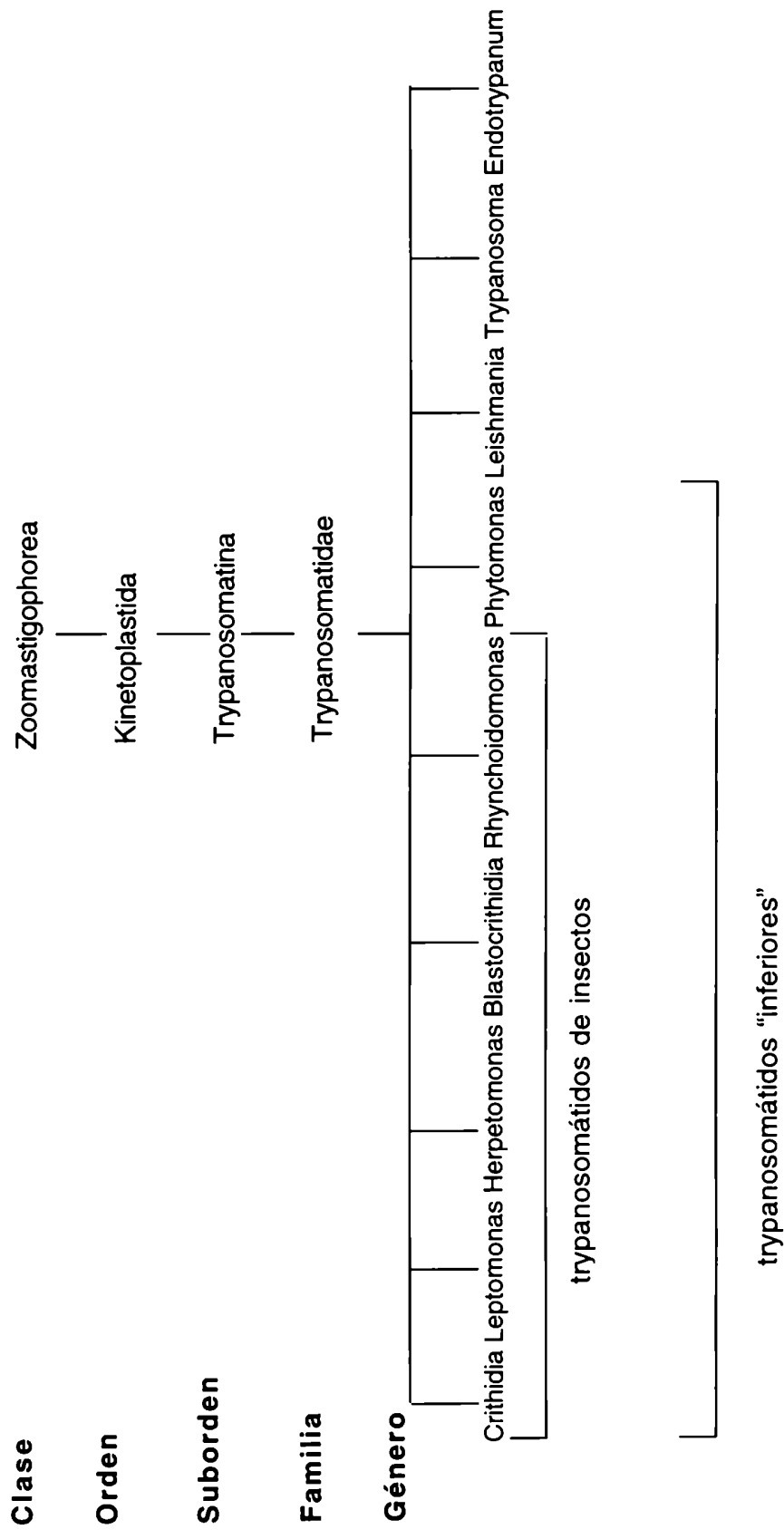
En 1964 McGhee *et al.* describe el ciclo de vida de un flagelado de una planta de la flia. de las Asclepiadeaceas, marcando las diferencias entre el ciclo de la *Phytomona* en el huesped insecto respecto de otros tripanomátidos en el mismo huésped.

Fue recién en 1976, con los trabajos de microscopía electrónica de Parthasarathy *et al.* utilizados en la visualización de micoplasma, imputado como agente etiológico de una afección fatal ("lethal yellowing" o "hartrot") del cocotero (*Cocos nucifera*) en Suriname, cuando se demostró la presencia de organismos flagelados en las placas cribosas de las plantas afectadas y no en la sanas. Estos protozoarios despertaron el interés de los agrónomos y se comenzó a demostrar su papel patogénico en otras enfermedades vegetales como la "marchitez sorpresiva" de la palma aceitera (Dollet *et al* ,1977)

A partir de esta época los trabajos con *Phytomonas* se intensificaron y el interés en este área va en aumento.

Es así que, a partir de 1982 para los trypanosomas del latex, y desde 1988 para los que se encuentran en el floema, comenzaron los estudios de caracterización y diversidad de las *Phytomonas*, género que por agrupar organismos biológicamente diferentes está discutido como tal, pero en vista de no poder aún hallar una clasificación mas adecuada agrupa en general a los tripanosomas de plantas.

Fig.18: Clasificación actual de los diferentes géneros de Trypanosomatidae según Molyneux y Ashford (1983)





## Los Tripanosomas

Los Tripanosomatidae son protozoarios uniflagelados que combinan una morfología relativamente uniforme con una habilidad para parasitar un rango muy diverso de huéspedes incluyendo animales, plantas superiores y otros protistas. Dentro de sus respectivos huéspedes pueden sufrir complejos ciclos de multiplicación y desarrollo.

Existen 9 géneros reconocidos dentro de la familia Trypanosomatidae de los Protozoos flagelados, orden Kinetoplastida. Las especies de este género pueden tener 1 o 2 huéspedes.

Los géneros heteroxénicos (con 2 huéspedes) son : *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* y *Phytomonas*. Los primeros 3 son parásitos de insectos hematófagos y vertebrados. La especie *Phytomonas* son parásitos de insectos fitófagos y plantas.

Los géneros monoxénicos (de un solo huésped) son : *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* y *Rynchoi domonas*. Son principalmente parásitos de insectos pero también se los puede encontrar en gusanos e incluso en protozoarios.

Muchos autores incluyen a los géneros monoxénicos con el de *Phytomonas* en un grupo informal llamado "trypanosomatidos inferiores" sin atribuir a la denominación ninguna connotación filogenética. (Fig 18. con la clasificación actual de los diferentes géneros de Tripanosomatidae según Molyneux & Ashford [1983])

La familia Tripanosomatidae constituye un grupo separado de todos los demás eucariotas por las siguientes características distintivas (Vickerman K. 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. Intern. J. Parasitol. 24: 1317-1331.):

1 - Una única y gran mitocondria, habitualmente ramificada y extendida desde una punta a la otra de la célula, con un kinetoplasto (masa de DNA mitocondrial -kDNA-) localizada cerca del aparato flagelar. La activación y represión mitocondrial puede ser un carácter distintivo del ciclo de vida de los tripanosomátidos (Vickerman 1985). Por ejemplo en las formas sanguíneas de *T. brucei*, la mitocondria está reprimida porque el metabolismo energético es vía glicólisis, en cambio al pasar al estadio en la mosca tsetse, la glicólisis es menos importante y el tripanosoma cambia su metabolismo para utilizar la fuente energética que está disponible en su nuevo huésped insecto (el aminoácido prolina). Para eso el sistema mitocondrial de la prolina oxidasa y la cadena respiratoria se tienen que activar y la

gran mitocondria se transforma en una estructura mas elaborada con discos cristalinos que reemplazan los túbulos cristalinos presentes en el estadio sanguíneo no multiplicativo, por lo tanto al activarse la mitocondria el parásito está listo para desarrollarse en el insecto (Vickerman, K. 1985 Developmentla cycles and biology of pathogenic trypanosomes. British Medical Bulletin 41:105-114). La habilidad para utilizar tanto azúcares como aminoácidos como fuente de energía es una característica de muchos tripanosomas y probablemente sea la clave en su adaptabilidad para colonizar diferentes huéspedes.

El kinetoplasto de los tripanosomas está organizado como una red de miles de círculos topológicamente entrecruzados de tamaños diferentes. Aproximadamente 50 son maxicírculos (20-38 kb), que codifican para ARNs ribosomales de la mitocondria y ciertas subunidades enzimáticas también mitocondriales; estos círculos se corresponden con el DNA mitocondrial de otros eucariotas y son homogéneos en cuanto a su secuencia nucleotídica. Los minicírculos son muchísimo mas numerosos (5-10 x 1000) tienen una tamaño de 0.4 -2.5 kb, son heterogéneos en su secuencia nucleotídica y son los responsables de la producción de "ARNs guías" : pequeñas moléculas de ARN que pueden servir como moldes para guiar inserciones y deleciones de nucleótidos de uridina en los transcritos de los maxicírculos (Simpson & Shaw, 1989; Benne, 1990). Este proceso de corrección del ARN (RNA editing) representa una forma única y distintiva de manejar la información genética por parte de los kinetoplastos. Por otra parte, existen evidencias acerca de que la regulación de este proceso produce ARNm distintos en diferentes condiciones, por lo tanto el RNA editing puede ser visto como una forma primitiva de regular la expresión génica (Stuart & Feagin, 1992). La pérdida de los maxicírculos o la desorganización del kinetoplasto (diskinetoplasia) resulta en la pérdida de la habilidad de activar la mitocondria en forma cíclica y es habitualmente letal.

2- Glicosomas: es un peroxisoma modificado presente únicamente en los kinetoplastos, en el cual se hallan las enzimas intervinientes en la primer parte de la glicólisis rodeadas de una membrana de 6nm pero que no tiene DNA propio (Opperdoes 1991). Esta compartimentalización de la cadena glicolítica permite a las formas sanguíneas mulplicativas de *T. brucei* - las cuales dependen por completo de la glicólisis para su producción energética- llevar a cabo

este proceso en una forma mas eficiente que las células eucariotas convencionales, eliminando directamente al flujo sanguíneo del huésped el piruvato producido. Estas organelas pueden cambiar su forma durante el transcurso del ciclo de vida ( por ej. de esféricas a baciliformes) (Vickerman, 1985) . Los kinetoplástidos se caracterizan por una notable ausencia de reserva de carbohidratos.

Además de las 7 primeras enzimas de la cadena glicolítica, se ha demostrado la presencia de fosfomanosa isomerasa, las últimas dos enzimas del camino biosintético de la pirimidina, adenilato kinasa, malato deshidrogenasa y fosfoenol piruvato carboxiquinasa. Esta organela también se encuentra involucrada en la síntesis de éteres lipídicos (Opperdoes F, 1987)

3 - Uso del bolsillo flagelar (invaginación de la superficie que rodea la región proximal del aparato flagelar) para la entrada y salida de moléculas de la célula (Webster & Russel 1993). La naturaleza de este tráfico puede variar durante el ciclo de vida. Se ha demostrado la existencia de endocitosis mediada por receptores en algunos tripanosomas, por ej. las formas sanguíneas de *T. brucei* endocitan LDL y transferrina (Coppens, Opperdoes, Curtoy & Baudhuin) y en amastigotes de *Leishmania mexicana* se ha demostrado la entrada de  $\beta$ - glucuronidasa y partículas de dextran desde la vacuola parasifora hacia los lisosomas secundarios, a través también del bolsillo flagelar (Russel, Xu & Chakraborty, 1992). Las VSG se agregan a la membrana plasmática en el interior del bolsillo flagelar en *T. brucei* (Webster & Russell 1993). Así mismo se ha demostrado la secreción al medio de fosfatasa ácida desde el bolsillo flagelar, las cuales han sido estudiadas en profundidad en los casos de *Leishmania donovani* (Bates & Dwyer 1987) y en *L. mexicana* (Ilg, Sierhof, Wiese & McConville, 1994). También existen una serie de enzimas solubles que serían secretadas al medio presumiblemente a través del bolsillo, algunas de ellas relacionadas con la utilización de sustratos por ej. la secreción de sacarosa en *L. donovani* podría ser una adaptación para la utilización de este azúcar presente en el nectar (Blum & Opperdoes, 1994) y en *Phytomonas* cultivadas a partir de *E. characias* se ha demostrado la secreción de enzimas degradantes de celulosa, almidón y pectinas (Sanchez Moreno et. al. 1992).

Se ha detectado la presencia de un citostoma y citofaringe (intervinientes en el proceso de ingestión) a lo largo del bolsillo flagelar, en algunos trypanosomatideos.

4- Uso del aparato flagelar para locomoción como respuesta a determinados estímulos y como anclaje a superficies del huésped (Vickerman & Tetley, 1990). Este anclaje puede jugar un rol crítico no solo en prevenir la expulsión por parte del huésped sino también en iniciar la diferenciación del estadio metacíclico en el ciclo de vida del parásito digenético, ya que se han detectado cambios en la superficie del flagelo en determinados estadios del ciclo que dan lugar a complejos de unión especiales entre el parásito y el huésped.

5- Un citoesqueleto de microtúbulos corticales que permanece intacto a lo largo del ciclo celular (Sherwin & Gull, 1989). Estos microtubulos son resistentes al frío y a la colchicina, y los nuevos, correspondientes a células postmitóticas no se originan de centros organizadores, sino que se intercalan entre la red preexistente; la polimerización de tubulina estaría nucleada por interacciones laterales con proteínas asociadas a los microtúbulos. El citoesqueleto microtubular juega un rol importante en la morfogénesis (Mathews & Gull, 1994) de los diferentes estadios del ciclo de vida (promastigotes, amastigotes, choanomastigotes, opisthomastigotes, endomastigotes, epimastigotes y trypomastigotes).

6- Las moléculas que recubren la superficie de los tripanosomátidos son glicoproteínas o glicolípidos insertados dentro de la capa externa de la membrana plasmática por un ancla de glicosil fosfatidil inositol (GPI), siendo escasa la presencia de proteínas transmembranas ; la situación inversa ocurre con las células de mamíferos. Varios de estos glicoconjugados cumplen funciones específicas mientras que otros simplemente contribuyen al glicocalix protector de la superficie (Ferguson, 1994). Por ej.:- las glicoproteínas variables de superficie en *T. brucei* (VSG) las cuales protegen al parásito de la fagocitosis y son las responsables de la estrategia evasora frente a la respuesta humoral del huésped; - Lipofosfoglicanos (LPG) en *Leishmania*, que son importantes para la unión del promastigote a la pared del estómago del vector, otorgarles resistencia a los estadios metacíclicos y unirse a los macrófagos; - la glicoproteína anclada por GPI que tiene actividad trans-sialidasa sobre los tripomastigotes en *T. cruzi*, la cual transfiere residuos glicoconjugados del huésped hacia la superficie del parásito y que estaría implicada en la resistencia de este estadio a la respuesta inmune del huésped (evasión de la vacuola

parasitófora) y posiblemente en la liberación del tripomastigote metacíclico del intestino del vector para permitir la transmisión de la infección (Schenkman & Eichinger, 1993).

7- Un núcleo con un nucleolo central y un gran número de cromosomas (mas de 100 en algunos trypanosomas), que no condensan durante la mitosis (solo pueden detectarse y caracterizarse por electroforesis de campo pulsado) y que contienen unidades transcripcionales policistrónicas, cuyos transcritos son sometidos al proceso de trans-splicing. Este proceso consiste en que una molécula de ARN (codificada por el gen SL -spliced leader-) dona un segmento de 39 pares de bases que corona el extremo 5' de todos los ARN nucleares. Este segmento es lo que se conoce como mini-exón, siendo la secuencia que va del nucleótido 20 al 39 prácticamente invariable en todos los kinetoplástidos (Pays 1993).

Se puede concluir que gracias a los aspectos organizacionales señalados, los tripanosomas pueden sufrir variaciones moleculares sustanciales que les permiten adaptarse a diferentes habitats en huéspedes distintos, sin que implique un cambio morfológico muy notable.

### **El género de los tripanosomátidos inferiores**

Se define a los géneros agrupados como "triplanosomas inferiores" según su ciclo de vida y las formas de desarrollo que presentan. Estas formas se definen en función de la forma del cuerpo celular y organelas accesorias y la posición relativa del kinetoplasto y núcleo correspondientes a la flia. Tripanosomatidae.

Estas son:

1- Promastigotes: con un cuerpo celular fino en el cual el flagelo emerge desde un kinetoplasto anterior al núcleo.

2- Opistomastigote: también delgado pero con un kinetoplasto posterior al núcleo, flagelo que nace cerca de este, pasando a través del cuerpo y emergiendo del extremo anterior.

3- Amastigotes: formas redondeadas o elongadas que no presentan flagelo externo.

4- Epimastigote: con un kinetoplasto anterior, con el flagelo que se encuentra cerca del kinetoplasto y emerge desde el costado del cuerpo corriendo a lo largo de la superficie acompañado por una membrana ondulante hasta la punta anterior a partir de la cual se extiende como flagelo libre.

5- Tripomastigotes: forma elongada con kinetoplasto posterior al núcleo, flagelo que nace cerca de él y emerge desde el costado del cuerpo y corre a lo largo de la superficie acompañado por una membrana ondulante hasta la punta anterior a partir de la cual se extiende o no como flagelo libre.

6- Choanomastigote: con una forma del cuerpo celular similar a un grano de cebada, en el cual el kinetoplasto es anterior al núcleo pero en el cual el flagelo emerge desde un reservorio con forma de embudo que se abre en el extremo anterior.

7- Esferomastigotes: formas redondeadas con flagelo libre.

Además de estas formas principales, se han descrito muchas variaciones: paramastigotes (kinetoplasto paralelo al núcleo); endomastigotes (opistomastigotes con un canal intracelular largo del cual emerge el flagelo) y un aún sin nombre choanomastigote con el kinetoplasto posterior al núcleo.

Es así que *Critidia* presenta la típica forma choanomastigote y parasita invertebrados, *Leptomonas* promastigotes que parasitan también invertebrados, *Herpetomonas* presenta la forma promastigote después de atravesar una fase en la forma opistomastigote y parasitan insectos, *Blastocrithidia* epimastigotes que parasitan invertebrados, *Rinchoidomonas* tripomastigotes que parasitan insectos. Algunas especies de *Leptomonas* y *Blastocrithidia* producen esporas. Los trypanosomas hallados en plantas presentan por lo menos tres formas: promastigotes (la mayoría), amastigote, y choanomastigote. Fig 19 ( de Vickerman 1976)

Fig. 19

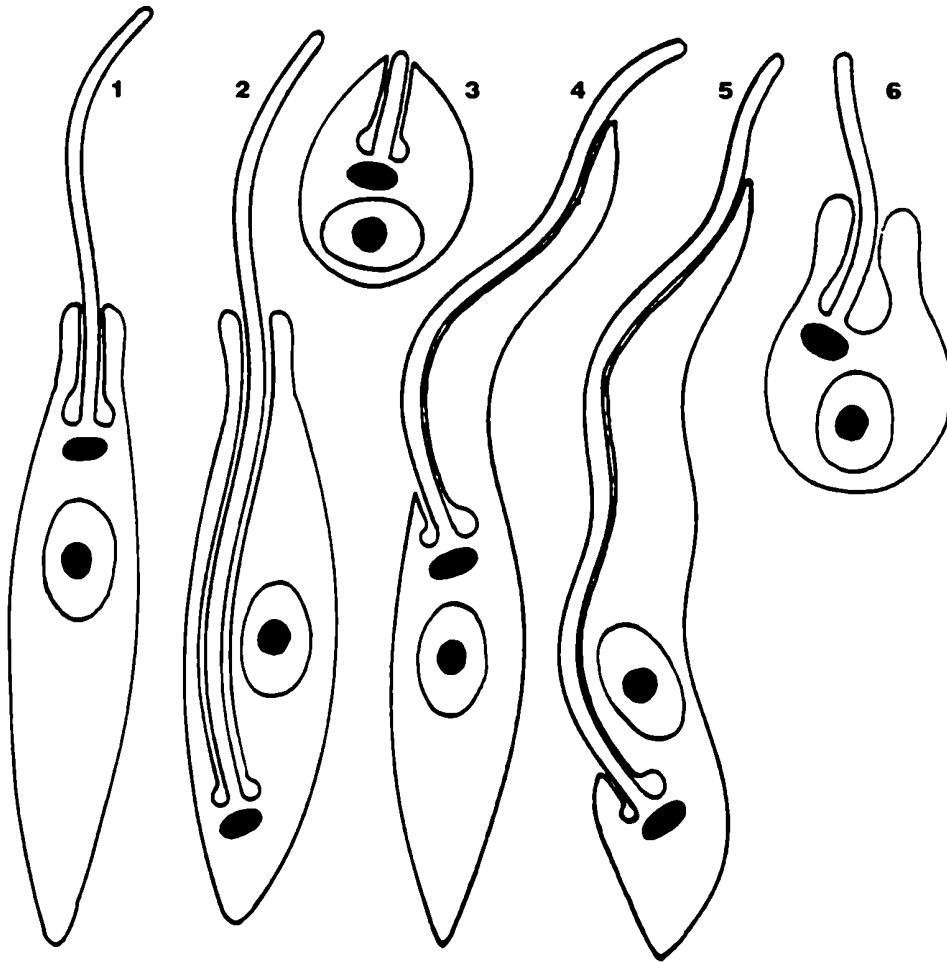


Fig . Estadios morfológicos de los tripanosomas . 1, promastigote; 2, opisthomastigote; 3, amastigote; 4, epimastigote; 5, tripomastigote; 6, choanomastigote.

## Diversidad Biológica de los Tripanosomas de Plantas

### Morfología

Las *Phytomonas* son tripanosomátidos delgados de entre 5 a 80  $\mu\text{m}$  de largo por 0.5 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, con las características de otros trips. : un solo flagelo emergiendo del extremo anterior y un kinetoplasto pequeño. Si bien la forma predominante es la de promastigote, también se encuentran como amastigotes y choanomastigote (ver Fig. 19). En las formas promastigotes el cuerpo está enrollado de una a cuatro veces (Fig.20 Microscopia electrónica de barrido ). Se puede observar en algunas oportunidades organismos unidos por los extremos de a pares o formando cadenas de unos 30 individuos. El flagelo tiene diferentes largos, algunas veces no hay flagelo libre y otras en cambio el flagelo es mas largo que el cuerpo. Las formas en división a veces son muy numerosas y otras escasas. (Ver fotos Giemsa en resultados). En el latex las formas promastigotes tienen mayoritariamente un largo de 12 a 28  $\mu\text{m}$  pero también se encuentran formas pequeñas . En el huésped insecto en cambio, los organismos pueden alcanzar hasta 80  $\mu\text{m}$  de largo.

Fig 20





### *Localización en la planta*

El hecho de que estos trypanosomas sean aislados de plantas no significa que conformen un grupo homogéneo, ya que de por sí estos organismos parasitan órganos o tejidos de plantas muy diferentes y causan diversos efectos. En todos los casos la localización es extracelular.

#### Tripanosomas del latex

La mayoría de los tripanosomas de plantas viven en los tubos laticíferos de las plantas que poseen latex (*Apocynaceae*, *Asclepiadaceae*, *Euphorbiaceae*, etc.) Estos no son órganos vitales de la planta y dado su contenido tóxico, juegan un papel en los mecanismos de defensa de la planta.

#### Tripanosomas intrafluolémicos

Se conocen cuatro casos de trypanosomas intrafluolémicos. En cada caso los mismos se encuentran específicamente localizados en los tubos cribosos del floema y los parásitos son transportados por la savia, en donde se multiplican a través de todos los órganos de la planta (Dollet, 1991). Al contrario del latex, la savia es un medio vital para la planta debido a su composición (azúcares, vitaminas y proteínas) y a sus características fisicoquímicas (alta presión osmótica)

#### Tripanosomas de frutos o granos

Se han encontrado trypanosomas también en frutos como tomate y otros (Gibbs, 1957; Conchon et al., 1989). Pueden estar en la pulpa del fruto (tomate) o bajo la piel, en áreas donde se observan rastros de picaduras de insectos. También se han aislado de otros frutos como chirimoya (Fernández-Becerra com.pers.), de granos de maíz y soja, (Jankevicius et al., 1993). En el caso de los frutos, por lo menos 2 aislados han sido identificados como *Leptomonas*. Se ha probado en forma experimental que los trypanosomas inferiores pueden multiplicarse en los frutos de la planta del tomate después de una inoculación física (Conchon et al., 1989). En este caso queda claro que un trypanosoma no puede ser automáticamente clasificado como perteneciente al género *Phytomonas* por ser aislado a partir de una planta

## Transmisión y ciclo de vida de la *Phytomonas*

### *Transmisión en plantas laticíferas*

En algunos casos se ha logrado inocular parásitos directamente de una planta a otra usando pipeta u otros instrumentos (Noc & Stevenel, 1911; Franca 1911), pero esta técnica ha fallado para otros investigadores. En el caso de *Phytomonas leptovosorum* pueden ser transmitidas injertando las raíces de árboles de café infectados a otros sanos (Vermeulen, 1963).

Desde el primer momento del descubrimiento de los flagelados de plantas se supuso que la transmisión por insectos es la ruta natural de la infección. Los vectores de *Phytomonas* de plantas laticíferas son Hemipteros de las familias Lygaeidae y Coreidae (Camargo & Wallace, 1994). Se ha descrito una especie de Pentatomidae (*Edessa loxdali*) como vector para *Cecropia palmata* (Kastelein, 1985).

McGhee & Hanson (1964) lograron infectar experimentalmente plantas con insectos e insectos con plantas a partir de huéspedes criados en el laboratorio: A partir de *Oncopeltus fasciatus* infectados lograron infectar *Asclepias curassavica* crecidas en invernaderos, estas plantas puestas en contacto con insectos nuevos no infectados lograron infectar a los mismos, mientras que los controles puestos sobre plantas no infectadas quedaron libres de parásitos.

### *Transmisión en floema , frutos y granos*

Las *Phytomonas* que infectan el floema de los árboles de palmas son transmitidas por pentatomidos del género *Lincus*. Los vectores potenciales del Hartrot son *L. croupius.*, *L. lamelliger* (Desmier de Chenon, 1984; Luise et al. 1986). La Marchitez en cambio se transmite por otras especies diferentes de *Lincus*: *L. lethifer* recolectados en Ecuador y *L. tumidifrons* en Colombia (Dollet et al. 1993; Perthuis et al. 1985). Sin embargo, de acuerdo con estudios sobre isoenzimas y patrones de restricción del ADN del kinetoplasto, una especie de *Lincus* puede ser el vector de diferentes cepas de *Phytomonas*.

A pesar del reciente y escaso conocimiento que se tiene acerca de la relación con el vector en estos tripanosomas, si se compara con otros organismos del floema (*Espiroplasma*, *Phytoplasmas*, virus) se puede

especular acerca de un ciclo biológico con una etapa de multiplicación en el insecto y una localización final en las glándulas salivales. Los insectos deben alimentarse específicamente del floema ya que no es posible inocular mecánicamente a los parásitos en el mismo.

La transmisión de *P. serpens* del tomate por parte del pentatomido *Nezara viridula*, fue demostrada en Sud Africa, con controles parciales por Gibbs (1957). Jankevicius et al. (1989) describen la transmisión y desarrollo de *P. serpens* en condiciones altamente controladas donde el vector pertenece a los coreidos *Phthia picta*, como también la presencia del parásito en las glándulas salivales del insecto criado en laboratorio e infectado experimentalmente (Freymuller et al. 1990) Los tripanosomas aislados a partir de granos de maíz son transmitidos por *Leptoglossus zonatus*, según lo descrito por Jankevicius et al (1993).

En el caso de los frutos, ha sido posible inocular diferentes tripanosomátidos inferiores en forma mecánica por ej. en el tomate, por lo tanto esto indicaría que la especificidad es escasa y que el insecto estaría jugando el papel de una jeringa.

### *Ciclo de vida*

Se han descrito los ciclos de vida de *Phytomonas* en cinco estudios (Franca, 1920; Holmes, 1930; McGhee & Hanson 1964; Vickerman 1962; Jankevicius et al. 1989). Estas descripciones coinciden en la mayoría de los aspectos. A continuación se reproduce lo descrito por McGhee & Hanson: en el latex *P. elmassiani* tienen un largo promedio de 13,5x2.5 mm, existen formas en división y también se encuentran algunos amastigotes. Después de 4 días en el insecto, las formas son iguales a las de la planta, excepto que ninguna se encuentra en división y se hallan en el píloro del insecto. En el sexto día los organismos presentan cierta elongación. En el día 10 es posible hallar formas gigantes en el píloro y al mismo tiempo estas formas aparecen en el hemocele. Después de 12 días estas formas gigantes se encuentran en las glándulas salivales. Después de 20 días empiezan a aparecer también formas pequeñas. Luego, al cabo de 26 días solo se observan estas formas pequeñas en las glándulas salivales. Estas formas son los estadios metacíclicos que son inyectados en la planta.

## Relación huésped-parásito

### *En el latex*

Las *Phytomonas* más ampliamente estudiadas son las que parasitan el latex de la planta. El latex se encuentra principalmente en plantas de las familias de las *Euphorbiaceae*, *Asclepiadaceae*, *Moraceae*, *Urticaceae*, *Apocynaceae* y *Compositae*. La función del latex es desconocida, pero existen diferentes hipótesis acerca de su función protectora contra animales hervíboros o almacenamiento de desechos metabólicos.

La mayoría de las plantas de latex que hospedan a trips., no presentan síntomas patológicos específicos. Se han descrito 2 excepciones, una es *Euphorbia lasiocarpa* en Ecuador, en la cual se ha reportado falta de crecimiento, deformidad en los tallos y defoliación. De todos modos en este caso no solo se ha detectado la presencia del parásito en el latex, sino que también en el xilema y en los espacios intercelulares (Dollet et al., 1983). El otro corresponde con el deterioro de las raíces en mandioca (Kitajima et al., 1986), pero no se ha podido demostrar la patogenicidad de los trips. Mas aún, es posible que haya que tener en cuenta en este caso la presencia de infecciones mixtas (ej. tripanosomátidos y virus; Dollet & Gargani, 1989 - las *Phytomonas* se encontraban tanto en plantas sanas como enfermas (*Asclepias curassavica*), en cambio las partículas tipo Rhabdovirus solo en las enfermas).

### *En el floema*

Todos los trips. intrafloémicos están asociados en forma específica con el perjuicio de las plantas que parasitan: necrosis del floema en el café - *Coffea liberica* - (Stahel, 1931), Hartrot del cocotero - *Cocos nucifera* - (Parthasarathy et al., 1976), Marchitez sorpresiva en palmas aceiteras - *Elaeis guineensis* - (Dollet & Lopez, 1978) y deterioro en *Alpinia purpurata* (Gargani et al., 1992; Hunt, pers. comm.). Estas enfermedades están reportadas en América del Sur, América Central y en Grenada (Pequeñas Antillas)

Necrosis del floema del café: la enfermedad puede ser crónica o aguda. En la forma crónica las hojas más viejas se tornan amarillas y caen, las nuevas son mas pequeñas y en menor cantidad que en la

planta sana y eventualmente también se ponen amarillas y caen. El árbol muere en 3 -12 meses. En la forma aguda solo caen unas pocas hojas pero en 2 a 3 semanas la planta se vuelve marrón y se necrosa.

Hartrot del cocotero: el término "hartrot" es una palabra holandesa y es una descripción algo inapropiada ya que la enfermedad no se manifiesta en el corazón de la planta, sino en sus hojas. Se describe por primera vez en Suriname en 1908, luego se describe en los '70 en Trinidad, en Ecuador y en Colombia. Comienza por la coloración amarilla de las hojas viejas y luego de las nuevas, tornándose finalmente marrones. Transcurre un periodo de 10 semanas o más entre la aparición de los primeros síntomas y la muerte del árbol.

Marchitez sorpresiva: Se reporta por primera vez en Colombia, en 1963 apenas se introduce la producción de plamas aceiteras africanas en dicho país. La enfermedad comienza con el amarronado de las hojuelas. Luego las hojas se vuelven gris pálido y las raíces se deterioran. En 3 a 5 semanas toda la masa de hojas pierden su color verde y sobreviene la necrosis. Se expande rápidamente entre árbol y árbol, llegando a la destrucción total de la plantación en una 20 años.

Marchitez de *Alpinia purpurata* : se detecta por primera vez en 1991 la asociación de *Phytomonas* con la marchitez de este cultivo en la Isla Grenada. Las plantas afectadas muestran clorosis de las hojas (se vuelven amarillas), con necrosis en los márgenes. La enfermedad ha destruido varias plantaciones pequeñas de *Alpinia rosa* o roja en Grenada. Han aparecido síntomas similares de etiología desconocida en otras islas del Caribe (Guadalupe, Martinica, Trinidad), representando una muy importante pérdida económica para estos países, ya que el cultivo de flores tropicales ha tenido un reciente impulso como recurso exportable.

No ha sido posible probar la patogenicidad de estos trips. de acuerdo a los postulados de Koch(Fig21), pero es razonable asumir que como masa ocupante, su localización en el floema podría tener un efecto negativo directo sobre el transporte de la savia (Dollet, 1991).

Fig 21

**POSTULADOS DE KOCH (1881) APLICADOS A FITOPATOLOGIA**

- 1- El agente patógeno debe estar presente en las plantas enfermas y ausentes en las sanas
- 2- Se debe aislar el agente patógeno de las plantas enfermas y multiplicarse en cultivo axénico
- 3- Los agentes patógenos en cultivo deben poder ser inoculados a una planta sana e inducir los síntomas característicos de la enfermedad
- 4- A partir de plantas infectadas experimentalmente debe poder aislarse el agente inoculado

***En el fruto***

La patogenicidad de los parásitos del fruto es controversial y la aparición de pequeños puntos amarillos tienen que ver más con la picadura del insecto que con una enfermedad general (Jankevicius et al. 1989). Por ej. el caso de *Phytomonas serpens* en tomate, el parásito ha sido aislado a partir del fruto maduro y no del tallo, hojas o frutos verdes.

Se han obtenido aislados de frutos (chirimoya, fruto comestible proveniente de la *Anona cherimolia*) en el Sur de España, donde la planta se encontraba afectada por una enfermedad (marchitez). sin embargo no se han encontrado *Phytomonas* en el tejido del tallo ni de las hojas.

Por lo tanto, en los frutos y semillas, como parásitos de estructuras transitorias de la planta, sin infección generalizada, las *Phytomonas* no tendrían consecuencias patológicas para la planta en si misma. Por el contrario, la putrefacción de los frutos por parte de microorganismos, produciendo sustancias estimuladoras como etileno, es beneficiosa para la germinación de las semillas y sería en cambio una simbiosis ventajosa más que un daño para la biología de la planta. Con respecto a este aspecto existe un punto interesante a considerar: la infección de la planta por *Phytomonas* es útil para la

biología de la planta, aunque dañino para la explotación económica de la producción de la fruta.

## **Cultivo**

### ***Trips. que pueden ser aislados en un medio acelular***

Prácticamente todos los trips. del latex y los frutos pueden ser cultivados en un medio sin células, ya sea en medio de cultivo para células de insectos más el agregado de suero, o un un medio bifásico agar-sangre (Dollet, 1984; Vainstain & Roitman, 1986). La excepción a la regla es el aislado proveniente de *Asclepias curassavica*, el cual ha sido imposible de aislar en un medio acelular.

### ***Trips. que requieren la presencia de células en el medio***

La única manera de poder cultivar los trips. intrafloémicos, ha sido con la presencia de células de insectos, (Menara et al., 1988; Gargani et al., 1992). El cultivo se transforma gradualmente en axénico luego de varios pasajes (5 a 8).

## **Caracterización Bioquímica y Molecular**

### ***Enzimas del ciclo de la arginina***

El patrón de estas enzimas en *Phytomonas* es idéntico al de *Herpetomonas* y se caracteriza por la ausencia de arginasa. Además en cada género existen 2 subpatrones, uno que tiene y otro que le falta la enzima ornitina carbamyl transferasa(OCT). Este ciclo ha sido analizado por 5 especies de *Phytomonas* (Camargo et al. 1987), sólo uno de ellos presenta la enzima OCT.

### ***Isoenzimas***

Se estudiaron 31 aislados o clones de aislados de origen intrafloémico o intralaticífero de diferentes plantas y distintos continentes, usando electroforesis de isoenzimas para 14 loci diferentes (Guerrini et al. 1992). El resultado revela una gran variabilidad en estos organismos. Por un lado están los aislados intrafloémicos de América del Sur, mas o menos ligados a algunos intralaticíferos aislados de

plantas de la misma región. Por otro lado, los aislados del Mediterráneo están mas o menos ligados con aislados del latex provenientes de Africa e India.

Por otra parte se puede observar que ciertos grupos de estos trips. estan tan alejados unos de otros, tanto como lo estan de *Herpetomonas*. Si existiera en consecuencia un sólo género para los trips. de plantas, *Phytomonas*, sería altamente heterogéneo.

Una de las conclusiones más importantes que se obtienen de este estudio es que las poblaciones naturales de los trips. de plantas parecerían ser grupos de clones naturales; estos clones deberían ser considerados como los taxones adecuados para los estudios sobre estos organismos. Dentro de los aislados del latex obtenidos de *Euphorbia hirta*, solo los de Senegal e India estan ligeramente relacionados. Sin embargo ambos son muy distintos de los aislados de la Guyana Francesa y de los de Surinam. Estos dos últimos, de la misma zona geográfica, estan sin embargo prácticamente no relacionados, mientras que existen aislados de *Euphorbia* idénticos a los provenientes de especies de Apocynaceae. Por lo tanto es imposible delimitar las especies de trips. de plantas basándose en su huesped de origen. Estos resultados se confirman en el trabajo de Muller, E. et al (1994).

### *Lectinas*

El estudio de la aglutinación de 2 aislados de *Phytomonas* (*E. characias*, *E. pinea*), 3 especies de *Critidia* y una especie de *Herpetomonas* usando 13 tipos de lectinas comercialmente disponibles (Petry et al. ,1987) , permite diferenciar a las *Phytomonas* respecto de los flagelados de insectos.

### *Serología*

Los anticuerpos monoclonales (M Acs) usados en inmunofluorescencia indirecta pueden tener habilidad discriminatoria. De un grupo de 7 MAcs. obtenidos contra aislados del latex, 4 no reaccionan con tres especies de *Critidia*, ni con *Herpetomonas*, ni tampoco con tres especies de *Tripanosoma*. Sin embargo 3 de estos 4 MAcs. no reaccionan tampoco con algunos aislados provenientes de plantas (Petry et al., 1989).

Las pruebas de inmunofluorescencia realizadas con MAcs contra aislados intrafloémicos asociados con Hartrot del cocotero o aislados



del latex de especies de Euphorbiaceae de América del Sur, permiten distinguir entre tripanosomas de plantas del "viejo mundo" (Africa, India, Mediterraneo) respecto de los de plantas del "nuevo mundo" (América del Sur), siendo estos últimos tanto intralaticíferos o intrafloémicos. También estas pruebas revelan una relación serológica muy cercana entre todos los trips. intrafloémicos asociados con síntomas patológicos (Marché, Gargani & Dollet, no public.).

### *Metabolismo de la glucosa*

El metabolismo de los hidratos de carbono de los Kinetoplástidos se caracteriza por la compartimentalización de la primera parte de la glicólisis dentro de una organela específica (glicosoma) que implica una muy alta eficiencia de este mecanismo en los trips. respecto de otras células eucariotas (ver introd. general). El metabolismo de los hidratos de carbono en *Phytomonas* ha sido estudiado en el aislado proveniente de *Euphorbia characias* (Sanchez Moreno et al., 1992; Sanchez Moreno et al 1995). Estos estudios indican que la glucosa es el sustrato energético preferido durante el crecimiento logarítmico, en cambio en la fase estacionaria el consumo de glucosa se reduce dramáticamente. El consumo de glucosa se incrementa ligeramente en anaerobiosis. Los principales productos finales del catabolismo de la glucosa en condiciones aeróbicas son acetato, etanol y dióxido de carbono y en anaerobiosis, etanol, glicerol y dióxido de carbono. Se detectaron también pequeñas cantidades de piruvato, succinato, l-malato, l-lactato, fosfoenolpiruvato, alanina y aspartato. Estudios realizados en aislados provenientes de frutos (tomate, chiromoya) muestran diferencias cuantitativas aunque no cualitativas. La adaptación a un medio muy rico en azúcares, como lo es el latex de las plantas que parasitan hace que no sea sorprendente la inexistencia de contribución mitocondrial al metabolismo energético (el ciclo de Krebs no es funcional y no se detectan citocromos). Esta misma situación es la que se detecta en las formas sanguíneas de *T. brucei*, pero en este caso la diferenciación hacia el estadio en el insecto implica la activación del metabolismo mitocondrial (la principal fuente energética en este medio son los aminoácidos). En el caso de las *Phytomonas* el estudio sólo ha podido llevarse a cabo en los cultivos provenientes de la planta y no en los estadios del insecto.

**ADN del kinetoplasto (K DNA)**

Las diferentes especies de tripanosomátidos pueden ser caracterizadas a través de las propiedades bioquímicas diferenciales de los minicírculos (Morel et al. 1980; Massamba et al. 1992; Solari et al. 1992).

**Tamaño de los minicírculos**

Se han identificado 5 categorías de tamaño en 13 aislados de tripanosomas de plantas (Tabla 1). La más grande (2800 pares de bases) corresponde a 3 aislados del Mediterráneo, provenientes del latex de diferentes especies de *Euphorbia*. La más pequeña (1300 pb) corresponde a aislados intralaticíferos de América del Sur. Los tres aislados intraflocémicos estudiados (asociados con Hartrot del cocotero en la Guyana Francesa y en Brazil) tienen minicírculos de 1600 pb (Ahomadegbe et al., 1990).

**Tabla 3**

Aislados <i>Phytomonas</i>	de Tamaño en pares de bases	Categoría
E pin	2880	
E cha 1 <sup>a</sup>	2803	1
E cha 2 <sup>a</sup>	2800	
E hir S <sup>a</sup>	2200	2
E hir 1 <sup>a</sup>	2300	
C nuc b	1612	3
Hart 1, 3 <sup>b</sup>	1600	
A cat a	1665	3
M sca a	1620	
J mac a	1450	4
E hir G <sup>a</sup>	1300	5
E hys G <sup>a</sup>	1300	

a Aislados intralaticíferos (*E pin*, *Euphorbia pinea*; *E cha*, *E. characias*; *E hir S*, *I*, o *G*, *E hirta* Senegal, India o Guyana; *A cat*, *Allamanda cathartica*; *M sca*, *Mandevilla scabra*; *J mac*, *Jatropha macrantha*; *E hys G*, *E. hyssopifolia*)

b Aislados intraflocémicos provenientes de cocoteros (*C nuc*, *Cocos nucifera*)

### Análisis de la restricción con endonucleasas

Los minicírculos presentan patrones de cortes de restricción característicos en prácticamente cada uno de los diferentes aislados, permitiendo así su identificación. Dos aislados del floema, asociados con el Hartrot del cocotero en la Guyanas Francesas presentan un mapeo de restricción idéntico, aunque diferente al de un tercer aislado asociado a Hartrot, pero proveniente de Brasil. Sin embargo, se observa una alta homología de secuencia en experimentos de hibridación cruzada por Southern blot, entre cada uno de los aislados de Hartrot. Por otro lado los minicírculos de Hartrot y de dos aislados de diferentes especies de Euphobiaceae de la Guyanas presente escasa homología de secuencia (Ahomadegbe et al. 1992). Estos resultados corroboran los obtenidos en el estudio de las isoenzimas (Guerrini et al. 1992).

### *ARN ribosomal*

En los tripanosomátidos, los genes ribosomales están organizados en cientos de copias. Cada copia contiene una subunidad pequeña 18S y una subunidad más grande subdivididas en 2, a y b.

El estudio de la secuencia del ARN ribosomal de la subunidad pequeña permite diferenciar los tripanosomátidos de plantas. En efecto, se obtuvo la secuencia genómica completa del gen de la subunidad pequeña del ARN ribosomal de dos aislados de *Phytomonas*: uno asociado a patología de las palmas y otro proveniente de plantas laticíferas. También se obtuvo secuencias parciales de otros 7 aislados. Las secuencias obtenidas permiten determinar las relaciones filogenéticas entre las *Phytomonas* y otros tripanosomas, así como dentro del mismo género. El análisis de la secuencia confirma que los aislados intrafloémicos asociados con los síndromes patológicos de las palmas, forman un grupo homogéneo que diverge de otro grupo más heterogéneo formado por los aislados no patogénicos provenientes de las plantas del latex..

La comparación de secuencias completas y parciales de los genes de la subunidad 18S del ARN ribosomal permite identificar secuencias específicas para el género *Phytomonas* y un sitio para la enzima de restricción EcoR1 que permite identificar específicamente a los aislados asociados con las enfermedades de las palmas (Marché et al. 1995).

### ***Presencia de virus***

Se detectó la presencia de una partícula viral de doble cadena de ARN de un tamaño aproximado de 4.7 kb en 10 aislados provenientes del floema y asociados a síndromes patológicos, sin embargo no puede concluirse una relación directa entre la presencia de virus con el carácter patógeno del aislado ya que existen otros dos aislados también asociados a patología que no poseen esta doble cadena de ARN (Marché et al. 1993). Se ha clonado y secuenciado parte de esta doble cadena revelando una alta homología con la ARN polimerasa dependiente de ARN de *Leishmania brasiliensis* y de *Sacharomyces cerevisiae*.

### **Problemas en la clasificación de los tripanosomas de plantas**

El género *Phytomonas* agrupa arbitrariamente a todos los tripanosomas aislados de las plantas. Sin embargo, la localización de estos organismos en plantas así como su morfología no es un criterio suficiente para discriminar entre los tripanosomátidos aislados de plantas de los tripanosomas de insectos pertenecientes a otros géneros.

A pesar que el número de aislados es limitado se puede concluir que existen tres tipos de tripanosomas de plantas:

1- Tripanosomas localizados exclusivamente en los frutos, donde son depositados por insectos. Se cultivan fácilmente in vitro y se multiplican también sin dificultad. Podemos encontrar dentro de esta especie de tripanosomas a las *Leptomonas*.

2- Tripanosomas de los tubos de latex, simbiotes, no causan síntomas patológicos. Se pueden cultivar relativamente fácil en un medio acelular.

3- Tripanosomas intrafloémicos, están siempre asociados con síndromes patológicos de los cuales parecen ser la causa. Todos se transmiten por chinches (Heteroptera) de la familia Pentatomidae (Louise et al., 1986; Vickerman & Dollet, 1992). Estos organismos son muy difíciles de cultivar in vitro, puesto que requieren células como

parte del medio de cultivo. A nivel serológico, zimodemo o schizodemo, conforman un grupo muy uniforme, por lo menos los aún muy escasos aislados que se han estudiado. Se puede apreciar que este grupo presenta una distribución geográfica muy limitada, solamente en América del Sur, mientras que los trips. de frutos o del latex provienen de varios continentes. El origen geográfico se corresponde también con el resultado obtenido con los marcadores moleculares. Finalmente es interesante hacer notar que los organismos de este grupo contienen una doble cadena de ARN la cual probablemente tenga un origen viral. (Marché et al. 1993).

Mas aún, los estudios realizados con isoenzimas, patrones de restricción del ADN del kinetoplasto y RAPD del ADN total (polimorfismo de fragmentos de ADN total amplificados al azar) confirman la clasificación basada en criterios biológicos. A su vez a través de estas técnicas, más el recientemente incorporado uso de una sonda específica para *Phytomonas* a partir de la secuencia específica del gen SL (ver Los Tripanosomas pag.59) permite separar diversos subgrupos dentro de este taxón. (Ahomadegbe et al 1992, Guerrini et al. 1992, Muller et al 1994, Teixeira et al. Serrano et al Nunes et al 1995)

Un aspecto importante a tener en cuenta en la creación de especies dentro de un género es lo siguiente: puesto que está demostrada la estructura clonal de las *Phytomonas* (y de los *Tripanosomas* en general), es decir que la progenie es idéntica al individuo que se está reproduciendo, y no constituyen una población cuyos individuos se entrecruzan al azar (panmixia), las diferencias entre las poblaciones clonales evidenciadas por distintos grupo de características usadas como marcadores, plantean dudas acerca de la caracterización de una determinada población como especie o como cepa dentro de una misma especie (Tibayrenc & Ayala 1991).

Actualmente los distintos aislados se siguen identificando por el nombre de la familia, género y especie de la planta, así como el lugar y la fecha del aislamiento como fue recomendado por Dollet & Wallace (1987).



***MATERIALES Y METODOS***

## PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

### Cepas utilizadas

La cepa utilizada en la mayor parte del trabajo realizado para esta tesis ha sido la de *Phytomonas* sp. aislada de *Euphorbia characias*, según Dollet, M. *et. al.* (1982) , y la cepa Hart 1, utilizada en algunos ensayos preliminares), cedidas a nuestro laboratorio por el Dr. Manuel Sanchez Moreno y el Dr. Michel Dollet respectivamente.

### Cultivo

Las cepas fueron cultivadas en medio Grace® para insectos (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (previamente calentado a 56 °C durante media hora para eliminar el sistema de complemento )(Yunker *et al.* 1967; Dollet *et.al.* 1982) con la adición de los siguientes antibióticos: Penicilina 500 unidades/ml; Estreptomicina 0.5 mg/ml ; Gentamicina 0.5 mg/ml ( Kastelein, P. *et.al.* 1988).

Los cultivos fueron mantenidos en estufa entre 26 ° a 28° C, sin agitación , en botellas plásticas para cultivo. Se repicaron en la fase exponencial de la correspondiente curva de crecimiento respetando una dilución 1/10 aproximadamente.

Los conteos se realizaron en cámara de Neubauer, en microscopio óptico en contraste de fase, con un objetivo de 40x.

### Conservación de la cepa

Las células fueron cosechadas en fase exponencial y resuspendidas en medio fresco con glicerol al 10 % o DMSO 5 % (dimetil sulfóxido) , y siguiendo un esquema típico de congelamiento de células , mantenidas a - 70°C. Los mismos son descongelados por inmersión en un baño a 30°C e inmediatamente repicados.

### Cosecha de los cultivos

Las células para la mayoría de los ensayos de caracterización bioquímica , fueron cosechadas durante el período exponencial tardío a un promedio aproximado de  $1 \cdot 10^6$  células /ml , centrifugando a

1000 g durante 15 minutos y conservadas en forma de botón sin medio de cultivo a -70 °C hasta el momento de ser procesadas.

*Cabe aclarar en este punto , que si bien los cultivos estan perfectamente adaptados al medio descrito arriba, sin embargo la densidad de crecimiento es relativamente escasa, lo que dificultó la obtención de la cantidad apropiada de material para la realización de los ensayos bioquímicos.*

### **Ruptura de los parásitos y obtención de las fracciones celulares**

Los cultivos cosechados fueron resuspendidos en el siguiente buffer:

Tris-ClH 50 mM pH 7.5	] <b>Buffer de ruptura</b>
Glicerol 1%	
DTT 1 mM	
Leupeptina 10 mg/ml	
PMSF 500 mM	
Benzamidina 1mM	
Inhibidor de Tripsina 2 mg/ml	
Trasylol 25 U/ml	

La relación aproximada fue de 1 parte de cultivo a 2 partes de buffer.

Posteriormente se utilizaron los siguientes métodos de ruptura:

Sonicación : 4 ciclos de 30 segundos cada uno descansando enfriando 1 minuto cada vez

Ruptura por homogeinización en potter, con o sin previo proceso de 3 ciclos de congelado a - 70°C y descongelado a 30°C.

Molido con N2 líquido en mortero previamente enfriado.

- Ruptura con perlas de vidrio (75-150 micrones -Ballotini- SIGMA): en una relación de 0.6 ml de cultivo resuspendido y 1.2 gr de perlas de vidrio agitando 3 veces con vortex durante 1 minuto a 4°C.

En ambos casos se realizó el siguiente esquema de centrifugación diferencial a 4 °C:

- 1000 g durante 10 minutos ( para eliminar núcleos y células enteras o parcialmente rotas)



- 5000 g también de 10 minutos (para separar mitocondrias)
- Ultracentrifugación a 105000g durante 1 hora y 10 minutos para obtener la fracción de membranas en el sedimento y la fracción citosólica en el sobrenadante.

### **Preparación de extractos crudos**

Los cultivos cosechados y resuspendidos en el buffer descrito en el punto anterior, fueron cocentrifugados con una cantidad igual de perlas de vidrio (75 -150 micrones), para que se forme una pasta. Se homogeneizó con vortex, y esta mezcla se volvió a resuspender con el buffer citado y se separaron las perlas de vidrio por decantación. Los homogenatos obtenidos fueron utilizados para los ensayos de actividad de adenilil ciclasa después de una centrifugación de 5 minutos a 1000g, para eliminar los núcleos.

Los cultivos fueron cosechados a lo largo de la curva de crecimiento desde el día 2 hasta el día 7, la cantidad de parásitos siempre fue en el orden de  $10^8$  células/ml.

### **Microscopía óptica**

El seguimiento de los cultivos se realizó por observación de los cultivos frescos con objetivo de 40X, o en preparaciones teñidas con objetivo de inmersión (100X). Para las tinciones se utilizó el colorante May-Grünwald- Giemsa, o Giemsa sólo (el preparado se fijó previamente con metanol durante un minuto).

## **ENSAYO DE ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA**

### **Reacción propiamente dicha**

Para medir actividad de adenilil ciclasa se utilizó el método de Rodbell (Rodbell, 1967) con las modificaciones de Salomon (Salomon *et al.*, 1974) y otras propias del laboratorio (Flawiá *et al.*, 1983; Eisenschlos *et al.*, 1986).

Se mezclaron 50  $\mu$ l de la fuente enzimática con igual volumen de la mezcla de reacción, que contiene:

Tris-HCl	0,5 mM	pH 7,4
MIX	0,2 mM	
AMPc	1,0 mM	
Fosfocreatina	2,0 mM	
Creatina quinas	0,2 mg/ml	
Mg <sup>2+</sup> (o Mn <sup>2+</sup> )	2,5 mM	
ATP $\alpha$ [ <sup>32</sup> P]	0,5 mM	(50-200 cpm/pmol)

Los componentes de la mezcla de reacción que mejoran la eficiencia del método son:

- Regenerador de ATP - Sistema Fosfocreatina/Creatina quinas: Permite contrarrestar el efecto de pérdida de sustrato debido a la hidrólisis del ATP por presencia de otras enzimas contaminantes también presentes en la muestra (ATPasas unidas a membrana, fosfohidrolasas no específicas, kinasas unidas a membranas y fosfatasa) que lo convierten en ADP.

A través de este sistema, el ADP es fosforilado por transferencia de un grupo fosfato de fosfocreatina., mediada por Creatina quinas.

- Inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc - Metil-Isobutil-Xantina (MIX):

Su agregado permite que el AMPc generado por la adenilil ciclasa se mantenga estable hasta la separación cromatográfica.

La reacción se detuvo luego de 15 minutos a 30°C por el agregado de 100  $\mu$ l de solución STOP:

ATP	40 mM
[ <sup>3</sup> H]-AMPc	12,5 mM (act. esp.: 3800 cpm/mol)

y calentamiento de los 200  $\mu$ l resultantes por 3 minutos en un baño de agua hirviendo (Visconti et al, 1990).

### **Purificación del AMPc formado**

El AMPc formado se purificó de acuerdo al procedimiento de cromatografía secuencial desarrollado por Salomon (1979). Este método se basa en la separación del AMPc radioactivo de los fosfatos

y nucleótidos radioactivos o no (ATP, ADP, AMP, PPI, Pi) a través de una resina intercambiadora de cationes (Dowex AG50W-X4, forma H<sup>+</sup>), donde los protones de la resina se intercambian con los grupos -NH<sub>2</sub><sup>+</sup> de la adenina de los nucleótidos. El AMPc es el único compuesto parcialmente retenido por la resina, pues su carga positiva (adenosina) no es contrarrestada por completo por la única carga negativa del grupo fosfato. Luego del pasaje por la resina Dowex AG50W-X4, el AMPc obtenido es purificado adicionalmente en una columna de alúmina neutra. Como el eluido de la columna de Dowex es ácido, la adsorción de los nucleótidos cíclicos por la alúmina se ve favorecida, y la elución del AMPc de esta última se logra aumentando el pH ( Imidazol 100mM pH 7.5), quedando retenidos los compuestos fosforilados contaminantes aún presentes.

La secuencia de pasos de la purificación comprende el agregado de:

1 ml de H<sub>2</sub>O en los tubos y se siembra sobre DOWEX (4 x 0.5 cm),

1 ml de H<sub>2</sub>O sobre DOWEX, descartando el eluido,

4 ml de H<sub>2</sub>O sobre DOWEX, descartando el eluido,

6 ml de H<sub>2</sub>O sobre DOWEX, recogiendo el eluido sobre alúmina neutra

1 ml de Imidazol-HCl 100 mM pH 7,5 sobre alúmina, descartando el eluido,

4 ml de Imidazol-HCl 100 mM pH 7,5 sobre alúmina, recogiendo en viales de vidrio.

Finalmente a cada vial se le agregan 12 ml de líquido de centelleo (Bray, L., 1960) y se determina la radioactividad. Las lecturas de radioactividad se realizaron en un contador de centelleo líquido marca Beckman LS1801. Los parámetros utilizados fueron los siguientes: para <sup>3</sup>H (el AMPc tritiado agregado al finalizar la incubación permite calcular el porcentaje de recuperación del AMPc después de la purificación cromatográfica) se usó una ventana de 0 a 200 y para <sup>32</sup>P la ventana usada fue de 500 a 1000. Las recuperaciones obtenidas habitualmente fueron del orden del 50% al 80%.

### Cálculo de la actividad específica

La radioactividad específica del [ $^{32}\text{P}$ ]-ATP debe ser igual a la del [ $^{32}\text{P}$ ]-AMPc obtenida en el ensayo.

$$\frac{\text{cpm- } [^{32}\text{P}]\text{- AMPc obtenido}}{\text{pmol- } [^{32}\text{P}]\text{-_AMPc obtenido}} = \frac{\text{cpm- } [\alpha^{32}\text{P}]\text{- ATP ensayo}}{\text{pmol-}[\alpha^{32}\text{P}]\text{-ATP ensayo}}$$

$$\text{pmol- } [^{32}\text{P}]\text{-_AMPc obtenido} = \text{cpm-} [^{32}\text{P}]\text{- AMPc obtenido} \cdot \frac{\text{pmol-}[\alpha^{32}\text{P}]\text{-ATP ensayo}}{\text{cpm-}[\alpha^{32}\text{P}]\text{-ATP ensayo}}$$

Pero no todo el AMPc  $^{32}\text{P}$  obtenido se recupera en el pasaje por las dos columnas; por eso, la lectura de  $^3\text{H}$  permite calcular la recuperación del AMPc después de su pasaje por las resinas Dowex y Alúmina:

$$\text{cpm- } [^{32}\text{P}]\text{- AMPc obtenido} = \text{cpm- } [^{32}\text{P}]\text{- AMPc contadas} \cdot \frac{\text{cpm- } [^3\text{H}]\text{- AMPc stop}}{\text{cpm- } [^3\text{H}]\text{- AMPc contadas}}$$

Reemplazando:

$$\text{pmol-AMPc-}^{32}\text{Pobtenido} = \frac{\text{cpmAMPc}^{32}\text{Pcontadas} \cdot \text{cpmAMPc}^3\text{Hstop} \cdot \text{pmoles ATP}^{32}\text{Pensayo}}{\underbrace{\text{cpmAMPc}^3\text{Hcontadas}}_{\text{relación } ^{32}\text{P}/^3\text{H}} \underbrace{\text{cpm ATP}^{32}\text{Pensayo}}_{\text{factor}}}$$

Para pasar a Actividad Específica se divide por la cantidad de proteína utilizada y por el tiempo.

$$\text{Act.Esp.} = \frac{\text{relación } ^{32}\text{P}/ ^3\text{H} \cdot \text{factor}}{\text{mg proteína}_{\text{ensayo}} \cdot \text{tiempo de incubación}}$$

Se expresa en pmoles/min. mg.prot

Las cantidades de proteínas utilizadas en cada uno de los ensayos fueron determinadas por el método de Lowry (Lowry et al, 1951).

**ENSAYO DE UNION DE [<sup>35</sup>S]GTP-γS**

Se utilizó básicamente el método de (Northup *et al*, 1982)(Waldo *et al*, 1987) con modificaciones del laboratorio para determinar unión específica de [<sup>35</sup>S]GTP-g S a proteínas de membrana de *Phytomonas*. El método se basa en la propiedad del GTP g S, como análogo no hidrolizable del GTP, de unirse en los bolsillos que este ocupa en la estructura tridimensional de las proteínas, manteniendo la marca radioactiva debido al reemplazo de un átomo de oxígeno por azufre, haciendo de esta forma no intercambiable al último fosfato. Las membranas a testear fueron tratadas como se indica a continuación. La radioactividad retenida en los filtros es un índice de la cantidad de proteínas presentes en la muestra, que unen GTP.

El ensayo se lleva a cabo en un volúmen final de 200 ml, donde se combinan 100ml de membranas mas el agregado de 80 ml del siguiente buffer (concentración final):

Tris-HCl	20 mM, pH 8
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
NaCl	100 mM
Lubrol PX	0,1% (v/v)

La reacción se inició con 20 ml de una mezcla conteniendo 10 nM [<sup>35</sup>S]GTP-γ S (3. 10<sup>5</sup>cpm/ensayo; 1122 Ci/mmol), MgCl<sub>2</sub> 10 mM y Lubrol PX 0,1%.

Luego de una incubación a 30°C por 60 minutos, la misma se detuvo, por dilución, con 2 ml del buffer STOP frío:

Tris-HCl	20 mM, pH 8
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
Fosfato	1 mM

y se filtró inmediatamente a través de discos de nitrocelulosa (BA85 Schleicher & Schuell). Cada filtro fue lavado 5 veces con 2 ml del mismo buffer frioy secado en estufa a 75°C por 15 minutos. Luego, se colocaron los filtros en un vial de plástico (Polistor), se agregó mezcla centelleante (Tolueno-Omnifluor) (Kobayashi *et al*.1974) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

La unión inespecífica fue calculada realizando el mismo ensayo pero en presencia de 100  $\mu\text{M}$  GTP- $\gamma\text{S}$

El análisis de Scatchard de la unión específica de [ $^{35}\text{S}$ ]GTP- $\gamma\text{S}$  a las fracciones de membrana, fue llevado a cabo manteniendo constante la masa de [ $^{35}\text{S}$ ]GTP- $\gamma\text{S}$  y variando la concentración de GTP- $\gamma\text{S}$  (no radioactivo), desde 100 pM hasta 10  $\mu\text{M}$  (Rubinstein *et.al.*, 1989) (Santa Coloma *et.al.*, 1986). Las actividades específicas fueron calculadas para cada concentración total de ligando, y dichas actividades fueron empleadas para averiguar los moles de ligando unidos, a la respectiva concentración de ligando libre. La unión no específica (en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de GTP $\gamma$  -S) fue menor al 10%.

## ADP RIBOSILACION

Las toxinas bacterianas de *Vibrio cholerae* y *Bordetella pertussis* son usadas como un instrumento para identificar e investigar los roles funcionales de las proteínas G en los sistemas biológicos. Estas toxinas modifican covalentemente la subunidad  $\alpha$  de varias proteínas G, catalizando la transferencia del grupo ADP-ribosa del  $\text{NAD}^+$  hacia un aminoácido específico, modificando en consecuencia la actividad biológica de la proteína G blanco. Por ej. :



## Ensayo de ADP-ribosilación en gel

Usando [ $^{32}\text{P}$ ] NAD, es posible monitorear la incorporación de [ $^{32}\text{P}$ ]ADP-ribosa a estas proteínas y así identificarlas por autoradiografía. Por lo tanto se requieren pequeñas cantidades de extractos proteicos crudos para identificar y caracterizar inicialmente en subtipos más generales a las proteínas G de la muestra.

En los experimentos correspondientes a esta tesis se usó el siguiente método que es una modificación de Goldsmith, P., *et.al.* 1988 y Casey, R.J *et.al.* 1989 : se incubaron 15 ml de la preparación de membranas

(50-70 mg de proteínas) resuspendidas en el siguiente buffer de reacción:

Tris-HCl	50 mM, pH 8
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Lubrol PX	0,1 % v/v

Luego, dependiendo del caso se agregó 5 ml de una u otra toxina:

tox. cólera	concentración final	30 mg/ml
tox. pertussis	concentración final	20 mg/ml

las cuales fueron pretratadas en una solución de DTT 10 mM durante 30 minutos a 30°C para activarlas, iniciándose la reacción al agregar 5 ml de la siguiente solución:

[ <sup>32</sup> P]NAD	1 mM (4.10 <sup>6</sup> cpm/ensayo)
ATP	1 mM

Según los controles correspondientes se agrega NAD 300 mM final para desplazar y GTP o GDPβS según los casos.

La reacción se llevó cabo durante 40 minutos a 30°C con agitación, y detuvo al cabo del tiempo con 12,5 μl de Craking buffer 3X y ebullición durante 3 minutos, para ser sembrada luego en gel de poliacrilamida.

El gel se tiñó con Coomasie Blue y puesto a secar, o transferido a una membrana de Nitrocelulosa según los casos, para luego revelar la banda correspondiente por autoradiografía.

En todos los casos se realizaron 2 controles que definen la especificidad de la reacción de ADP-ribosilación:

*Reacción toxina específica* - la muestra incubada con todos los reactivos, excepto la correspondiente toxina. Esto permite discriminar las proteínas que pudieran marcarse en forma no específica debido a la presencia de otras glicohidrolasas presentes en la membrana (por ej. la Poly(ADP-ribosa) polimerasa, que algunas veces puede aparecer como un péptido marcado de 110,000 kDa).

*Proteína ADP-ribosilada* - la muestra incubada en presencia de un exceso de NAD<sup>+</sup> no radioactivo (300mM final), lo que debería disminuir en gran medida o eliminar la detección de proteínas

susceptibles a la transferencia enzimática de el grupo ADP-ribosa a partir del [<sup>32</sup>P]NAD<sup>+</sup> por parte de las toxinas.

ADP-ribosilación de las membranas previo a los ensayos de actividad de Adenilil ciclasa

Se procedió de la misma forma que lo descrito en el párrafo anterior, pero realizando la reacción en presencia de 10mM de NAD<sup>+</sup> no radioactivo e incubando durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 10000-12000 xg 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la membrana para proseguir con la reacción de actividad de ciclasa durante 15 minutos más.

### **UNION DE [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]GTP POR FOTOAFINIDAD**

Otro importante método usado para identificar proteínas G, es la marcación mediada por luz de dichas proteínas usando moléculas análogas al GTP marcadas radioactivamente como 8-azido [ $\alpha$  <sup>32</sup>P]GTP (Evans et.al., 1986) o [ $\alpha$  <sup>32</sup>P]GTP (Linse et al,1988).

Esta técnica permite identificar y separar cualitativamente en un gel de poliacrilamida todas las proteínas que son capaces de unir GTP, debido a la unión covalente de la proteína y el nucleótido desencadenada por la irradiación con luz UV. A diferencia del método de unión de [<sup>35</sup>S]GTP- $\gamma$ S, en este caso, la corrida electroforética permite identificar el peso molecular de dichas proteínas.

Se resuspendieron las membranas en buffer Tris-ClH 20 mM, pH 8 y se les agregó:

MgCl<sub>2</sub> 1 mM

DTT 1 mM

ATP 1 mM

[ $\alpha$  <sup>32</sup>P]GTP 4.10<sup>7</sup> cpm/ensayo/3000 Ci/mmol en un volumen final de 20  $\mu$ l.

Los controles en oscuridad fueron realizados cubriendo los tubos con papel de aluminio, y a los controles desplazados se les agregó GTP 1mM final conjuntamente con el nucleótido radioactivo.

Luego de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, las muestras fueron irradiadas con luz UV (254 nm; lámpara de Hg HBO 100 W/2, Osram), a una distancia de 10cm por 20 minutos. Para



evitar que el sistema se recalentase se colocó sobre una bandeja con hielo y el haz de luz llegó hasta las muestras previo paso a través de un baño de H<sub>2</sub>O.

La reacción se detuvo agregando igual volumen de cracking buffer 2x y las muestras se sembraron en un gel de poliacrilamida el cual se procesó como se indica en la sección correspondiente.

### ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

El método utilizado para geles de poliacrilamida desnaturalizantes fue el de Laemmli (1970).

Se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS, de 10x12x1,5 mm de las siguientes características:

gel separador: 10 ml 10 o 12% acrilamida, pH 8,8  
 gel concentrador: 5 ml 5% acrilamida, pH 6,6

Los geles se prepararon de acuerdo al siguiente esquema:

	SEPARADOR (10%)	CONCENTRADOR
Acrilamida + Bis Acrilamida (30:1)	3,3 ml	0,83 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,05 ml
Tris-ClH 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml	-
Tris-ClH 1,0 M, pH 6,8	-	0,63 ml
H <sub>2</sub> O	4,0 ml	3,40 ml
TEMED	5 µl	5 µl
S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (NH <sub>4</sub> )	20 mg	15 mg

Todas las muestras fueron tratadas con un volumen de buffer de siembra 2 X (Cracking buffer).

SDS 2% (v/v)  
 2-mercaptoetanol 2% (v/v)  
 Tris 50 mM glicina 400 mM, pH 8  
 azul bromofenol 0,02% (p/v)

durante 3 minutos a 100° C y luego sembradas en gel.

El buffer utilizado para la corrida tenía la siguiente composición:

Tris	3,03 g/l
glicina	14,4 g/l
SDS	0,1%

y la electroforesis se efectuó a una corriente constante de 15 mA para el gel concentrador y de 25 mA para el separador.

En las corridas electroforéticas se utilizaron como marcadores de peso molecular las siguientes proteínas preteñidas:

Mezcla obtenida de SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO,

triosafosfatoisomerasa	26,6 kDa
lactato hidrogenasa	36,5 kDa
fumarasa	48,5 kDa
piruvato quinasa	58,0 kDa
fructosa-6-fosfato quinasa	84,0 kDa
b-galactosidasa	116,0 kDa
a 2-macroglobulina	180,0 kDa

Mezcla obtenida de GIBCO - BRL

lisozima	15,10 kDa
$\beta$ - lactoglobulina	17,90 kDa
anhidrasa carbónica	28,25 kDa
Ovoalbúmina	43,60 kDa
Alb. sérica bovina	70,80 kDa
Fosforilasa B	105,00 kDa
Miosina (cad. pesada)	206,30 kDa

En los casos en que fue necesario, los geles se tiñeron con la siguiente solución:

metanol	45% (v/v)
ácido acético	10% (v/v)
Coomasie Brilliant blue R-250	0,2% (p/v)

durante una hora y luego se los decoloró con una solución metanol-ácido acético-agua (40:10:50) durante 4 horas.

Para los ensayos de ADP-ribosilación con [<sup>32</sup>P]NAD<sup>+</sup> y unión de [<sup>32</sup>P]GTP, los geles una vez teñidos, decolorados y secados, o sin tinción previa transferidos a una membrana de Nitrocelulosa, fueron expuestos con pantalla intensificadora a - 70°C por períodos que variaron entre 12 y 72 horas.

## TECNICAS INMUNOLOGICAS

### Inmunoblot (Western blot)

#### a - Electrotransferencia

Se utilizó el método de transferencia semiseca de Khyse y Andersen (1984), el cual consiste en colocar la membrana de nitrocelulosa en contacto directo con el gel rodeando a ambos con varias capas de papel Whatmann 3MM embebidos en buffers anódico y catódico. Dicho sistema fue sometido a un campo eléctrico entre dos placas de grafito para permitir el pasaje de las proteínas a la membrana.

Se utilizaron los siguientes buffers:

Buffer catódico:

Tris	25 mM	pH 9,4
Acido 5-amino-n-hexanoico	40 mM	
Metanol	20 %	

Buffer anódico 1:

Tris	300 mM	pH 10,4
Metanol	20%	

Buffer anódico 2:

Tris	25 mM	pH 10,4
Metanol	20%	

Seis trozos de papeles Whatmann 3MM humedecidos en el Buffer anódico 1, fueron colocados sobre el grafito anódico, sobre ellos se pusieron tres capas de papel Whatmann humedecidos en Buffer anódico 2 y, sobre éstos, la membrana de nitrocelulosa. El gel se apoyó suavemente sobre la nitrocelulosa, expulsando las burbujas con una espátula humedecida en Buffer. Luego se montaron los últimos

seis trozos de papel Whatmann embebidos en Buffer catódico sobre el gel. En todos los casos se tomó la precaución de que no quedaran burbujas entre las láminas de papel ni entre papel y filtro o gel. Finalmente, se cubrió la pila con la plancha de grafito catódico.

La transferencia se efectuó a una corriente constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de gel durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para verificar la calidad de la electroforesis y de la transferencia, se tiñó la nitrocelulosa con una solución de Ponceau S 0,5% (peso/volumen en 0,1% ácido acético) por unos minutos. Dicha tinción es reversible y es eliminada por sucesivos y cortos lavados con H<sub>2</sub>O.

#### b - Bloqueo

Realizada la transferencia, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa para evitar la adsorción inespecífica de los distintos reactivos. Para ello, se sumergió la membrana en la solución de bloqueo constituida de la siguiente forma:

Tris-HCl	25 mM	pH 8	] TBS 1X
NaCl	0,9%	(p/v)	
suplementada con			
leche descremada	5	% (p/v)	
glicina	2	% (p/v)	

Se incubó 30 minutos a 1 hora a temperatura ambiente, con agitación.

#### c - Adición de anticuerpos

Para la detección del antígeno (proteínas G, PKA) se utilizaron distintos anticuerpos detallados en Resultados y Discusión,

Los anticuerpos (todos hechos en conejo) se prepararon en solución bloqueante adicionada con Tween 20 0,05% (v/v). Se eliminó la solución de bloqueo y la membrana se incubó en la que contenía el primer anticuerpo. Los tiempos, temperatura (90 minutos a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C, siempre con agitación), así también como el respectivo título de la solución, varió según el anticuerpo y el método de revelado usado (ver Resultados). Luego se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno con buffer TBS 1x adicionado con Tween 20 0,05% (v/v).



Se mezclaron volúmenes iguales del reactivo Enhanced Luminol y reactivo oxidante para tener 0,125 ml de solución por cm<sup>2</sup> de membrana. Se incubó la membrana con el sustrato de quimioluminiscencia 1 minuto a temperatura ambiente, se escurrió el exceso de reativo y se colocó la membrana debajo de un protector plástico. A partir de este momento se trabaja en oscuridad y se expone la membrana a un film autorradiográfico por 30 segundos a 1 minuto aproximadamente. Se revela el film y en algunos casos se repitió la exposición hasta lograr una señal óptima (entre 2 y 3 minutos)

### **Inmunoprecipitación**

En los experimentos de esta tesis la inmunoprecipitación se usó en los ensayos tendientes a poner en evidencia la existencia de una proteína kinasa dependiente de AMPc. Para esto se usaron alícuotas de los picos de una columna de DEAE-celulosa previamente sometidas a una reacción de autofosforilación. Dichas alícuotas se llevaron a un volumen de 1 ml con la siguiente mezcla de detergentes:

SDS 1% (v/v)	] en 0.5 M Tris-ClH pH 7.4 / 0.15 M NaCl
Tritón X100 1% (v/v)	
NP40 0,5% (v/v)	

Se agregó el anti C o el suero preinmune y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego se incubó una hora a 4°C en presencia de proteínaA- Sepharosa CL4B. Los precipitados se lavaron 4 veces con la mezcla de detergentes y, finalmente, se lo resuspendió en 50 ml de buffer de craqueo 2x. Se calentó 10 minutos a 85°C, se centrifugó 5 minutos a 10000 xg y el sobrenadante se sembró en un gel de poliacrilamida, junto con los sobrenadantes de la inmunoprecipitación como controles negativos.

### **PURIFICACION PARCIAL DE QUINASAS DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMPc**

En este ensayo se usó el sobrenadante de 105.000 xg obtenido por ruptura con N2 líquido en presencia del buffer de ruptura más el agregado de otro inhibidor de proteasas - TLCK 0.5 mM - . Se sembró 10 ml de este sobrenadante (0.6 mg/ml) sobre una columna de

DEAE-celulosa de 1.5 cm x 0.8 cm, equilibrada con el siguiente buffer (Ochatt, C.M. *et al*, 1993):

Tris-ClH	20 mM	pH 7.5 ] Buffer A
EGTA	0.5 mM	
EDTA	0.5 mM	
Trasylol	25 U/ml	
PMSF	500 mM	

La columna fue lavada con buffer A hasta que la absorbancia a 280 nm fue igual a cero y eluída con un gradiente lineal de 0 a 0.5 M NaCl en dicho buffer..

### ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE PKA

Los ensayos se realizaron fundamentalmente según lo descrito por Roskoski (1983). La mezcla de incubación contenía:

Tris-ClH	20 mM	pH 7.5
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
Histona IIA	3 mg/ml	
Albúmina bovina	0.5 mg/ml	
NaF	10 mM	
[ $\gamma^{32}$ P]ATP	100 mM	(1000 cpm/pmol)

con o sin 1mM de AMPc, en un volúmen final de 60 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C durante 10 minutos y se detuvo la reacción sembrando 20 ml de cada una de las muestras en papeles de fosfocelulosa (Whatman P-81) de 2x2 cm, que fueron inmediatamente sumergidos en ácido fosfórico 75 mM, y lavado 3 veces en la misma solución y una última vez con acetona. Se secaron los papeles y se contó la radioactividad debida al <sup>32</sup>P usando una solución centelladora de tolueno / Omnifluor.

La reacción también se llevó a cabo usando Kémtido 50 mM como sustrato en vez de Histona IIA, y se procedió de la misma manera que lo anteriormente descrito.

En algunos ensayos fue necesario remover las proteínas endógenamente fosforiladas, que podían estar contribuyendo al background de la reacción con Kémtido. Para esto se procedió de la

misma manera que lo hecho anteriormente, pero en el momento de parar la reacción se agregó un volumen igual de 5-10 % (v/v) de ácido tricloroacético (Casnellie, J.E. 1991) más 10 ml de seroalbúmina bovina 10 mg/ml para ayudar a la precipitación y se incubó 10 minutos en hielo. Las proteínas precipitadas se removieron por centrifugación y la mitad del sobrenadante se sembró en los papeles de fosfoelulosa, continuándose en la misma forma que lo ya descripto.

### ENSAYOS DE AUTOFOSFORILACION

Se ensayaron el sobrenadante crudo y los 2 picos de la purificación parcial en ausencia de sustrato exógeno. Para esto se incubaron las muestras con 5 mM [ $^{32}\text{P}$ ]ATP en el mismo buffer usado para la reacción de kinasa, durante 2 minutos a 30°C. Se paró la reacción con igual volumen de cracking buffer 2X e hirviendo durante 3 minutos, para ser procesadas luego en un PAGE-SDS, teñido con Coomasie adicionado de fosfatos para lavar el exceso de [ $^{32}\text{P}$ ], puesto a secar y expuesto luego a un film para visualizar las proteínas por autoradiografía.

### ENSAYO DE UNION DE [ $^3\text{H}$ ]-AMPc

Los ensayos se hicieron siguiendo fundamentalmente lo reportado por Døskeland & Ueland (1977), con 50 ml de una mezcla conteniendo:

Buffer fosfato de potasio	50 mM	pH 6.8
Seroalbúmina bovina	1 mg/ml	
[ $^3\text{H}$ ]-AMPc	0.2 mM	( 32 Ci/mmol)

en un volumen final de 100 ml, a 4 °C durante 3 horas.

En cada caso se descontó la unión inespecífica procesando en paralelo la misma muestra en presencia de 0.1mM AMPc no radioactivo. La reacción se paró con el agregado de 1 ml de una solución 80% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado, filtrado a través de filtros HAWP-02500 de Millipore y lavados 2 veces con 60% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado. Los filtros fueron secados y la radioactividad se contó con una mezcla



centelladora conteniendo 0.4% (p/v) Omnifluor y 30%(v/v) Triton X-100 en tolueno.

## **PROCEDIMIENTOS ANALITICOS**

### Determinación de proteínas

Se utilizó el método de Lowry et al (1951) utilizando sero-albúmina bovina (BSA) cristalina como patrón. Para cuantificar proteínas en distintos pasos de purificación, se midió la absorbancia a 280 nm/260 nm calculándose la concentración proteica según el método de Peterson (1983).



***RESULTADOS Y DISCUSION***

## **CULTIVO**

A diferencia de otros tripanosomátidos, las *Phytomonas* son difíciles de cultivar in vitro. A pesar que en años recientes ha habido progresos en las técnicas de cultivo in vitro (especialmente para los organismos presentes en el latex de las plantas, Ver Introd.), los mismos distan aún de ser completamente satisfactorios. Las densidades celulares que se pueden obtener siguen siendo escasas para poder llevar a cabo los estudios de caracterización bioquímica. Es por esto que si bien nuestro objetivo era develar los componentes de los posibles caminos transductores de señales, fue necesario poner a punto el mantenimiento de los cultivos en el laboratorio.

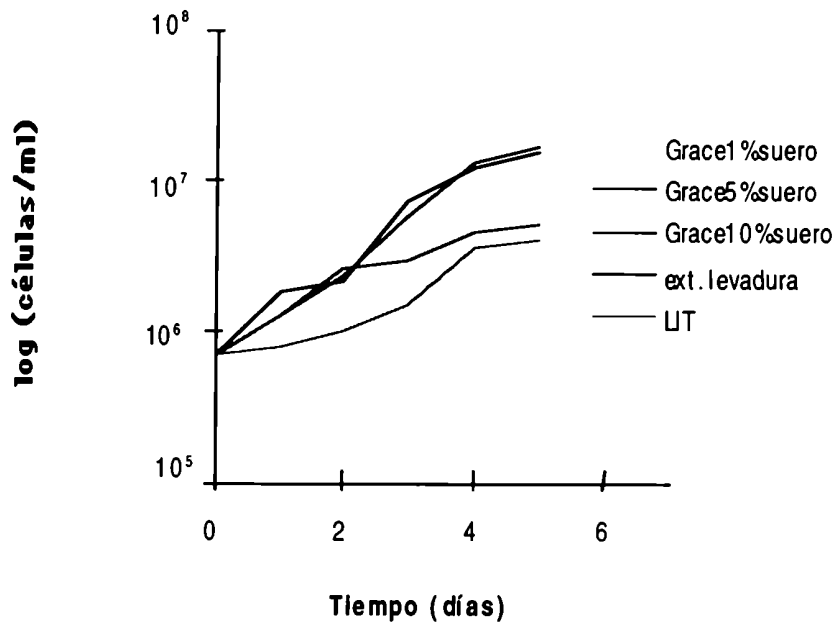
La especie usada como modelo biológico para los experimentos de esta tesis es la *Phytomona* aislada de *Euphorbia characias* en el Sur de Francia por el Dr. Dollet . Este parásito se aisló de la planta cultivándolo en medio bifásico agar-sangre y fue adaptado al cultivo "in vitro" en Medio Grace con el agregado de suero fetal bovino.

### **Curvas de crecimiento**

Como primera etapa, verificamos la dependencia del cultivo respecto del porcentaje de suero fetal bovino, la posibilidad de mejorar el rendimiento con el agregado de extracto de levadura al 10% , y la factibilidad de usar otro medio de cultivo como el LIT según lo reportado por otros autores (Jankevicius *et al.* 1989).Fig. 22

## Diferentes condiciones de cultivo

Fig 22



)

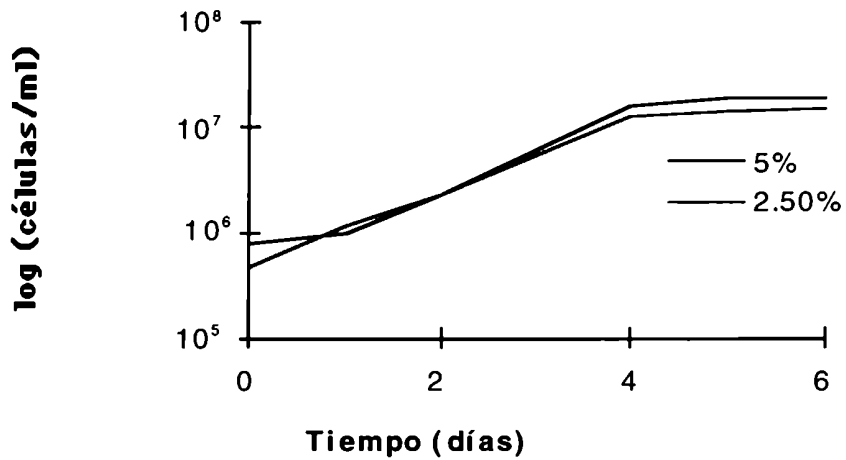
Como puede apreciarse, la dependencia respecto al suero está relacionada con la posibilidad de continuar creciendo más allá de la primera etapa de la fase exponencial (el requerimiento de un mayor porcentaje de suero se hace crítico después del segundo día).

No se logró mejorar el rendimiento con el agregado de extracto de levadura (GRACE + 10% suero), y fue descartada la posibilidad de utilizar el medio LIT como alternativa.

A continuación decidimos comprobar si el porcentaje del inóculo inicial podría tener alguna influencia en el desarrollo de la curva, más allá de la consabida dependencia del inóculo inicial y de la etapa del cultivo a partir del cual se realiza el repique. Fig 23

curva de crecimiento (inóculo)

Fig 23



Como puede apreciarse, por encima de un inóculo de  $10^5$  no hay diferencia apreciable entre las velocidades de crecimiento en función del porcentaje inicial del mismo.

A partir de estos resultados se optó por trabajar con medio Grace más 10% de suero, realizando los repiques durante la fase exponencial tardía en con un inóculo del 10% por encima de  $10^5$  células/ml aproximadamente. Fig 24

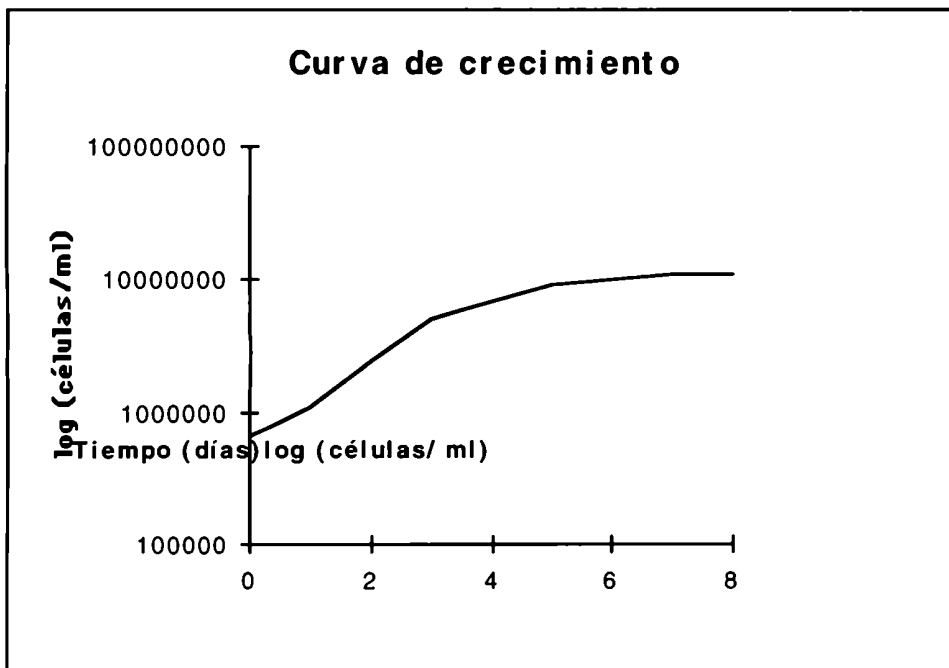


Fig. 24 :Curva de crecimiento característica de los cultivos mantenidos en nuestro laboratorio. Como se observa, el crecimiento es exponencial hasta el día 4 y a partir de allí se hace estacionario.

## Morfología

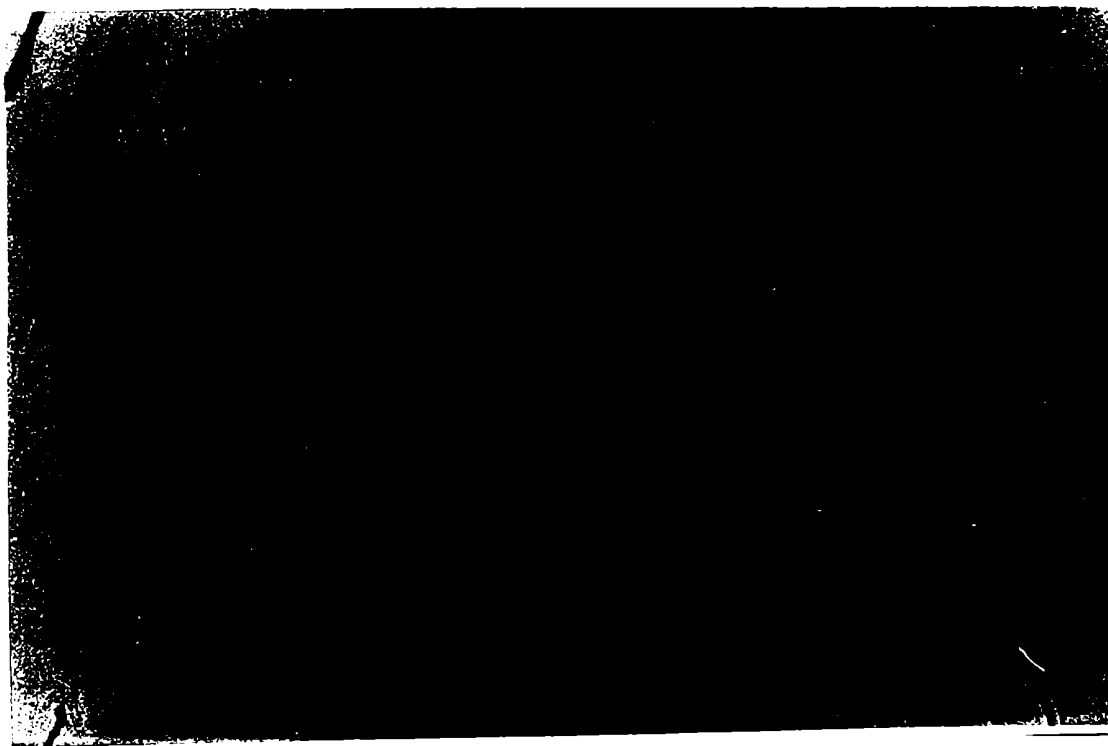
La morfología de los cultivos es la que se aprecia en las fotografías siguientes (Fig. 25 y 26).

Al principio se observan formas promastigotas características con un tamaño promedio de 6.5  $\mu$ m y un flagelo de unas 5  $\mu$ m y a medida que va avanzando el período de crecimiento se hacen más preponderantes las formas torsadas con un tamaño promedio de unas 13  $\mu$ m y un flagelo largo del tamaño del cuerpo o aún mayor, similar a lo reportado por otros autores (Dollet *et al.* 1982; Jankevicius *et al.* 1989).

Se observa la típica formación de rosetas correspondientes a las etapas exponenciales de la curva de crecimiento, como la aparición de formas dobles (señaladas con la flecha Fig. 26) que corresponden a formas que están a punto de finalizar la división celular, donde según lo descrito para las formas procíclicas (en el insecto) de *T. brucei*, la segregación del kinetoplasto y la aparición del flagelo en la célula hija es anterior a la mitosis y su consecuente citoquinesis (Turner, 1992).

La aparición de formas redondeadas (esféricas o amastigotes), con o sin flagelo, fundamentalmente en la fase estacionaria, en nuestro caso estarían relacionadas con el envejecimiento del cultivo (formas de respuesta a estrés por agotamiento del medio de cultivo). Sin embargo, en un reciente trabajo del grupo del Dr. Sanchez Moreno se reporta la obtención de una mayor proporción de estas formas como producto de un proceso de diferenciación desencadenado por iones  $\text{Na}^+$  (Sanchez Moreno *et al.* 1995).

Según lo publicado en el mencionado trabajo de Sanchez Moreno *et al.*, el medio óptimo para obtener un mejor rendimiento del cultivo, que facilitaría los trabajos bioquímicos de caracterización, es el SDM-79. Este medio es de difícil preparación, y dado que la diferencia reportada respecto al Grace más suero (alcanza un poco menos de medio orden de magnitud sólo en la fase estacionaria) no es demasiado relevante, decidimos seguir usando este último.



**Figuras 25 y 26** : fotografías de preparados de células fijadas con metanol y teñidas con Giemsa, obtenidas con un aumento de 100X con microscopía óptica.

## ADENILIL CICLASA DE *PHYTOMONAS*

### Propiedades generales

#### Detección de actividad - Localización subcelular

Como primer paso en la dilucidación del rol del AMPc en los mecanismos moleculares por los cuales las *Phytomonas* reciben y precisan las señales del ambiente, se procedió a caracterizar la Adenilil Ciclasa. Para esto fue necesario poner a punto un método de ruptura que permitiera obtener las correspondientes fracciones celulares donde investigar dicha actividad, y analizar la distribución subcelular que presenta dicha enzima. Para esto se procedió según lo descrito en Mat y Met.

**Tabla 4**

MÉTODOS DE RUPTURA	FRACCION	ACTIVIDAD ESPECIFICA (pmoles/min x mg prot.)	
		Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
Sonicación	Sedimento 1000 g	20,00	50,40
	Sedimento 5000 g	14,20	35,20
	Sobrenadante 5000 g	-	-
Homogeinización (Potter)	Sedimento 1000 g	37,70	107,10
	Sedimento 5000 g	31,72	76,20
	Sobrenadante 5000 g	-	-
Homogeinización - Cong./ Descong.	Sedimento 1000 g	42,00	117,40
	Sedimento 5000 g	35,00	81,10
	Sobrenadante 5000 g	-	-
Molienda con N <sub>2</sub> líquido	Sedimento 1000 g	33,60	134,40
	Sedimento 5000 g	10,20	40,70
	Sedimento 105000 g	30,50	122,00
	Sobrenadante 105000 g	-	-

Como se observa en la presente tabla, la actividad enzimática fue detectada sólo en membrana, no así en citoplasma. Dicha distribución subcelular, que es coincidente con la previamente descrita para *T. cruzi* (Torruella, M. et al. 1986), demuestra la localización de esta



enzima en la membrana, al igual que en eucariotas superiores y a diferencia de lo conocido para procariotas (localización citoplasmática y/o débilmente unida a membrana).

Asimismo los datos obtenidos permiten también extraer las siguientes conclusiones:

- Con los tres primeros métodos usados no se pudo obtener el sedimento correspondiente a membranas, ya que la ruptura no fue total, y la mayor actividad sedimentó a velocidades correspondientes a células enteras y parcialmente rotas.
- El método de sonicación fue descartado, ya que como puede apreciarse, produjo una inactivación parcial de la enzima.
- El método de elección es la molienda en presencia de  $N_2$ , el cual fue el único que permitió obtener el sedimento a 105000 g, es decir la fracción correspondiente a membranas. A pesar de eso la ruptura nunca fue total ya que se obtuvo una actividad apreciable de la enzima también en las otras fracciones.

En el caso de *T cruzi*, el proceso de congelamiento y descongelamiento permite obtener una ruptura eficiente (Ogueta S.B., Solari A., Tellez - Iñon M.T. FEBS letters 337 (1994) 293-297). En nuestro caso en cambio, el método adecuado para obtener las membranas es también usado para otro tipo de células (por ej. tejido vegetal), las cuales además de la membrana poseen pared celular, estructura que no está presente en estos parásitos. Estos datos tomados en conjunto podrían estar dando indicios de una membrana de composición diferencial de las *Phytomonas* respecto de los otros miembros de la familia de los Trypanosomátidos.

Para profundizar esta apreciación, es útil traer a colación en este punto lo reportado en el trabajo de Attias M., and de Souza W.,(1992), en el cual se señala que si bien todos los aislados de parásitos de diferentes cepas de *Phytomonas* presentan un patrón de membrana como los previamente observados en otros trypanosomatidos, existen dos diferencias marcadas:

- La membrana no es lisa sino ondulada, lo que sugiere rotación del cuerpo celular (esto mismo se observa en microscopia electrónica de barrido Fig. 20 Introd.)
- La membrana flagelar es más rica en partículas que las de la mayoría de los trypanosomátidos analizados.

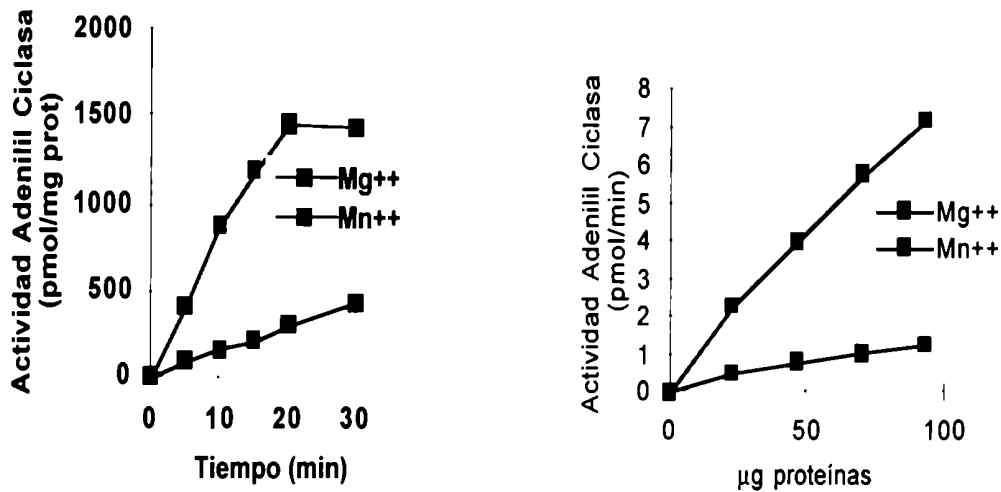
Con esta observación se quiere señalar la importancia de la estructura de la membrana como marco ineludible del proceso de transducción

de señales. Lo que en este estudio se revela como una dificultad experimental para la obtención del material de trabajo, puede constituir un enfoque diferente a ser tenido en cuenta en el abordaje de los sistemas de transducción de señales cuya profundización requiere del uso de otras técnicas que escapan del objetivo de esta tesis. En este caso se señala a fin de destacar el contexto físico donde interaccionan las proteínas que constituyen el sistema de transducción y que son motivo de este estudio.

### Propiedades cinéticas

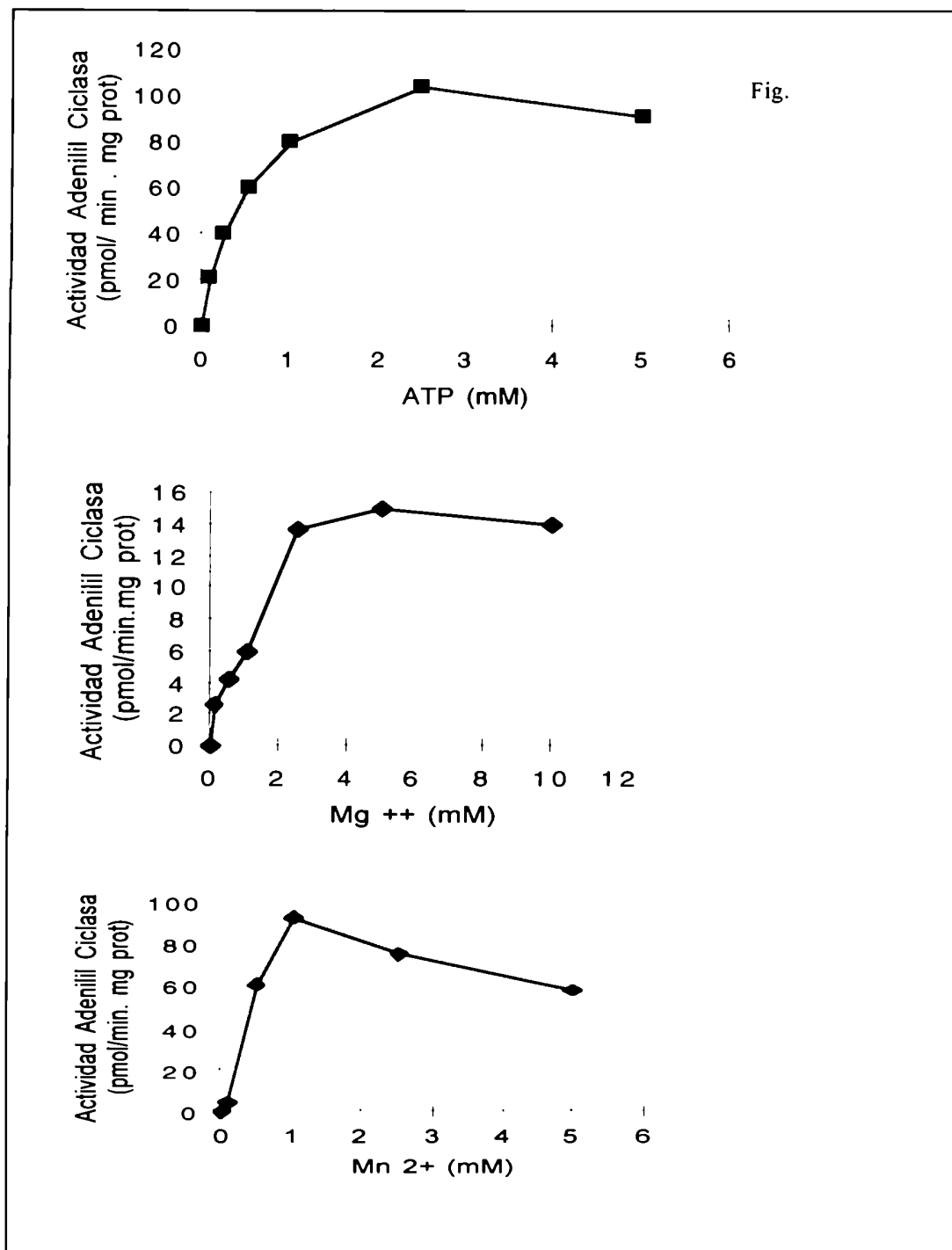
Una vez detectada la localización subcelular de la actividad enzimática, se determinaron sus propiedades cinéticas. En primer lugar se determinaron la concentración de proteínas y tiempo de incubación óptimos. (Fig27 )

Fig .27



La producción de AMPc se mantuvo lineal hasta los hasta los 100 µg de proteínas, durante 20 minutos para  $Mn^{2+}$  y hasta 30 minutos para  $Mg^{2+}$ . Con estos datos se investigó cuáles son las concentraciones adecuadas de ATP y cationes divalentes ( Fig. 28).

Fig 28



La concentración adecuada de ATP fue para los ensayos regulatorios fue 0.5 mM. La de cationes divalentes fue 1mM para Mn<sup>2+</sup> y 2.5 para Mg<sup>2+</sup>.

**Efecto de los moduladores de la actividad de adenilil ciclasa en eucariotes superiores.**

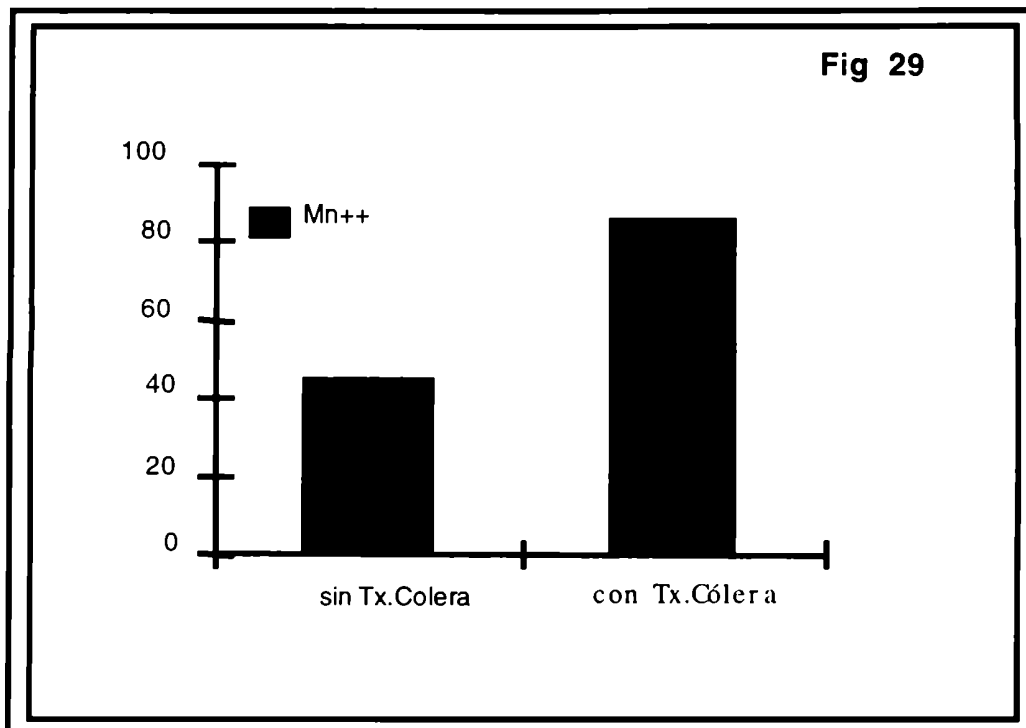
Tabla 5

Exp.	Preincubación	Catión	Otros agregados	Adenilil Ciclasa (pmol / min.mg)
1	—	Mn <sup>2+</sup>	—	43.7± 0.4
	—	Mg <sup>2+</sup>	—	18.1± 1.3
	—	Mg <sup>2+</sup>	10 mM GTP	17.2± 1.6
	—	Mg <sup>2+</sup>	10 mM GDP	16.8± 0.7
	—	Mg <sup>2+</sup>	10 mM GTPγS	15.5± 1.7
	—	Mg <sup>2+</sup>	10 mM GDPβS	17.5± 1.2
	—	Mg <sup>2+</sup>	1 mM NaF	18.1± 1.2
	—	Mg <sup>2+</sup>	0.1 mM CaCl <sub>2</sub>	12.3± 1.1
2	Sin Toxina	Mn <sup>2+</sup>	10 mM GTPγS 10mM NAD	44.1± 1.5
	Sin Toxina	Mg <sup>2+</sup>	10 mM GTPγS 10mM NAD	6.5± 0.4
	Con Tox. Cólera	Mn <sup>2+</sup>	10 mM GTPγS 10mM NAD	85.1± 1.2
	Con Tox. Cólera	Mg <sup>2+</sup>	10 mM GTPγS 10mM NAD	11.0± 0.8
	Con Tox. Pertusis	Mn <sup>2+</sup>	10 mM GDP βS 10mM NAD	48.6± 0.6
	Con Tox. Pertusis	Mg <sup>2+</sup>	10 mM GDP βS 10mM NAD	6.7± 0.2

Como puede observarse, no se logra activación con los moduladores habituales de la actividad de Adenilil ciclasa vía proteínas G. Una situación similar se vio en el caso de *Dictiostelium discoideum* (Theibert et al. 1986), pero en este caso, sin embargo se logró detectar la activación rompiendo las células en presencia del

modulador (GTP, GTP $\gamma$ S, etc.). Esto les sugirió a los autores que la dificultad de detección de esta influencia era debida al desacople del sistema al momento de la ruptura, lo cual fue superado preincubando con el agonista y los moduladores antes de la misma, ya que sólo aquellas proteínas que permanecieran acopladas al receptor serían susceptibles de ser estimuladas y el progresivo desacople que acompaña a la ruptura de la célula impediría observar dicho efecto. Esta misma situación, en nuestro caso no arrojó ningún resultado positivo, aunque también hay que señalar que los métodos de ruptura usado en nuestro caso es mucho más drástico. Sin embargo, si uno compara los basales sin ningún agregado entre ambos organismos, el basal de *Disctiostelium* es menor que el de *Phytomonas* ( 5 pmoles/min . mg frente a 18 pmoles/min . mg). Esta diferencia podría estar indicando un estado de activación basal no regulable, más que un desacople del sistema. (lo mismo ocurre comparando el basal de otro eucariote inferior como el *Schistosoma mansoni*, cuya activación por los mismos reguladores es apreciablemente detectable -Estey et al. 1988-). En este punto cabe también traer a colación, la actividad basal no regulable detectada en la expresión tanto de las ciclasas clonadas en *T. brucei* (Paindavoine et al 1992) como *Leishmania donovani* (Sanchez et al. 1995), las cuales poseen actividad sin el agregado de ningún ligando en particular.

Esto sin embargo no va en detrimento de la posible regulación adicional vía proteína G. Por el contrario, y tal como se observa en el experimento 2, el pretratamiento de las membranas con Tóxina de Cólera implica una activación cercana al 100 % (Fig 29 )



La visualización de la regulación a través de la acción de la toxina colérica se puede explicar teniendo en cuenta:

-“La unión covalente de la mitad ADP-ribosa del NAD a la subunidad  $\alpha$  de la Gs resulta en la activación irreversible de la proteína Gs y consecuentemente de la adenilil ciclasa. Un reflejo de este tipo de activación de la Gs es que el GTP se transforma en un muy potente activador de la ciclasa, mientras que previo a la intoxicación es extremadamente débil.”( Kahn1991).

- “La ADP-ribosilación de  $G_{\alpha s}$  catalizada por la toxina del Cólera altera el efecto de los nucleótidos de guanina sobre la función de  $G_{\alpha s}$ . Primero, la ADP-ribosilación incrementa la sensibilidad a los efectos estimulatorios del GTP, presumiblemente por inhibición de la actividad GTPásica y prolongando en consecuencia la vida media de las especies activas; segundo, la ADPribosilación promueve la liberación del GDP unido, facilitando la unión de GTP; y tercero ADP-ribosa-  $G_{\alpha s}$  se disocia más fácilmente para dar lugar a  $G\beta\gamma$  y la especie activa ADP-ribosil-  $G_{\alpha s} \cdot GTP$ ” (Moss et al. 1991)

Estos argumentos, junto con el estado de activación basal podrían explicar el encubrimiento del efecto GTP y la visualización de la regulación únicamente previa intoxicación con la toxina. Esto permite aseverar que la actividad de adenilil ciclasa se encuentra bajo el control de una regulación del tipo  $G\alpha_s$ .

Por otra parte, no se detecta efecto ni de GDP ni de toxina Pertusis. Esto no descarta una posible regulación de la Adenilil ciclasa por parte de una proteína de tipo  $G\alpha_i$ , ya que como ocurre en eucariotas superiores, el efecto regulatorio de tipo inhibitorio sólo se visualiza posteriormente a la activación por acción de un ligando.

Tampoco pudo detectarse efecto de Forskolina. Esta falta de activación se da también en *T. cruzi*. Es esta limitación lo que se traduce en tener que recurrir a una estrategia de tipo molecular para caracterizar en forma eficiente a la adenilil ciclasa de estos parásitos, dado que los protocolos bioquímicos existentes para proceder a la purificación a homogeneidad de este tipo de enzimas minoritarias de membranas, implica el uso de una columna de afinidad. En el caso de la adenilil ciclasa, la columna adecuada es una matriz de agarosa conjugada a Forskolina (Pfeuffer et al. 1991).

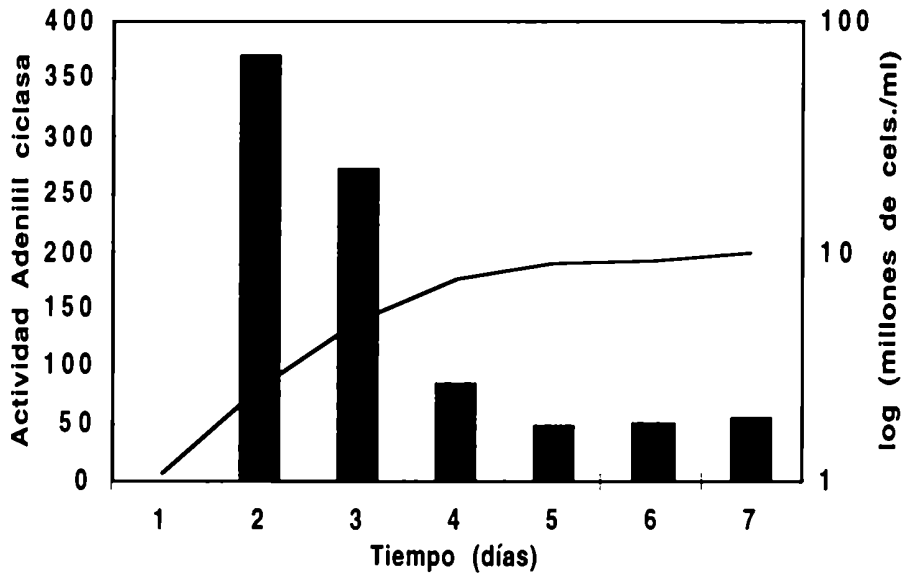
Se ha avanzado bastante en el estudio estructural de este tipo de enzimas, especialmente a través del clonado de las mismas y la expresión de diferentes dominios en quimeras, lo que permite sacar conclusiones importantes acerca de la correspondencia entre estructura y función. Las proteínas susceptibles al estímulo con Forskolina no comparten ninguna homología de secuencia obvia que permita predecir una zona responsable de esta interacción. Por el contrario, siendo la forskolina un diterpeno altamente lipofílico, se presumía que la zona de interacción correspondía a los dominios transmembranas. Sin embargo en un trabajo reciente de Gilman y colaboradores (Tang et al. 1995), se obtiene una quimera soluble con actividad catalítica que es activable por forskolina. Dado que en dichas quimeras los dominios transmembrana están ausentes, la teoría previa queda descartada. En consecuencia, no es posible deducir a partir de la secuencia aminoacídica la dependencia o no de forskolina.

## Variación de la actividad a lo largo de la curva de crecimiento

Para la detección de la variación de la actividad de Adenilil ciclasa, se procedió según se detalla en Mat. y Met. para extractos crudos. Sólo fue posible la determinación a partir del día 2 de la curva, debido al escaso rendimiento de los cultivos. El resultado se observa en la Fig30

Fig. 30

Actividad de Adenilil ciclasa durante la curva de crecimiento



Notoriamente, un comportamiento similar ha sido reportado para el estadio procíclico de *T. brucei* (Rolin S et al. 1993). En este caso, se detecta un máximo en la actividad de Adenilil ciclasa a la 40 hs.



aproximadamente y luego de las 48 hs comienza a decrecer, hasta alcanzar la establecida para las formas procíclicas. Este pico aparece inmediatamente a continuación de la duplicación del número de células. Como puede apreciarse, dicha situación se repite en el caso de *Phytomonas*.

### Efecto de hormonas vegetales

Teniendo en cuenta que la membrana de *Phytomonas* tiene una actividad de adenilil ciclase regulable por proteínas G, por homología con los sistemas descritos en mamíferos, se testeó la posibilidad de que la señal específica para este sistema fuesen las hormonas vegetales.

**Tabla 6**

Agregados	Actividad específica pmol/mg prot .min Mg <sup>2+</sup> +GTP
Ninguno	12.50
Acido Indol Acético (A) 10 <sup>-3</sup> M	13.70
Acido Indol Acético (A) 10 <sup>-5</sup> M	13.00
Acido 2,4 Diclorofenoxiactico (A) 10 <sup>-3</sup> M	12.70
Acido 2,4 Diclorofenoxiactico (A) 10 <sup>-5</sup> M	13.10
Kinetina (C) 10 <sup>-3</sup> M	11.60
Kinetina (C) 10 <sup>-5</sup> M	12.40
6-Benzilaminopurina 10 <sup>-3</sup> M	11.00
6-Benzilaminopurina 10 <sup>-5</sup> M	11.30
Acido Giberélico 10 <sup>-3</sup> M	12.00
Acido Giberélico 10 <sup>-5</sup> M	12.30
Acido Absícico 10 <sup>-3</sup> M	14.00
Acido Absícico 10 <sup>-5</sup> M	13.60

(A) Auxinas

(C) Citoquininas

Si bien las hormonas vegetales fueron descriptas ya hace mucho tiempo, sin embargo su mecanismo de acción (posibles receptores-efectores, presencia de proteínas G involucradas en este tipo de respuesta, etc.) no ha sido aún dilucidado. Si bien a través de los resultados obtenidos no se puede vincular a las mismas con el sistema descripto en las membranas del parásito, tampoco se puede descartar una posible interacción vía otro camino de transducción. Por otro lado si bien los mecanismos de transducción de señales son muy conservados y las diferencias fenotípicas entre una cepa u otra no podrían ser atribuidas a la presencia o no de estos sistemas (Ver resultados preliminares con una cepa patógena), no hay que dejar de considerar que la cepa analizada en este caso, parasita una zona especializada en la defensa de la planta, como lo es el látex , y hasta tanto no se conozcan los mecanismos específicos de respuesta a las hormonas vegetales, no se puede descartar la interacción de alguna de ellas con los componentes del sistema de transducción de las otras cepas que parasitan por ej. el floema (Nota: las hormonas vegetales no circulan por el floema como si fuese la circulación sanguínea, sino que tienen una ubicación localizada según sea inducida por una determinada circunstancia en una gama amplia de tejidos. Existen dentro de los distintos tejidos células capaces de producirlas y no órganos especializados)

## **PROTEÍNAS G DE *PHYTOMONAS***

La detección de una actividad de Adenilil Ciclasa regulable por acción de la toxina colérica, constituye el primer indicio de la presencia de proteínas de tipo G en membranas de *Phytomonas*. Es a partir de este dato funcional que se decidió encarar la detección y caracterización de este tipo de proteínas en el material en estudio. Para el logro de este objetivo se diseñaron los tres enfoques que se describen a continuación

### **Enfoque Bioquímico**

Dado el bajo rendimiento de los cultivos y teniendo en cuenta la poca estabilidad de las proteínas G lo cual dificulta enormemente cualquier proceso de purificación, se eligió a la membrana como material de estudio ya que permite la caracterización de dichas proteínas de manera satisfactoria, priorizando un enfoque funcional en esta etapa, posponiendo la purificación y caracterización molecular para una etapa posterior.

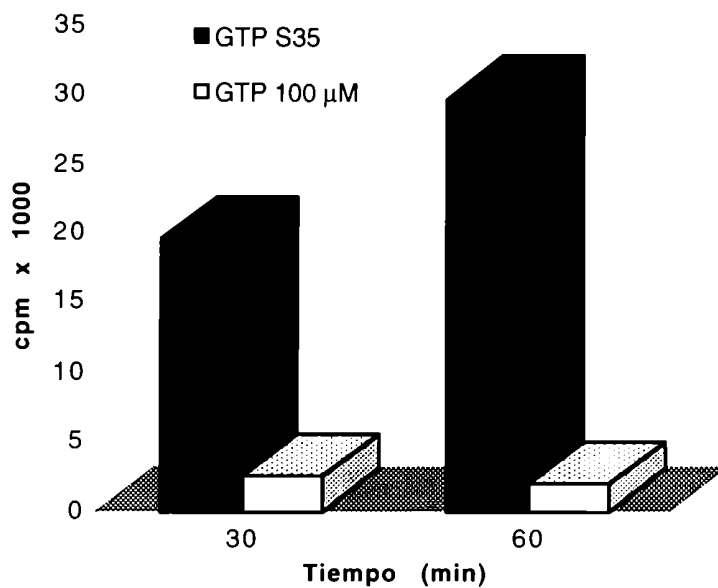
### **Ensayo de unión de GTP $\gamma$ S [ $^{35}$ S] en membranas de *Phytomonas* (Binding)**

El ensayo de unión de [ $^{35}$ S]GTP  $\gamma$  S, si bien es la más inespecífica de las pruebas usadas en la caracterización de las proteínas G (Codina et al 1991), permite detectar a las proteínas capaces de unir GTP (familia que involucra a las proteínas G heterotriméricas -Ver Introd.-). En estos ensayos se usa un análogo no hidrolizable como el [ $^{35}$ S]GTP  $\gamma$  S que conserva sin embargo la capacidad de unión a sitio específico, sin perder la marca como consecuencia de la actividad GTPasa intrínseca de estas proteínas.

Detectada la unión específica de GTP por desplazamiento con el nucleótido no radioactivo, Fig 10 (en todos los casos la unión inespecífica no superaba el 15 %), se procedió a determinar las condiciones óptimas del ensayo de unión de [ $^{35}$ S]GTP  $\gamma$  S. Fig 31 y 32 .

### Determinación de unión específica de GTP

Fig 31



### Variación con el tiempo de incubación

Las proteínas G en membranas de *Phytomonas* mostraron una unión específica con un comportamiento lineal entre los 10 minutos a 1 hora de incubación del ensayo (Fig 32 )

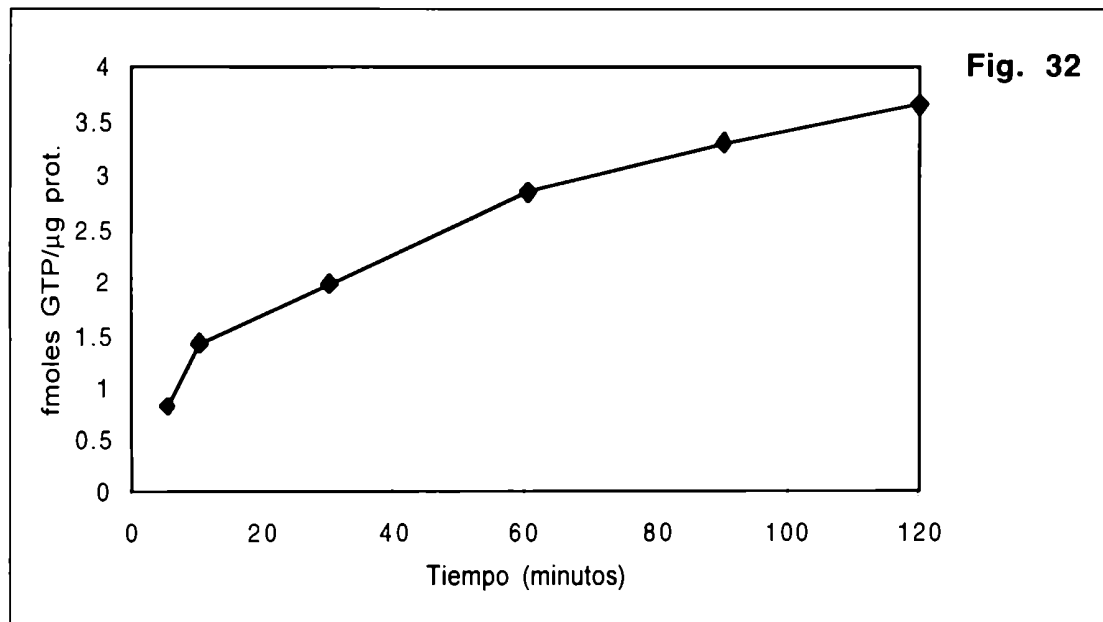
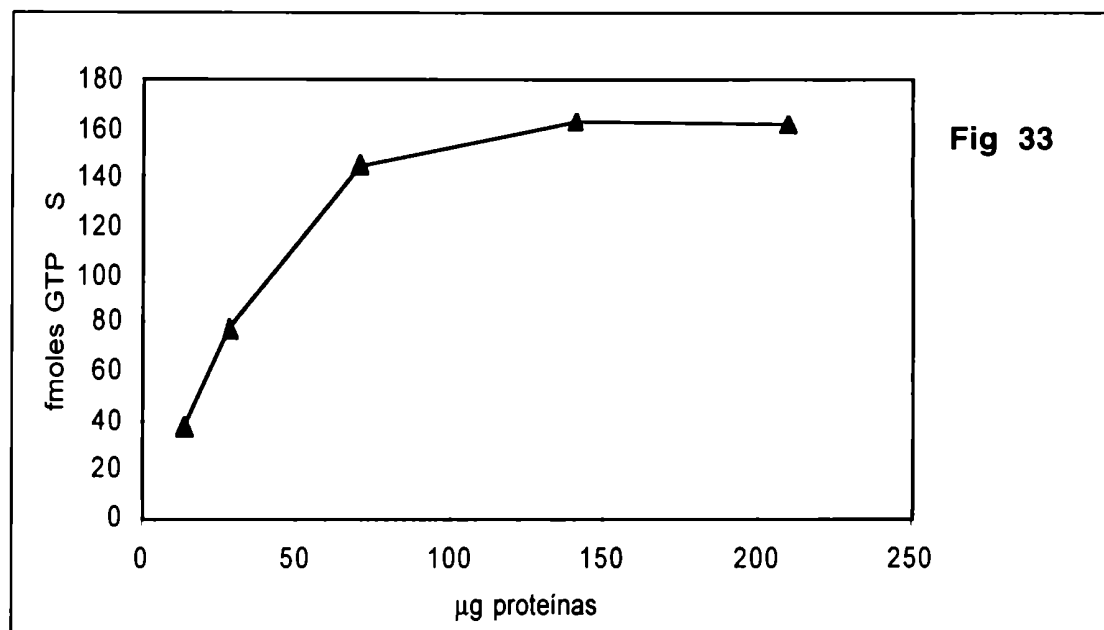


Fig. 32

### Variación con la cantidad de proteína usada en el ensayo

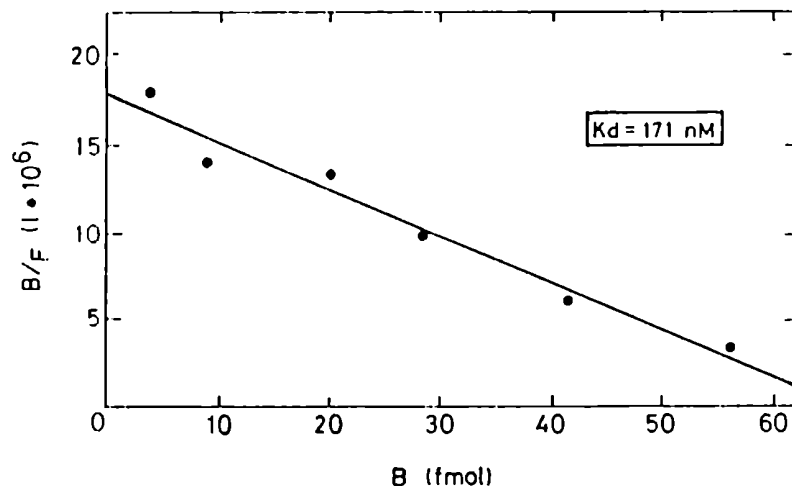
La Fig.33 muestra que en el rango entre 10 y 75 mg el comportamiento es lineal, saturándose cuando la concentración alcanza los 150 mg.



### Análisis de Scatchard

El análisis de Scatchard permitió definir la existencia de un sitio de unión con un  $K_d$  en el orden de los reportado en la bibliografía (Pfeuffer y Pfeuffer, 1991), pero en un rango algo superior. Fig 34.

Fig 34



Las propiedades descritas a través de los experimentos precedentes indican un comportamiento muy similar al observado en *T.cruzi* por parte de las membranas de *Phytomonas* (Coso, O. Tesis Doctoral).

### Unión específica de GTP $\alpha$ [<sup>32</sup>P] por fotoafinidad (cross-linking)

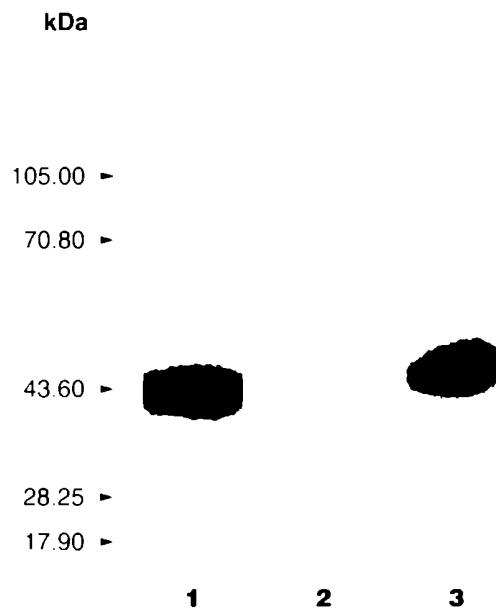
Con el propósito de seguir avanzando en la caracterización de las proteínas capaces de unir GTP detectadas en los ensayos precedentes, y a fin de determinar el rango de peso molecular de las entidades proteicas en estudio, se realizó el ensayo de cross-linking de GTP $\alpha$ [<sup>32</sup>P] a preparaciones de membranas.

Este método ha sido usado por varios grupos para identificar sitios de unión en proteínas, por ejemplo, ATP en miosina (Maruta et al, 1981), GTP en tubulina (Nath et al, 1985)(Linse et al, 1988). La reacción inducida por luz UV a 254 nm, usualmente involucra decarboxilación y unión covalente de la proteína a la base del nucleótido, a través de los residuos ácidos asparragina y glutamina.

La ventaja de la reacción fotoafínica directa sobre otros análogos fotoquímicos, es que el ligando natural es el que queda finalmente unido.

A su vez la naturaleza covalente de la unión permite analizar el producto en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) y obtener el peso molecular respectivo, que por comparación con los de otras proteínas G ya estudiadas permite sumar datos tendientes a confirmar con certeza, desde un punto de vista bioquímico, la identidad de las proteínas en estudio.

Como se observa en la Fig 35, el resultado de este ensayo permite la identificación de una ancha banda de peso molecular en un rango de entre 43 y 44 kDa (calle 1), cuya especificidad se demuestra al desaparecer la banda marcada al coincubar en presencia de GTP 1mM (calle 2), y persistir en cambio al coincubar con ATP 1mM (calle 3).



**Fig.35** : Calle 1 GTP $\alpha$ [P<sup>32</sup>] más luz UV; calle 2 GTP $\alpha$ [P<sup>32</sup>] más luz UV incubado en presencia de GTP 1 mM; calle 3 GTP $\alpha$ [P<sup>32</sup>] más luz UV incubado en presencia de ATP 1mM

Como puede apreciarse el rango del peso molecular de la banda detectada corresponde al esperado para una subunidad  $G\alpha$  (Tabla 4)(Kazirot et al 1991).

Espezie	Tamaño (kDa)*
<b>Mamíferos</b>	
hG $\alpha$ s-1 y hG $\alpha$ s-2	52
hG $\alpha$ s-3 y hG $\alpha$ s-4	45
hG $\alpha$ i1 y hG $\alpha$ i3	41
hG $\alpha$ i2	40
hG $\alpha$ o	39
bG $\alpha$ t1	39
bG $\alpha$ t2	40
<b>Levaduras</b>	
<i>S.cerevisiae</i>	
GP1a	54
GP2a	50
<i>S.pombe</i>	
GP1a	46
<i>Dictiostelium(D.discoideum)</i>	
G $\alpha$ 1 y G $\alpha$ 2	41
<b>Plantas(A. thaliana)</b>	
GP1a	45

h, humano; r, rata; b, bovino

\*Tamaño según la distancia migrada en un gel de poliacrilamida con SDS.



## ADP-ribosilación

La toxinas bacterianas (Cólera y Pertusis) se utilizan como herramientas para identificar e investigar el rol funcional de las proteínas G en los sistemas biológicos. Estas toxinas modifican covalentemente la subunidad  $\alpha$  de algunas proteínas G catalizando la transferencia del grupo ADP-ribosa proveniente del  $\text{NAD}^+$  a aminoácidos específicos, modificando en consecuencia la actividad biológica de la dicha proteína G. Usando  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$ , es posible monitorear la incorporación de  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ADP-ribosa}$  a estas proteínas e identificarlas por autoradiografía. Por lo tanto sólo pequeñas cantidades de un extracto proteico crudo alcanzan para identificar y caracterizar inicialmente a una clase general de proteínas G. En este punto cabe aclarar que si bien la ADP-ribosilación es un aspecto determinante no debe ser considerada como la única herramienta con la cual establecer la identidad y el/los rol/es de las proteínas G en la transducción de señales intracelulares (Kopf y Woolkalis, 1991).

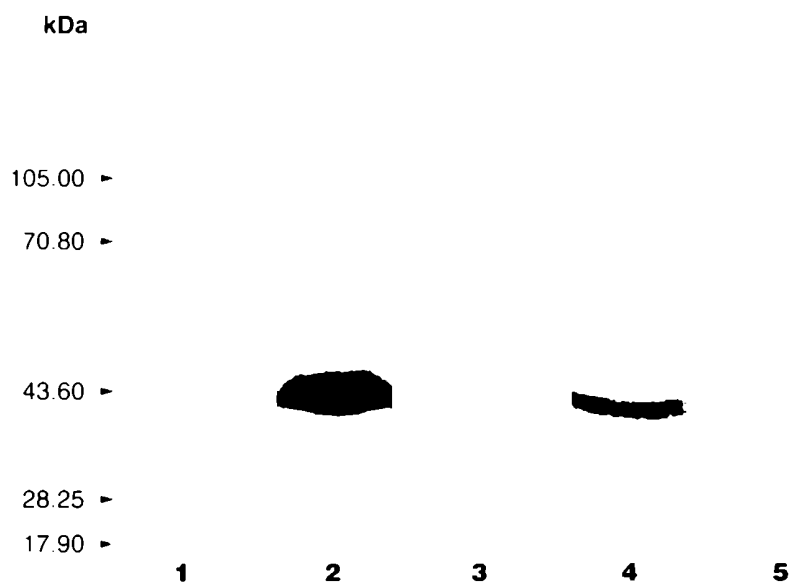
En nuestro caso se trabajó con membranas y luego de realizada la reacción de ADP-ribosilación se desnaturalizó el producto con el agregado de cracking buffer y se analizó por autoradiografía *previa* a la corrida en gel de poliacrilamida más SDS. Fig 36.

En todos los casos se realizaron los siguientes controles:

**Reacción toxina específica** - la muestra incubada con todos los reactivos, excepto la correspondiente toxina. Esto permite discriminar las proteínas que pudieran marcarse en forma no específica debido a la presencia de otras glicohidrolasas presentes en la membrana (por ej. la Poly(ADP-ribosa) polimerasa, que algunas veces puede aparecer como un péptido marcado de 110,000 kDa), también por presencia de  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ADP-ribosa}$  junto con el  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$ , que también puede aumentarse por acción de NADasa presente en la membrana plasmática.

**Proteína ADP-ribosilada** - la muestra incubada en presencia de un exceso de  $\text{NAD}^+$  no radioactivo (300 $\mu\text{M}$  final), lo que debería disminuir en gran medida o eliminar la detección de proteínas susceptibles a la transferencia enzimática de el grupo ADP-ribosa a partir del  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$  por parte de las toxinas.

**Fig 36**



**Fig 36** Calle 1: Incubación con [ $^{32}$ P]NAD $^{+}$  en ausencia de toxina; calle2 : incubación en presencia de toxina del Cólera; calle 3: incubación en presencia de tox. del Cólera mas el agregado de 300  $\mu$ M NAD $^{+}$  frío; calle 4 incubación en presencia de toxina Pertusis; calle 5 :incubación en presencia de tox. Pertusis mas el agregado de 300  $\mu$ M NAD $^{+}$  frío.

Como puede apreciarse en la Fig 36, en la calle 1 se corrió el control de la reacción toxina específica, en las calles 3 y 5 los controles correspondientes a la proteína ADP-ribosilada, y en las calles 2 y 4 se detecta la presencia de 2 bandas específicas cuyos pesos moleculares de entre 43 a 44kDa corresponden al rango ya detectado en el ensayo anterior (Fig 14). La resolución de este gel no permite discriminar con exactitud la diferencia entre los pesos moleculares de ambas bandas. A esta limitación debemos sumar posiblemente la modificación del patrón de corrida dada por la unión covalente del grupo ADP-ribosa, como así también el tipo de señal dada por la marca radioactiva (banda gruesa, que no permite distinguir diferencias entre proteínas de pesos moleculares cercanos).

La toxina del Cólera ADP-ribosila a las  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha olf}$  y  $G_{\alpha t}$  (Ver Introd.) en un residuo Arg y el sustrato no necesita estar unido a GDP. En algunos casos está reportada la aparición de otras bandas, principalmente de bajo peso molecular (22 a 25 kDa) como así también la detección de una banda de 28 kDa correspondiente al fragmento A1 de la toxina del cólera. En nuestro caso sólo se detectó la presencia de una banda dentro del rango correspondiente a una subunidad  $\alpha$ , superando así las dudas acerca de la identidad de dicha proteína ya que se cumplen con los criterios más importantes que hacen a este ensayo (1- tamaño molecular; 2- las subunidades tipo  $G_{\alpha s}$  son las que más fácil y rápidamente se marcan) (Gill y Woolkalis 1991).

La toxina Pertusis cataliza la ADPribosilación de la subunidad  $\alpha$  de  $G_i$ , transducina,  $G_o$  y  $G_{\alpha t}$  (Neer, 1995 recop.). Esta modificación covalente se da en un residuo cisteína localizado cerca del carboxilo terminal de la proteína, provocando el desacople de la misma de su receptor. Aparentemente para que se esta reacción se produzca es necesario la presencia del heterotrímero intacto (Neer et al. 1984), es así que en algunos de los experimentos realizados se pudo apreciar un aumento de la incorporación de la marca radioactiva cuando la incubación se llevó a cabo en presencia de  $GDP\beta S$ .

## Enfoque inmunológico

Con el objeto de profundizar la caracterización e identificación de las proteínas detectadas en los ensayos anteriores, se utilizaron diferentes anticuerpos obtenidos a partir de la inmunización de conejos con péptidos (acoplados a proteínas transportadoras) sintetizados de acuerdo a la secuencias nucleotídicas de las subunidades de proteínas G conocidas. El uso de antisueros obtenidos a partir de péptidos es particularmente útil, ya que se pueden obtener anticuerpos de especificidad determinada eligiendo los péptidos con secuencias características de una subunidad dada o común a una familia de subunidades. En nuestro caso estos anticuerpos se utilizaron para la identificación en Western blotting (Mat. y Met. ) de las secuencias proteicas en estudio (Mumby y Gilman , 1991).

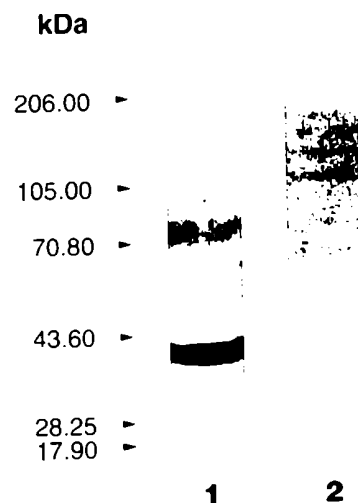
A continuación en la Tabla 8 se detallan los anticuerpos policlonales utilizados:

Denominación	Especificidad	Región reconocida	Secuencia aminoacídica
AS/7 o9191	$\alpha_1, \alpha_{i1}, \alpha_{i2}$	COOH terminal	KENLKDCGLF
9188/9189	$\alpha_s$	COOH terminal	CRDIIQRMHLRQYELL
9193 o GA/1	$\alpha_{común}$	sitio de unión de GTP	GAGESGKSTIVKQMK
SW/1	$\beta_{común}$	COOH terminal	
$\beta$ -636*	$\beta_1$	residuos 26-39 G $\beta_1$ humana	ADATLSQITNNIDP
$\beta$ -637*	$\beta_2$	residuos 26-39 G $\beta_2$ humana	GDSTLTQITAGLDP
$\beta$ -638*	$\beta_3$	residuos 26-39 G $\beta_3$ humana	ADVTLAELVSGLEV

\*Cedidos gentilmente por Dr. B.K.K. Fung (Lee et al 1992 -Lee, R.H., Lieberman BS, Yamane HK, Bok D y Fung BKK; 1992,JBC Vol 267, N34 pp24776-24781).

**Anti Gxi La** Fig 37 se muestra el resultado obtenido al incubar los filtros de nitrocelulosa con una solución del anticuerpo AS/7 (9191). En la calle 1 se puede observar una banda de 43 kDa que no es revelada por el suero preinmune (calle2). En este experimento el título del anticuerpo usado corresponde a una dilución 1/500 visulizándose dicha banda hasta diluciones del anticuerpo 1/1000. En este caso se utilizó el filtro proveniente de la transferencia a nitrocelulosa del ensayo de ADP-ribosilación (Ver Mat y Met), por lo que la banda reconocida por el anticuerpo coincide con el polipéptido marcado en forma específica en la reacción catalizada por toxina pertusis (Fig. 37)

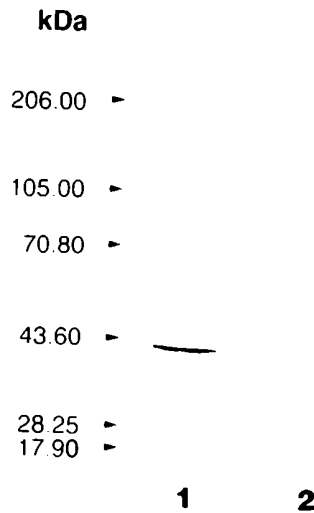
**Fig 37**



**Fig. 37:** calle 1, anti AS/7; calle 2, suero preinmune

**Anti  $G\alpha_s$ :** La Fig 38 muestra el resultado obtenido con el anticuerpo 9188/9189 con un título correspondiente a una dilución 1/200, que alumbra una banda de peso molecular de aproximadamente 43,6 kDa (calle 1), que no aparece cuando el antisuero empleado es suero normal de conejo o suero preinmune (calle2). En este caso se utilizó el filtro proveniente de la transferencia a nitrocelulosa del ensayo de ADP-ribosilación (Ver Mat y Met), por lo que la banda reconocida por el anticuerpo coincide con el polipéptido marcado en forma específica en la reacción catalizada por toxina del cólera (Fig 36)

**Fig 38**



**Fig. 17:** calle 1, antisuero 9188; calle 2, suero preinmune.

**Anti  $G\alpha_{común}$  y anti  $G\beta$ :** utilizando el anticuerpo 9193 no pudo ser detectada ninguna banda específica. En lo que se refiere a  $G\beta_{común}$  y  $G\beta_{específico}$  (detalladaos en Tabla 8), no fue posible diferenciar una banda específica respecto de la reacción cruzada dada por los respectivos sueros preinmunes.

Como puede apreciarse de las Fig 37 y 38, existe una pequeña diferencia de pesos moleculares entre los polipéptidos reconocidos por los respectivos anticuerpos. La banda reconocida por el antisuero anti  $G\alpha_s$  y que es ADP-ribosilada por toxina del cólera es de mayor peso molecular (43,6 kDa), que el polipéptido reconocido por el antisuero anti  $G\alpha_i$  y ADP-ribosilado por toxina pertusis. Estos datos tomados en conjunto indicarían que la existencia de dos entidades proteicas y no una misma subunidad sustrato de las dos toxinas y con ambos epitopes.

Así, de las mismas figuras es notorio que la intensidad de la banda reconocida por  $G\alpha_s$  es menor que la reconocida con el anticuerpo AS/7, a pesar que la dilución del anticuerpo en el primer caso es menor.

Una situación similar se observó cuando ambos anticuerpos fueron ensayados con las membranas de *T. cruzi*. Si bien esto podría adjudicarse a una mayor expresión de las proteínas Gi con respecto a  $G_s$ , como esta descrito para mamíferos, los datos presentados no son en absoluto pruebas suficientes para poder afirmar esto.

Por el contrario, la causa podría deberse a la reactividad de dichos anticuerpos como consecuencia de la antigenicidad de los péptidos utilizados para la obtención de los mismos. La experiencia en nuestro laboratorio acerca de los mejores resultados comparativos del uso de AS/7 respecto de los antisueros que reconocen los epitopes  $G\alpha_s$  específico (Muschiatti, Tesis doctoral -Prot. G de alfalfa-, Coso, Tesis doctoral -Prot. G de *T. cruzi*), es un sólido argumento a favor de esta causa. Más aún, si consideramos que son antisueros heterólogos, obtenidos a partir de péptidos, que si bien corresponden a zonas altamente conservadas, una substitución en un sólo aminoácido puede cambiar dramáticamente la reactividad de un determinado antisuero (Gao B, et al. 1987).

Este último argumento es válido también para entender la falta de reactividad de los antisueros que reconocen zonas específicas de la subunidad  $G\beta$ .

Para el caso de la falta de reactividad del antisuero anti  $G\alpha_{común}$  este último argumento estaría además respaldado por los siguientes datos:

- Existen 2 reportes de substitución de un aminoácido en la zona conservada de unión de GTP, en dos especies más relacionadas con tripanosomatídeos como son *Dictiostelium discoideum* y *Leishmania donovani*. En ambos casos la alanina de la secuencia GAGES es reemplazada por una prolina (Hadwiger, et al., 1991).

- “La falla de antisueros realizados contra subunidades  $\alpha$  que puedan tener reacción cruzada contra otras subunidades es sorprendente dada la alta homología de secuencia de estas zonas; en particular, las regiones correspondientes a dominios de unión de GTP que muestran una total conservación. Esto implicaría que estas zonas son pobremente antigénicas” (Spiegel A., 1990).

Las evidencias anteriores (enfoque bioquímico e inmunológico) confirman la presencia de proteínas de tipo G heterotriméricas, por lo menos en lo que respecta a las características de las subunidades  $\alpha$ :

- Localización en la membrana
- Unión de GTP
- Sustrato de ADP-ribosilación con toxinas bacterianas
- Reconocimiento por parte de anticuerpos de zonas conservadas en subunidades de tipo  $\alpha_s$  y  $\alpha_i$ .
- Peso molecular en el rango correspondiente a este tipo de subunidades (aproximadamente 43 kDa para el polipéptido de tipo  $\alpha_i$ , y aproximadamente 44 kDa para el polipéptido de tipo  $\alpha_s$ )

Sin embargo a pesar de no haber podido poner en evidencia la presencia de una subunidad de tipo  $G\beta$ , el comportamiento funcional de la proteína cuyas características bioquímicas la homologan a una subunidad de tipo  $G\alpha_s$  ( Regula la actividad de ciclasa -Fig 29-), constituye una fuerte evidencia en favor de la presencia de una proteína G heterotrimérica.

Ante la imposibilidad de confirmar desde un punto de vista funcional, la presencia de una estructura heterotrimerica en lo que concierne al polipéptido con características de subunidad  $G\alpha_i$ , se diseñó el experimento que se detalla a continuación.



## Enfoque estructural

El Mastoparan (MP) es una toxina peptídica proveniente del veneno de avispa

La acción específica del MP sobre las proteínas G es promover el intercambio GDP/GTP a través de un mecanismo que es virtualmente idéntico al de los receptores unidos al agonista. MP cataliza el intercambio GDP/GTP a concentraciones submicromolares de  $Mg^{++}$  sin alterar la velocidad de hidrólisis del GTP unido. Su acción es bloqueada por la ADP-ribosilación catalizada por toxina pertusis y estimulada por la presencia de las subunidades  $\beta\gamma$ . El MP compete en la unión de las proteínas  $G_i$  y  $G_o$  con los receptores.

Cuando el MP se une a membranas fosfolipídicas forma una  $\alpha$  hélice anfifílica, presentando cuatro cargas positivas hacia la fase acuosa. Los sitios correspondientes al segundo y tercer lazo citoplasmático de los receptores, que son los que interaccionan con la proteína G, también se encuentran positivamente cargados y muy cercanos a la membrana. Por otra parte el cross-linking del MP a la subunidad  $\alpha$  es incrementada por la presencia de las subunidades  $\beta\gamma$ , lo que sugiere que el sitio de unión al mastoparan y a las subunidades  $\beta\gamma$  en la subunidad  $\alpha$  están muy ligados por lo menos en lo que respecta a la estructura funcional. (Higashijima, T et al. 1990; Higashijima y Ross 1991).

Basados en estos datos, se puede afirmar que el MP actúa como un mimetizador del dominio de unión a las proteínas G en los receptores y se une a las subunidades  $\alpha$  en su correspondiente sitio de unión al receptor. Por lo tanto puede ser utilizado para inferir la intervención de las proteínas G en determinados caminos transduccionales en sistemas donde no se ha identificado al receptor y/o ligandos (Por ej. el colapso de los conos de desarrollo de las células nerviosas es inducida por MP, siendo este efecto revertido por acción de la toxina pertusis - Igarashi M. et al. Science, vol 259 pp77-79, 1993-).

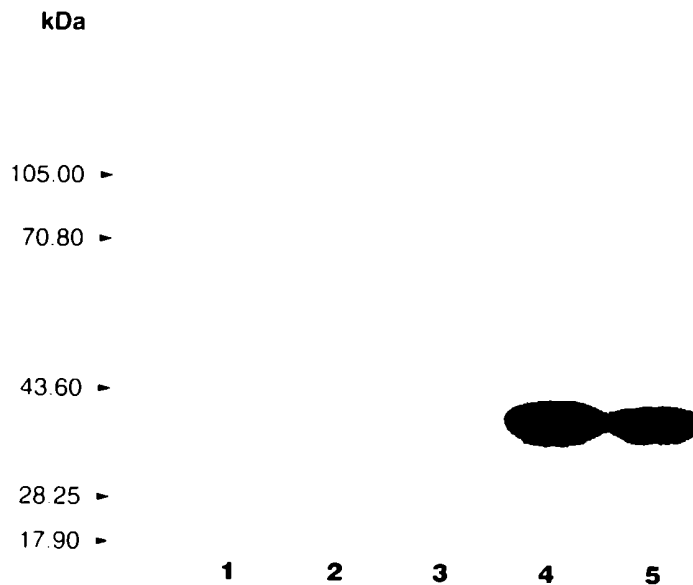
Si las proteínas G presentes en las membranas de *Phytomonas* son capaces de interaccionar con MP, debería producirse el desacople del putativo heterotrímero en sus respectivos componentes  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ . El aumento de las proteínas G en este estado tendría que verse reflejado en una disminución de la capacidad de la membrana preincubada con MP, de ser sustrato de la ADP-ribosilación por parte de la toxina pertusis, con respecto a la membrana no tratada (como

fue señalado anteriormente, la presencia del heterotrímero intacto es necesaria para que se produzca la ADP-ribosilación mediada por toxina pertusis).

Para verificar esta hipótesis, se preincubó las membranas en presencia o no de MP  $10^{-4}$  M (Concentración óptima según lo descrito por Higashijima, T et al. 1990) durante 15 minutos a 30 °C, y se procedió luego de acuerdo a lo descrito en Mat y Met para la reacción de ADP-ribosilación en gel.

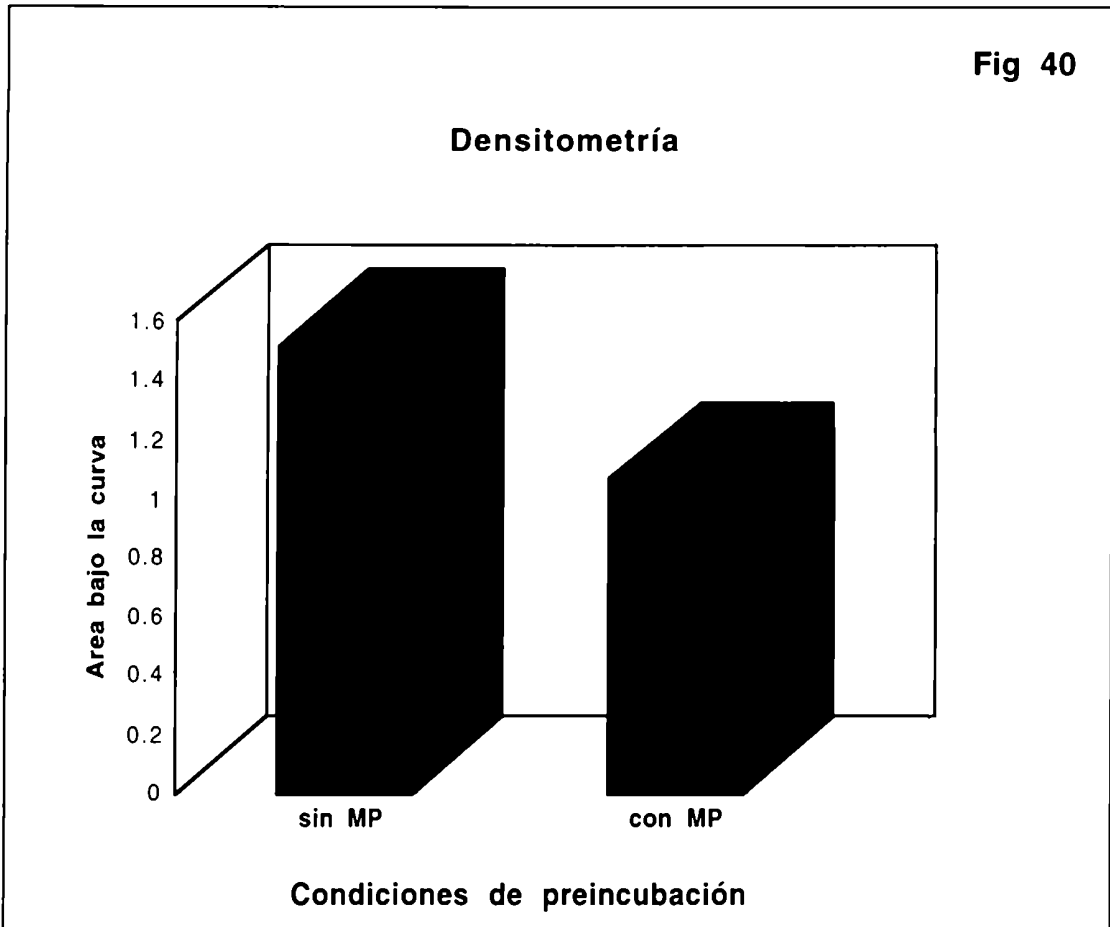
El resultado se muestra en la Fig 39

**Fig.39**



**Fig39** Las calles 1 y 2 corresponden a los controles Toxina específica (Ver ADP-ribosilación pag. 123), preincubado sin y con MP respectivamente. La calle 3 es la reacción con Toxina pertusis, incubada en presencia de  $300 \mu\text{M}$  de  $\text{NAD}^+$  no marcado (control proteína ADP-ribosilada). La calle 4 corresponde a la membrana preincubada en ausencia de MP y en presencia de Toxina Pertusis. La calle 5 corresponde a la misma reacción anterior pero en presencia de MP  $10^{-4}$  M.

Las bandas correspondientes a las calles 4 y 5 fueron cuantificadas densitométricamente en el densitómetro laser mejorado Ultrosan XL (LKB), según se observa en la Fig. 40.

**Fig 40**

Como puede apreciarse en el gel y verificarse en la cuantificación densitométrica, las membranas pretratadas con MP son menos eficientes como sustrato de la reacción de ADP-ribosilación

La aparición y cuantificación de una banda no específica de alto peso molecular, cuyos valores del area bajo la curva fueron 0.253 y 0.267 para las calles 4 y 5 respectivamente, nos permite adjudicar dicha disminución a la reacción específica y no a un problema experimental de diferencia de material sembrado en cada una de ellas.

Este único experimento permite sacar importantes conclusiones, dadas las características expuestas acerca de las propiedades del MP como herramienta en el estudio de los caminos metabólicos mediados por proteína G:

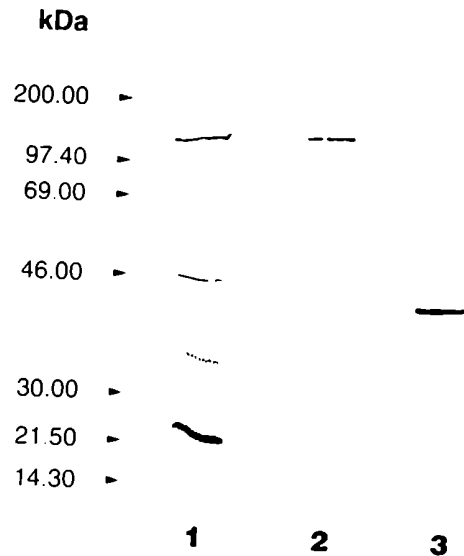
-Las proteínas G (específicamente las  $G_i$ ) presentes en estas membranas, se comportan como un heterotrímero, por lo menos desde el punto de vista estructural-funcional, ya que según lo expuesto tanto la acción del MP como la de Toxina pertusis depende de la presencia de las subunidades  $\beta\gamma$ .

- Queda puesta en evidencia, aunque de manera indirecta, la presencia de un dominio capaz de interactuar con los receptores de 7 vueltas de hélices a la membrana (receptores acoplados a proteínas G).

### **Resultados preliminares con una cepa patógena**

A los efectos de comprobar la conservación de este camino metabólico en una cepa de mayor interés económico, como la *Hart 1*, responsable de la Marchitez sorpresiva y el Hartrot del cocotero (Ver Introducción), se realizó un ensayo de unión de  $GTP \alpha [^{32}P]$ , que reveló un patrón idéntico al de la Fig. 35 aunque en un rango de peso molecular algo mayor. A continuación se enfrentó las membranas de esta cepa a los respectivos anticuerpos que reconocen epitopes homólogos a las subunidades  $\alpha_i$  y  $\alpha_s$  (AS/7 y 9188 respectivamente). El resultado se observa en la Fig. 41

Fig 41



**Fig41:** La calle 1 corresponde al filtro enfrentado al antisuero 9188; calle 3 antisuero AS/7 y calle 2 suero normal de conejo.

En el caso de esta cepa el polipéptido reconocido por el anticuerpo contra  $\alpha_s$  tiene un peso molecular aproximado de 46 kDa, y el reconocido por el anti  $\alpha_i$  de 44 kDa aproximadamente

Dada la dificultad de cultivar esta cepa en particular y al bajo rendimiento del cultivo (Ver Introd.), se prefirió priorizar la detección de las putativas proteínas G, debido a la alta sensibilidad de este método y la posibilidad de extraer en forma sencilla y con muy poca cantidad de material, un dato suficientemente específico, que nos confirmara la validez de extrapolar los datos obtenidos para la cepa no patógena de *Phytomonas* a esta cepa de tan diferente localización en la planta. .

## QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMPc

La dilucidación de las bases moleculares de la acción del AMPc, constituye uno de nuestro principales objetivos. Es por eso que la detección de una actividad de quinasa activable por AMPc, tal como sucede en eucariotas superiores, constituía el paso obligado hacia el entendimiento de los roles potenciales y las consiguientes implicancias de esta vía.

Con este objeto se procedió a la purificación parcial de las putativas quinasas de proteína dependiente de AMPc (PKA) a partir del sobrenadante de *Phytomonas* provenientes de *E.characias* obtenido según lo descrito en Mat y Met, con el fin de identificarlas y caracterizarlas.

### Purificación parcial

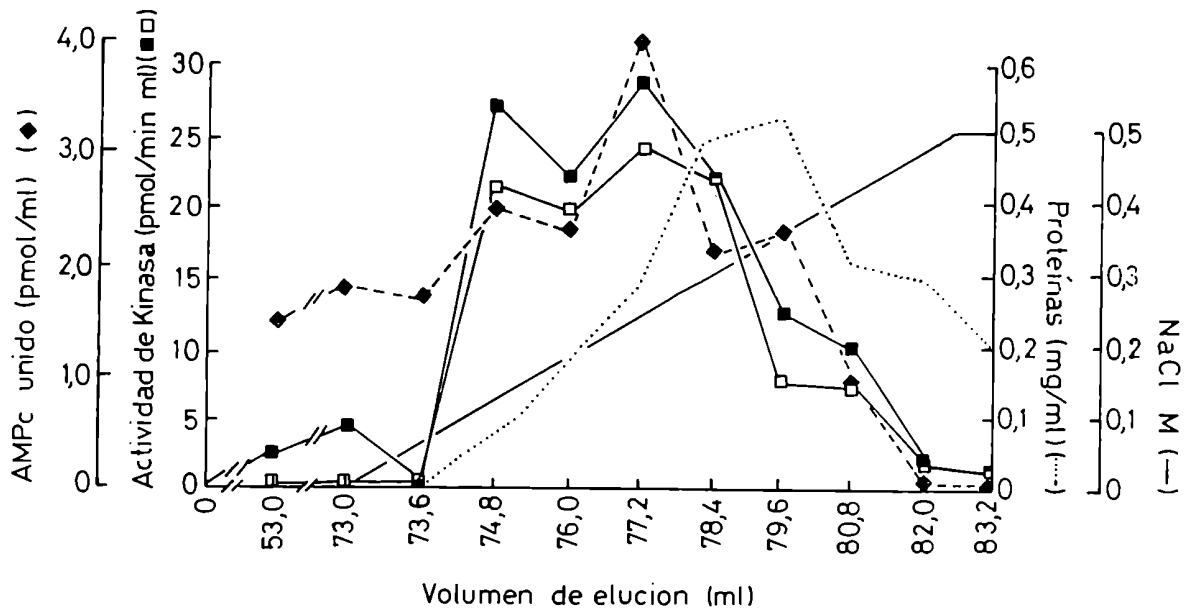
#### Cromatografía en DEAE-celulosa

Como primer paso en la detección y caracterización de la actividad de quinasa, el extracto crudo, S100, obtenido según lo descrito en Mat y Met. en presencia de inhibidores de proteasas (Cazzulo, 1984) se diluyó en buffer A y se sembró en una columna de DEAE-celulosa según lo descrito por Ulloa et al. 1988.

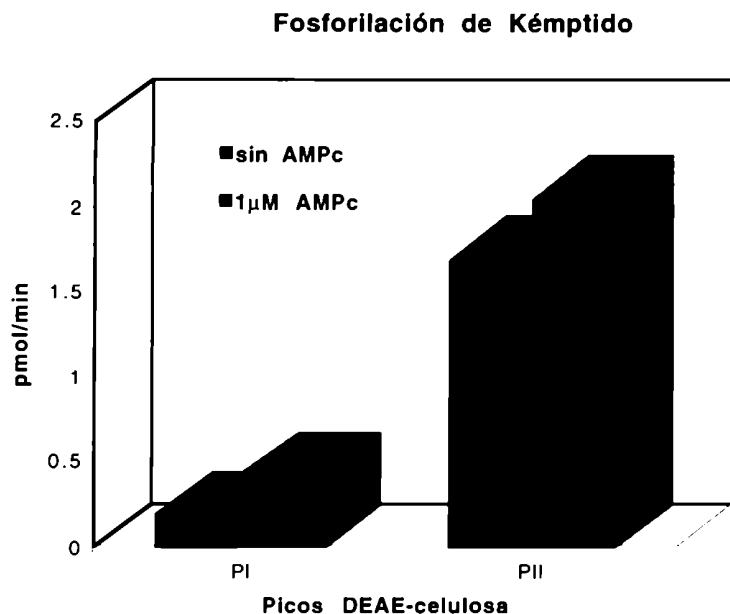
En la Fig. 21 se observa un perfil de elución en el que es posible visualizar dos picos de actividad de quinasa de proteínas, utilizando como sustrato Histona H IIA. Dichos picos, de ahora en más denominados PI y PII, eluyeron a una concentración de NaCl de 0.1 M y 0.25 -0.3M respectivamente.

Dichos picos fueron ensayados en presencia de Kémptido (Kemp, et al. 1979), pero en este caso se utilizó una variación en la técnica. La misma consiste en el agregado de ácido acético al final de la reacción para eliminar por precipitación, la contribución de las proteínas endógenas que pudieran fosforilarse, tanto específica como inespecíficamente, y sólo medir la incorporación de [<sup>32</sup>P] debida al Kémptido (Casnellie, 1991)(Fig. 42). Ambos picos resultaron ser estimulables por AMPc 1µM.

**Fig.42:** Perfil de elución DEAE-celulosa. Actividad quinasa de proteínas (Histona H1A) medida en presencia  $\blacksquare$  o ausencia  $\square$  de AMPc



**Fig 43:** Fosforilación de Kémtido de los picos provenientes de la DEAE-celulosa



### Unión específica de [<sup>3</sup>H]-AMPc

En la Fig 42, también se detalla el perfil obtenido al medir la unión específica de [<sup>3</sup>H]-AMPc obtenida por desplazamiento con 100mM de AMPc no marcado. Del mismo se deduce que el pico mayoritario coeluye con el pico II. Esto se correlaciona con la mayor actividad específica detecta en el ensayo correspondiente a la Fig.22. Una situación similar fue detectada en *T. cruzi*, (Ulloa et al. 1988), aunque en el caso de este parásito, el PI no era activable por AMPc y la actividad de quinasa de proteínas dependiente de AMPc, sólo fue adjudicada al PII.



## Ensayo de autofosforilación

La reacción de autofosforilación y su posterior resolución en un gel de poliacrilamida más SDS, se llevó a cabo tanto en el crudo (S100), como en los respectivos picos de elución obtenidos en la DEAE-celulosa. El resultado de dicho experimento se muestra en la Fig. 3 k

Fig. 44

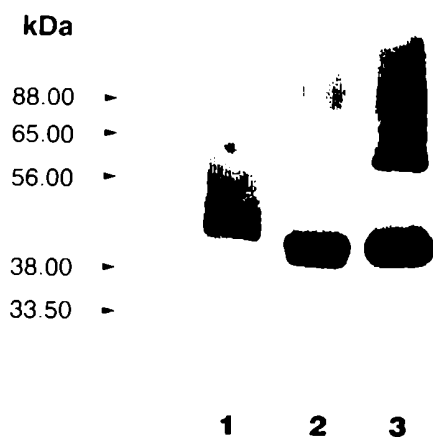
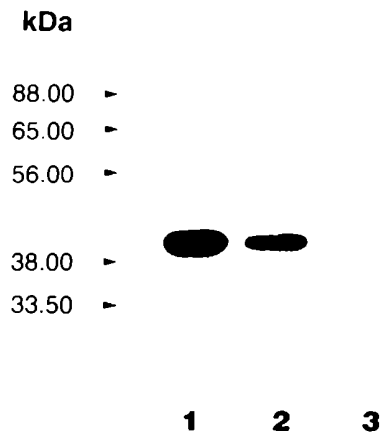


Fig.44 : Reacción de autofosforilación - calle 1, pico I (PI); calles 2, pico II (PII); calle 3, extracto crudo (S100)

En la Fig 44 se observa la aparición de una banda de 40 kDa como producto de las 3 reacciones de autofosforilación. Así mismo, según se hizo referencia en la Introducción, la actividad de kinasa de tipo II es capaz de autofosforilar a su correspondiente subunidad regulatoria (Rosen et al. 1975). Como se observa en esta misma figura, aparece una banda de peso molecular aproximado de 56 kDa. que podría corresponder a esta subunidad, sobre todo teniendo en cuenta que dicha señal, no aparece en el pico correspondiente a la actividad de tipo I y si en cambio en el extracto crudo y en la fracción correspondiente a PII.

### Caracterización inmunológica

Para completar la caracterización la actividad de PKA, se inmunoprecipitaron las fracciones correspondientes a los picos de la DEAE-celulosa previamente sometidas a la reacción de autofosforilación. Se procedió según lo descrito en Mat y Met. y se usó una dilución 1/100 del anticuerpo policlonal purificado por afinidad, obtenido a partir de la inmunización de conejos con la subunidad catalítica de corazón bovino (Los anticuerpos provienen del laboratorio del Dr. B. Hemmings, Friedrich Miescher- Institut, Basel, Switzerland). Los complejos fueron sembrados en PAGE-SDS, y el resultado de la autoradiografía se muestra en la Fig 45



**Fig 45:** Inmunoprecipitación de los picos I y II provenientes de la columna de DEAE-celulosa, previamente sometidos a la reacción de autofosforilación, con antisuero contra la subunidad catalítica (cPKA) de corazón bovino: calle 1, PII; calle 2, PI. Calle 3, inmunoprecipitación del S100 con suero normal de conejo.

Tal como se aprecia en la Fig 45, la inmunoprecipitación revela una banda específica de unos 40 kDa, que correlaciona con el experimento de la Fig. 44 y que coincide con el peso molecular de la misma subunidad reportada para *T.cruzi* (Ochat et al 1993)

Los resultados anteriores indican la existencia en el citosol de *Phytomonas* de dos tipos de actividad de quinasa de proteínas dependiente de AMPc. Los siguientes criterios convalidan la autenticidad de esta aseveración:

1- Ambas actividades son activables por AMPc. Como puede apreciarse en las Fig 42 y 43, dicha activación es escasa. Esto coincide con la observación hecha en la sección **Efectos de los moduladores de la actividad de adenilil ciclasa en eucariotes superiores**, acerca de los elevados niveles basales de la actividad de Adenilil Ciclasa comparada con la detectada en otras especies. Esta escasa regulación también podría deberse a la etapa del cultivo analizada (Fase exponencial tardía-estacionaria). Dada la limitación de crecimiento del sistema que no permite obtener cantidades que resulten suficientes para una adecuada caracterización de la variación de los niveles de AMPc y la consecuente regulación de la actividad de quinasa dependiente del mismo, no podemos por el momento más que especular acerca de esta causa. De cualquier manera, como primer objetivo de esta etapa, la demostración de la existencia de dicha actividad, constituye un dato suficientemente importante, a partir del cual deberán diseñarse las estrategias adecuadas, para obtener la mayor cantidad de datos fisiológicos y de regulación, que permitan compensar la falta de material adecuado para un exhaustivo estudio bioquímico.

2- Especificidad por aceptores de fosfatos, característica de este tipo de actividad fosfotransferasa (Kémptido).

3- Una de las fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa), es capaz de unir específicamente [<sup>3</sup>H]AMPc.

4- Como ocurre con PKA tipo II de mamíferos, la actividad quinasa correspondiente al pico II también es capaz de fosforilar su propio componente regulatorio (autofosforilación), no ocurriendo lo mismo con la enzima correspondiente al pico I.

5- El antisuero policlonal específico de la cPKA de corazón bovino, es capaz de reconocer un polipéptido de 40 kDa en un ensayo de inmunoprecipitación, en ambos picos provenientes de la DEAE-celulosa identificados como PI y PII.

En este punto es interesante hacer referencia a las diferencias encontradas en *Phytomonas* respecto de *T. cruzi*. En el caso de epimastigotes de *T. cruzi*, la actividad de PKA caracterizada fue identificada como de tipo II (Ulloa et al. 1988; Ochatt, et al. 1993). A

su vez, fue detectada inmunológicamente la presencia de cPKA en todos los estadios de *T.cruzi*, lo cual hablaría de una expresión constitutiva de la misma (Ochatt, Tesis Doctoral 1994). Por esta razón sería de esperar que el rol de inductor de la diferenciación del AMPc, pudiera ser responsabilidad de la expresión diferencial de la subunidad regulatoria. Aún resta comprobar dicha especulación, ya que la caracterización de la subunidad regulatoria de tipo II, solo fue efectuada en el estadio de epimastigotes.

Por otra parte, tal como se indica en la Introducción, la mayoría de los genes clonados de PKA en eucariotas inferiores, son del tipo I y existe un sólo gen clonado en levaduras que codifica para una actividad de tipo II.

Estos datos tomados en conjunto, podrían estar convalidando en el plano teórico, nuestra observación experimental acerca de la existencia de los dos tipos de PKA en *Phytomonas*. Mas aún, si se tiene en cuenta, que los cultivos de *Phytomonas* son poblaciones heterogéneas (en su mayoría correspondientes a formas promastigotas), en las que aún no ha sido posible precisar la existencia de estadios específicos, tal como los que existen en el género *Trypanosoma*.

En mamíferos los genes inducibles por AMPc son controlados por el factor de transcripción CREB, el cual es fosforilado por una PKA (Gonzales et al. 1989). En *T.cruzi* ha sido caracterizado un gen que se expresa durante la diferenciación de los tripomastigotes metacíclicos, cuya transcripción es regulada por AMPc (Heath et al. 1990)

Si bien a partir de estos datos experimentales, sólo estamos dando a conocer la presencia de la una actividad de quinasa de proteínas dependiente de AMPc, se esta dando otra prueba de la conservación de los componentes de la vía del AMPc aún en organismos no relacionados.

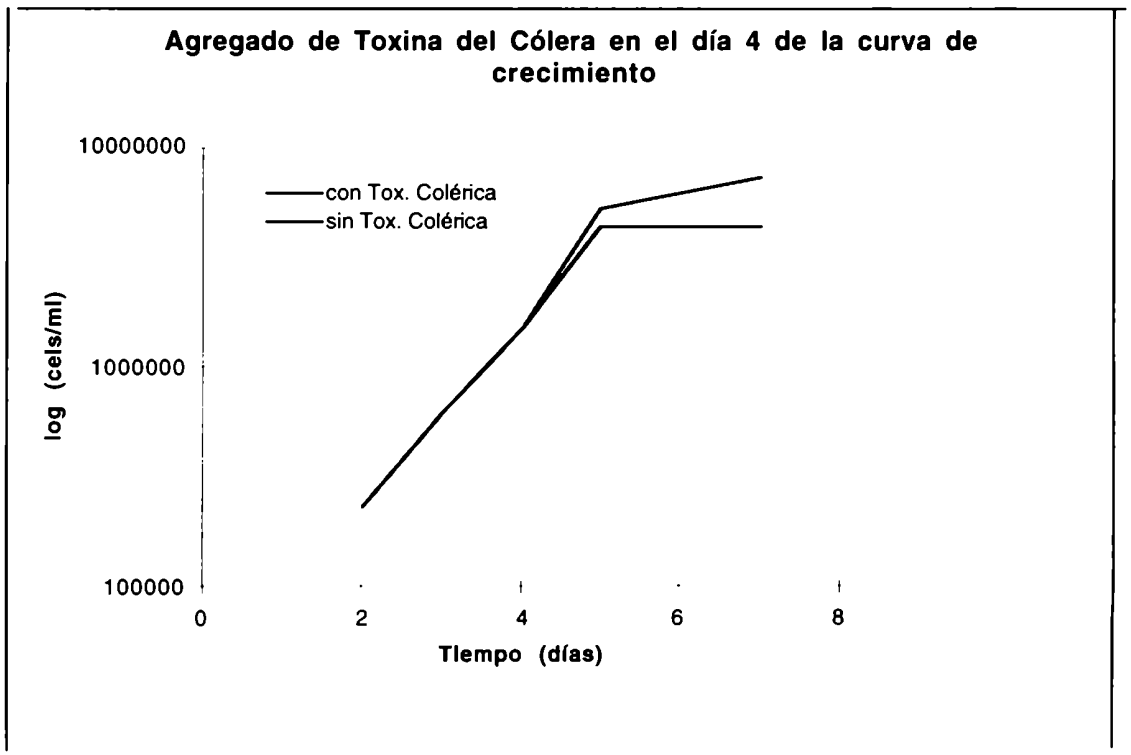
Sin embargo, y dado que el control de la expresión de los genes en los tripanosomátidos parecería ser post-transcripcional (Pays, E 1993), algunos autores especulan acerca de la posibilidad de que el AMPc aumente la estabilidad relativa de los ARN mensajeros (Pays E. et al. 1993). Por lo tanto la universalidad de determinados componentes de las redes transductoras de señales, no nos deben hacer perder de vista los mecanismos particulares, privativos de estos organismos, que constituyen per se un modelo muy interesante de estudio.

## POSIBLE ROL DE LA VÍA DEL AMPc (experimentos "in vivo")

Con el objeto de verificar "in vivo" el rol de la vía del AMPc como transductora de señales que pudieran provenir del ambiente de cualquiera de los respectivos huéspedes de *Phytomonas*, se diseñó un experimento que reflejara dicha vía desde la instancia superior detectada en esta tesis: la putativa proteína Gs.

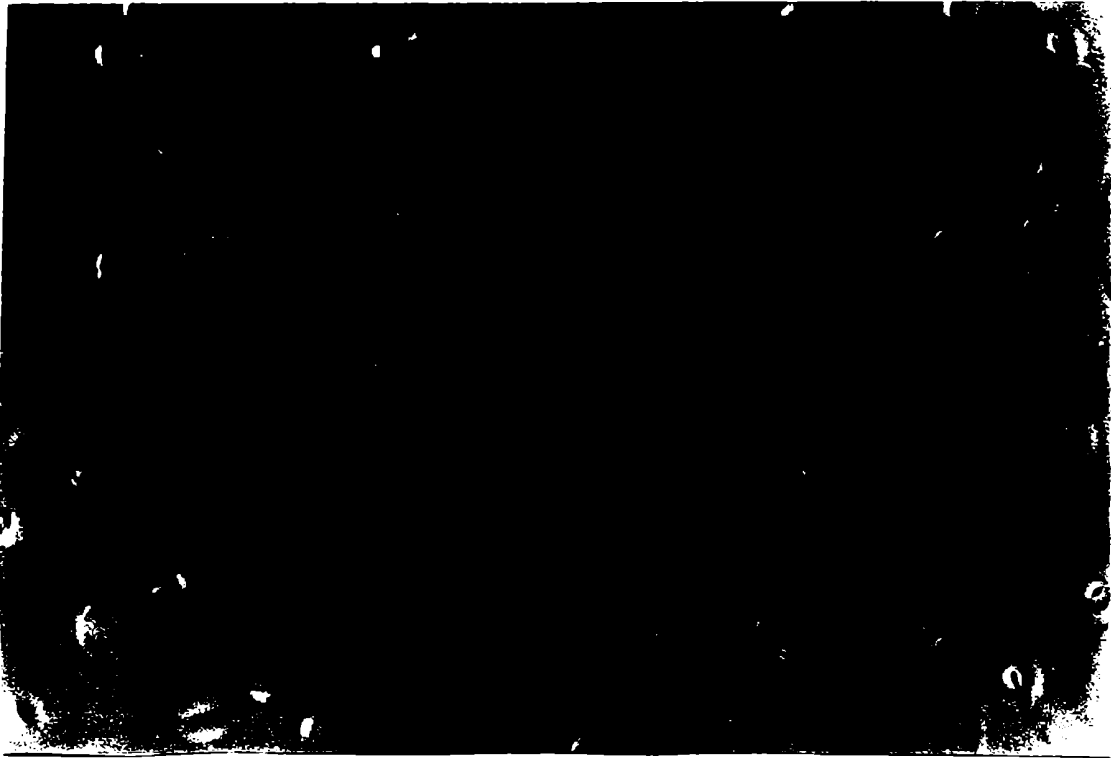
Teniendo en cuenta el dato obtenido en el experimento correspondiente a la actividad de AC a lo largo de la curva de crecimiento (Fig 25), se procedió de la siguiente manera : Un mismo cultivo fue separado al día 4 en dos fracciones. A una de ellas se le agregó Toxina del Cólera (sin preactivar) en una concentración de 12,5 µg/ml y la otra fracción se dejó como control. Se procedió a contar el número de células según lo ya descrito en Mat y Met, y se siguió la evolución de los mismo a través de microscopía óptica (aumento 40X) (Fig.46,47 y48)

Fig 46



La leve diferencia que se aprecia en la curva de crecimiento (una caída en el número de células), también se aprecia al observar y comparar ambos cultivos al día 7 en el microscopio (Fig. 47 y48)

**Fig 47: Curva control**



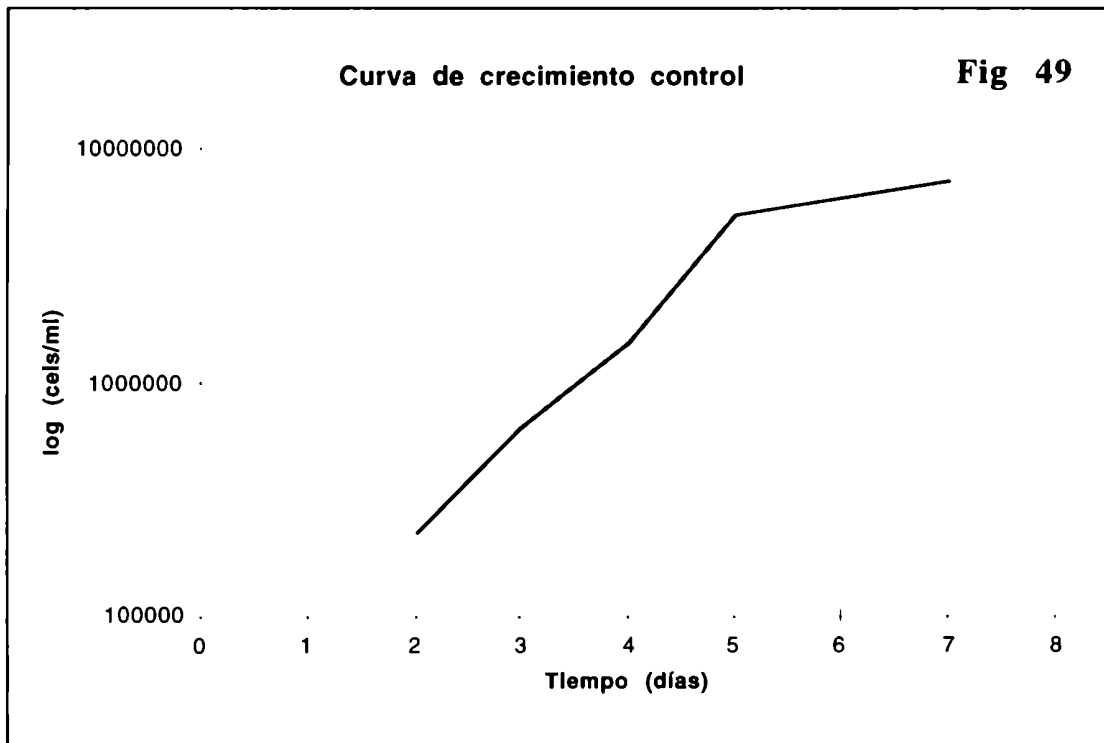
**Fig.48:Curva con Tox. Cólera**

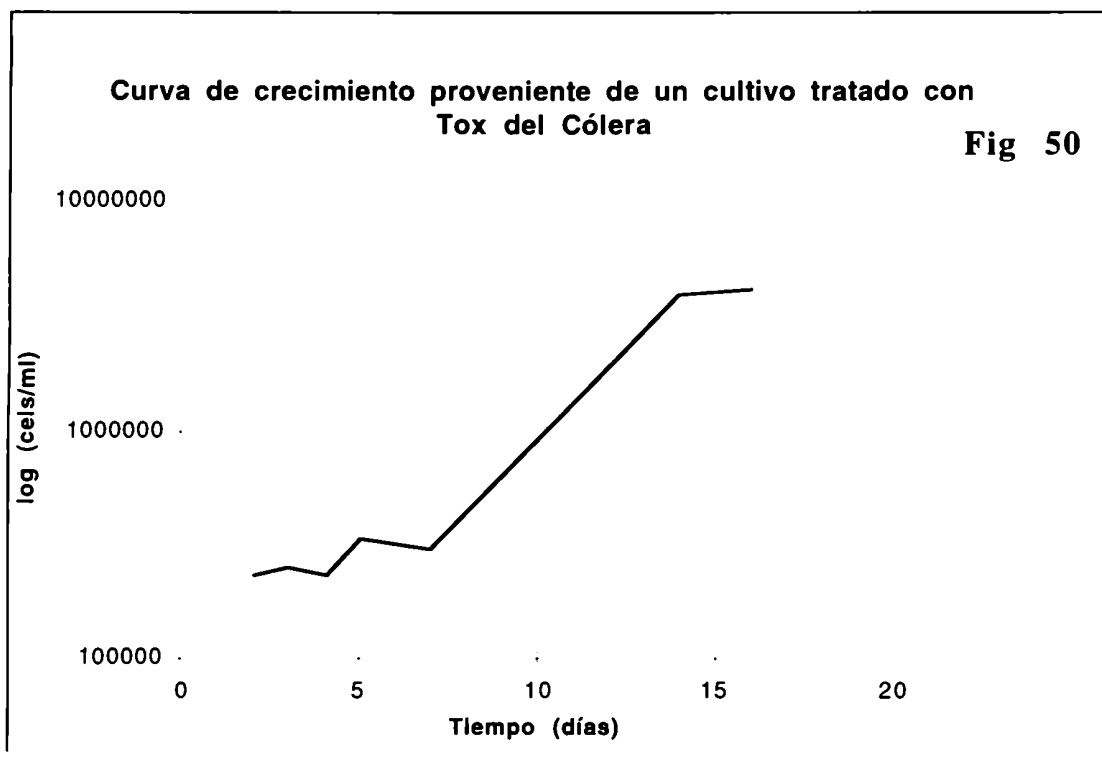


Se optó por el seguimiento de los cultivos al microscopio óptico, para descartar que el efecto fuese inespecíficamente tóxico, y que el retraso pudiera deberse a la muerte de los parásitos. De esta manera tal como se observa en las fotografías, el aspecto móvil del cultivo, nos confirma la *v*íabilidad de los parásitos ( se visualiza en la fotografía, en la dificultad de lograr un plano fijo, donde todos los parásitos estuvieran en foco).

Comparando ambas fotografías puede apreciarse que el cultivo sometido a la acción de la tox. colérica (Fig 48), presenta un aspecto similar a estadios mas tempranos de la curva y no al correspondiente al día 7 (Curva control), con preponderancia de formas alargadas, respecto de la heterogeneidad propia de este tipo de cultivos (Fig26).

A continuación se repicó cada uno de estos cultivo, para verificar la reversibilidad de este efecto. En este caso los parásitos provenientes del cultivo pretratado con toxina fueron *previamente* centrifugados y lavados con medio de cultivo nuevo. Nuevamente se contó el número de células para obtener la curva (Fig. 49 y 50), y se siguió el desarrollo del cultivo por microscopía óptica.





Como puede apreciarse del análisis de las respectivas curvas, si bien ambas comienzan con un número equivalente de parásitos, la correspondiente al repique pretratado con toxina colérica muestra un comportamiento muy desplazado en tiempo, llegando la fase estacionaria recién al día 15 con un número de parásitos menor que la curva control. Se comporta como una curva de crecimiento muy lento, con una etapa inicial de crecimiento prácticamente nulo. El correlato fotográfico de estos cultivos se muestra en las siguientes Fig.51, 52, 53 y 54



Fig 51



Fig 52



Fig 53

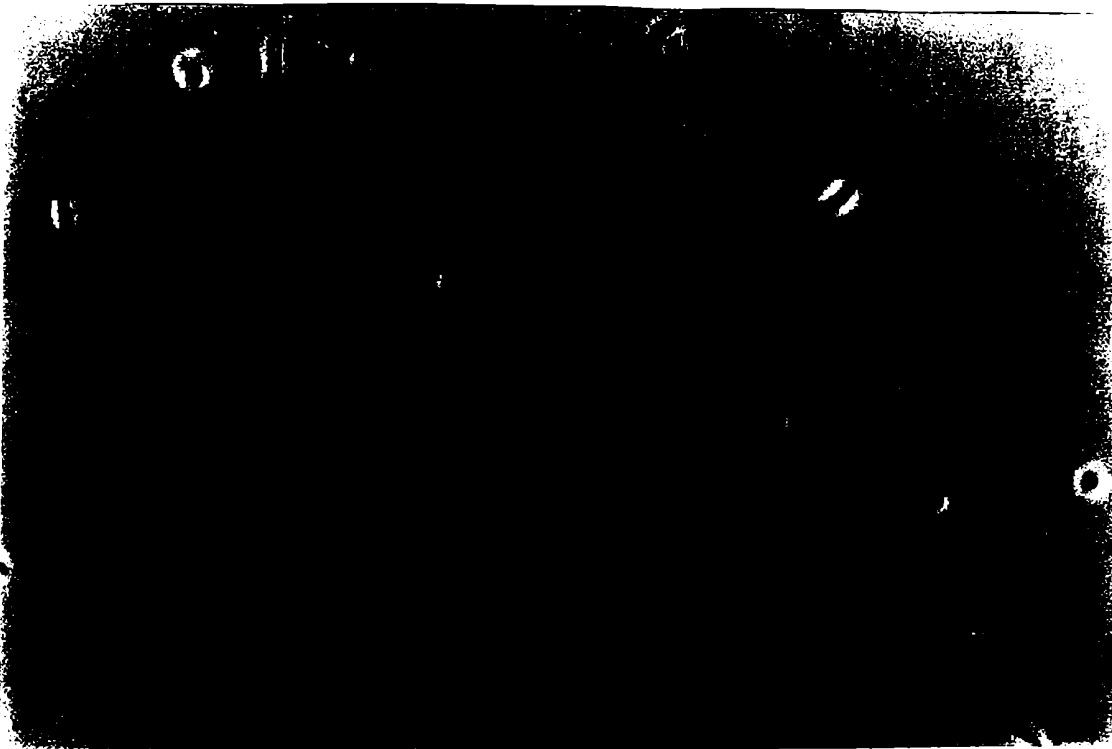


Fig. 51 y 52 cultivo control en el día 7 y 8 respectivamente; Fig 53 y 54 cultivo en el día 15 proveniente de un cultivo pretratado con toxina colérica, lavado y repicado.

Los cultivos controles muestran el aspecto típico correspondiente a la fase estacionaria de estos parásitos: es heterogéneo en cuanto a formas y con un aumento de las formas redondeadas, en nuestro caso adjudicadas a formas de envejecimientos de los cultivos (Ver Curvas de crecimiento.)

En cambio en los parásitos provenientes del repique cuyo origen era el cultivo al que se le agregó toxina del Cólera en el día 4, muestra preponderancia de las formas más grandes, un número evidentemente menor de individuos, también móviles y con aparición de rosetas y formas características de división, que aparecen muy retrasadas en el tiempo respecto de los cultivos controles. Como puede observarse en las Fig. 30 y 31, el cultivo es completamente diferente al de la etapa estacionaria del cultivo control, mostrando en cambio, un aspecto acorde a etapas más tempranas de la curva, además de la sorprendente viabilidad al día 15.

Todo parecería indicar que los cultivos pretratados han quedado arrestados en un estadio determinado del ciclo celular, como respuesta a la señal desencadenada por la toxina del Cólera, del cual empiezan lentamente a recuperarse. Dicha reversibilidad y la persistencia de la movilidad de los parásitos, son una prueba de un efecto específico y no meramente tóxico por parte de la toxina del Cólera.

Como hemos señalado en el punto anterior, la acción de la toxina del cólera dio como resultado un arresto del ciclo celular del parásito. En favor de esta hipótesis se señalan los siguientes aspectos observados experimentalmente:

- Disminución del número de células ( sin notar pérdida de la movilidad) y período de latencia anormalmente largo (Fig curva con cólera)

- Homogeneización de los cultivos tratados, respecto de la heterogeneidad característica de estos cultivos ( la detención en un punto dado del ciclo celular permite que finalmente todos los individuos del cultivo se detengan en esta etapa, perdiéndose de esta manera la heterogeneidad propia de un cultivo no sincronizado).

Si bien el AMPc esta implicado en la proliferación y diferenciación de los tripanosomas, los datos disponibles son insuficientes para poder extraer un único modelo de acción.

En nuestro caso, el efecto no pudo ser reproducido por el dibutiril AMPc, a pesar de que hemos demostrado la activación "in vitro" de la Adenilil ciclasa por parte de la toxina. Podemos sin embargo, inferir un rol fundamental del mismo en el proceso descrito, pero no lo podemos responsabilizar de la totalidad del efecto.

Consideremos por lo tanto dos posibilidades:

- **Que la señal fuese diferenciadora:** en este caso el arresto del ciclo celular correspondería al esperado para este tipo de mecanismos, es decir la detención del ciclo celular como característica fundamental de los períodos de preadaptación a un nuevo estadio. La señal desencadenada por la toxina sería incompleta y el parásito estaría detenido en una fase del ciclo (posiblemente G1: período previo a la fase S de duplicación del ADN), "esperando" el resto de las señales que le permitan completar el proceso.

De todos modos, en las *Phytomonas* hasta ahora no se han podido identificar estadios distintivos de su desarrollo, o que pudieran ser los característicos de su dos hospedadores (planta e insecto), tal como sucede en los tripanosomas digenéticos (Por ej. *T. cruzi* o *T. brucei*, *Leishmania*).

Se ha descrito sin embargo para el caso de *Phytomonas serpens* (aisladas del tomate), un ciclo de vida que involucra la aparición de diferentes subpoblaciones con diferentes tamaños (Jankevicius et al 1989). Si bien el rol o la relación que pudieran tener estos cambios con el desarrollo del parásito aún no está claro, se señala que cuando el parásito se encuentra en las glándulas salivales del insecto luego de atravesar la hemolinfa, se pueden identificar 2 subpoblaciones: una de gran tamaño y con flagelo y la otra, de pequeñas formas sin flagelo. Esto coincide con lo descrito por Mc Ghee y Hanson, donde también describen estas dos subpoblaciones y especulan acerca de la posibilidad de que la subpoblación de menor tamaño corresponda a formas metacíclicas, presumiblemente las formas infectivas.

Por lo tanto, y hasta que estos estadios no sean definidos de una manera más concluyente, ya sea desde el punto de vista morfológico, desde un enfoque bioquímico o molecular, o con evidencias de tipo funcional, la especulación de una señal de tipo diferenciadora sería quizá un poco apresurada en el caso de las *Phytomonas*.

- **Que la señal fuese proliferativa:** en este caso si bien la señal sería inductora de la división celular, la prosecución a lo largo del ciclo celular podría depender de la disminución de la misma. Por lo tanto una persistencia artificial (de tipo tóxica) podría estar impidiendo el normal desarrollo del ciclo. Esta señal constituiría uno de los primeros puntos críticos de control (check point) y la superación de los subsiguientes dependería de una atenuación de la misma. Este argumento esta a su vez respaldado por el dato experimental señalado en el punto **Variación de la actividad a lo largo de la curva de crecimiento** en el cual se destaca el aumento de la actividad de Adenilil ciclase que acompaña a la primer parte de la fase exponencial de la curva de crecimiento.

A pesar de que en nuestro caso no hemos podido verificar que el efecto observado sea debido exclusivamente al AMPc, es importante traer a colación en este punto los antecedentes existentes en la literatura y otros obtenidos en nuestro laboratorio, acerca del rol del AMPc sobre el control de la división y la diferenciación en los tripanosomas:

1- Se han descripto diferencias significativas en los niveles de la concentraciones intracelulares de AMPc en diferentes estadios del ciclo de vida, tanto en *T.brucei* (Mancini, PE et al. 1981) como para *T.cruzi* (Rangel-Aldao R., et al. 1987).

2- Análogos del AMPc e inhibidores de la Fosfodiesterasa de AMPc promueven la diferenciación in vitro de los epimastigotes de *T.cruzi* a su forma tripomastigote metacíclico (estadio no infectivo proliferativo y estadio infectivo no proliferativo respectivamente, ambas presentes en el intestino del vector) (Gonzales-Perdomo, M. et al. 1988). Esta misma inducción, aunque en porcentaje menor, acompañada por un aumento total en el número de parásitos fue reportada por Ochatt C.(Tesis Doctoral, 1994). Estos mismos reactivos inhiben la transformación de amastigotes de *Leishmania donovani* a su forma promastigote (Walter RD, 1981, Walter y Opperdoes 1982), como también inhiben la transformación de las formas sanguínea alargadas y delgadas de *T.brucei* a sus formas cortas y redondeadas que son infectivas para el insecto vector.

3- Activación transiente de la Adenilil ciclase en *T.brucei* que está ligada a la diferenciación de sus formas sanguíneas a las formas procíclicas ( correspondientes al estadio en el insecto), como así también un aumento en la misma actividad que acompaña a la

primera etapa de la fase exponencial en la curva de crecimiento del estadio procíclico (Rolin et al 1993)

4- El caso más contundente donde se da pruebas del rol del AMPc en la diferenciación, en el caso particular de *T. cruzi*, es el reportado por nuestro laboratorio: un péptido producto de la digestión por parte del vector (*Triatoma infestans*) de la  $\alpha$ -globina de los vertebrados, que se encuentra en el intestino del mismo, es capaz de activar a la Adenilil ciclase de membrana de los epimastigotes (estadio no infectivo) y provocar la transformación a su forma tripomastigote metacíclico (estadio infectivo), tanto in vitro (Fraindenraich, D. et al. 1993) como in vivo



*CONCLUSIONES*

## Transducción de señales en *Phytomonas*

*Phytomonas* es un género de la familia Trypanosomatidae que parasita plantas. La especie aislada de *Euphorbia characias* (plantas laticíferas), contiene una adenilil ciclasa unida a membranas y un sistema transductor de señales de proteínas G, del tipo Gs y Gi. Estas proteínas afectan la actividad de la adenilil ciclasa y posiblemente participan en un mecanismo que involucra a una señal de tipo hormonal. Si bien no existen evidencias directas de la existencia de un receptor, la proteína del tipo Gi es capaz de interaccionar con el péptido toxico Mastoparán, que mimetiza la acción de los receptores acoplados a proteínas G.

Se analizaron distintas fracciones subcelulares para caracterizar una actividad de quinasa de proteínas modulada por AMPc (PKA). Las fracciones subcelulares purificadas por cromatografía en DEAE-celulosa mostraron dos picos de actividad enzimática frente a histona IIA y a kemptido como sustratos. Usando un anticuerpo policlonal contra la subunidad catalítica de PKA de corazón bovino, se inmunoprecipitó un polipéptido con un peso molecular de 40 kDa. Estos datos en conjunto sugieren la presencia de dos tipos de actividad de quinasa de proteína de pendiente de AMPc (tipo I y II).

Experimentos in vivo con toxina del cólera, dieron como resultado un arresto del ciclo celular del parásito, poniendo en evidencia un efecto ambiguo de la vía de señalización mediada por AMPc, que requerirá de futuros estudios para su profundización.

Datos preliminares, aunque incompletos nos dan un primer indicio de la conservación de este tipo de vía en una cepa patógena. La extrapolación de los resultados anteriores, nos permitirán diseñar aquellos experimentos tendientes a tratar de develar, dónde reside la diferencia de patogenicidad de ambas cepas.





***BIBLIOGRAFIA***

- Abou-Samra, AB., Jüppner, H., Force, t., Freeman, MW., Kong, XF>, Schipani, E., Uren, P., Richards, J., Bonventre, JV., Potts, JT., Kronenberg, H.M., y Segre, GV.,(1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 2732-2736.
- Abrams, TW, y Kandel, ER.,(1988). *Trends Neurosci*, 11: 128-135.
- Ahomadegbe, J.C., Dollet, M., Coulaud, D., Gargani, D. y Riou, G.,(1990). *Biol. Cell*, 70:167-176
- Ahomadegbe, J.C., Dollet, M., y Riou, G.,(1992). *Biology of the Cell*, 74 : 273-279.
- Aiba, H., Mori, K., Tanaka, M., OOi,T., Roy, A., Danchin,A.(1984). *Nucleic Acid Res.*, 12: 9427-9440.
- Altschuler,D.L., Muro, A., Schijman, A., Bravo-Almonacid, F., Torres, H.N,(1990). *FEBS Let.* 273:103-106.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmasdorf, H.J., Jonat, C., Herlich, P, Karin, M. (1987). *Cell*, 49: 729-739.
- Arshavsky, V.Y., y Bownds, M.D.,(1992). *Nature*, 357:416-417.
- Asano, T., Katada, T. Gilman, A.G., y Ross, E.M.,(1984). *J. Biol. Chem.*, 259: 9351-9354.
- Ashkenazi, A., Winslow, JW., Peralta, EG., Peterson, GL., Schimerlik, MI., Capon, DJ., y Ramachandran, J., (1987). *Science*, 238: 672-675.
- Attias M., y de Souza W., (1992). *Memorias del O. Cruz*
- Bakalyar H.A y Reed, R.R (1990). *Science*, 250:1403-1406.
- Barnard, E.A., Darlison, ME., y Seeburg, P.,(1987). *Trends. Neurosci.*, 10: 502-509.
- Beato, M.,(1989). *Cell*, 56: 335-334.
- Beebe, S.J. y Corbin, J.D.,(1986). *Enzymes*, 17: 43-111
- Benne, R.,(1990). *Trends in Genetics*, 6:177-181.
- Berlot, C., y Bourne, H.R.,(1992). *Cell*, 68: 911-922.

- Berstein, G., Blank, J.L., Jhon, DY., Exton, JH., Rhee, SG., y Ross, E.M.,(1992). *Cell*, 70: 411-418.
- Beth, AH., Conturo, T.E., Venkataramu, S.D., y Staros, JV.,(1986). *Biochemistry*, 25: 3824-3832.
- Beuve A., Boesten, B., Crasnier, M., Danchin,A., O’Gara (1990). *J. Bacteriol.*, 162: 2614-2621.
- Blum, J.J., y Opperdoes, F.R.,(1994). *J. Euk. Microbiol.*, 41: 228-231.
- Bourne, HR., y Nicoll, R.(1993). *Cell* 72/Neuron 10, 65-75.
- Boyajian, C.L., Garritsen,A. y Cooper, DMF,(1991). *J. Biol. Chem*, 266:4995-5003.
- Bray, L., (1960). *Anal. Biochem.*, 1: 279-285.
- Brown, MS., Anderson, RGW., y Golsdstein, J.L., (1983). *Cell*, 32: 663-667.
- Buechler, JA. y Taylor, S.S. , (1990). *Biochemistry* 29: 1937-1943.
- Buxton, IL., y Brunton, L.L.,(1983). *J. Biol. Chem.*, 258, 10233-10239.
- Cali, J.J., Balcueva, E.A., Rybalkin, I., y Robishaw, J.D.,(1992). *J. Biol. Chem.*, 267: 24023-24027.
- Cali, J.J., Zwaagstra, J.C., Mons, N., Cooper, D.M.F., y Krupinsky, J. (1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 12190-12195.
- Camargo, E.P. y Wallace, FG.,(1994). Harris KF (eds.), *Advances in disease vector research*, Vol 10, Chapter 12. Springer-Verlag, New York, Inc.
- Camargo, EP., Silva, S., Roitman, I., De Souza, W, Jankevicius, J.V. y Dollet,M.(1987). *J. Protozool.*, 34(4): 439-441.
- Carlson, K.E., Woolkalis, M.J., Newhouse, MG., y Manning,DR.,(1986). *Mol. Pharmacol.*, 30: 463-468.
- Carr, D.W., Bishop, S.E., Acott, T.S. y Scott, J.D. (1991). *Fedn.Proc.. Am. soc. exp. biol.* 5: A1529.

- Carty, D.J., Padrell, E., Codina, J., Birnbaumer, L., Hildebrandt, J.D., Iyengar, R.J.,(1990). *J. Biol. Chem.*, 265: 6268-6273.
- Casey, P.J., (1994). *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6: 219-225.
- Casey, R.J., Graziano, M.P. y Gilman, A.G. (1989b). *Biochemistry*, 28: 611-616.
- Casnellie, J.E.(1991). *Meth. Enzymol.*, **200**: 115-120.
- Cerione, RA., Staniszewski, c., Benovic, JL., Lefkowitz, RJ., y Caron, MG.,(1985). *J. Biol. Chem.*, 260: 1493-1500.
- Chinkers, M. y Wilson, E.M.(1992). *J. Biol. Chem.*, 267:18589-18597.
- Chinkers, M., Garbers, D.L., Chang, M-S, Lowe, D.G., Chin, H., Goeddel, D.V., Schulz, S. (1989). *Nature*, 338: 78-83.
- Choi, E.J., Wong, ST., Dittman, AH., y Storm, DR.(1993). *Biochemistry*, 32: 1891-1894.
- Clapham, D.E, y Neer, EJ.,(1993). *Nature*, 365: 403-406.
- Clegg, C.H., Ran, W., Uhler, M.D., y McKnight, G.S. (1988). *J. Biol. Chem.* 264: 20140-20146.
- Codina, J., Carty, D., Birnbaumer,L., Iyengar, R.(1991). *Meth of Enz.*, 195: 177-188. Johnson R. y Corbin J.(eds.). Academic Press.
- Coghlan, VM.; Bergeson, S.E., Langerber, L; Nilaver, G. y Scott, J.D., (1993). *Mol. Cell. Biochem.*, 128: 309-319.
- Coleman, D.E., Berghuis, AM., Lee, E., Linder, ME., Gilman, AG., y Sprang, SR.,(1994). *Science*, 265: 1405-1412.
- Conchon, I., Campaner, M., Sbravate, C., Camargo, E.P.,(1989). *J. Protozool.*, 36: 412-414.
- Conklin, RB., y Bourne, HR.,(1993). *Cell*, 73: 631-641.
- Conklin,RB., Farfel, Z, Lustig, KD., Julius, D., y Bourne, HR.,(1993). *Nature*, 363: 274-276.

- Corbin J.D., Keely, S.L., y Park, C. R. (1975). *J. Biol. Chem.* 250: 218-225.
- Corbin.J.D., Sugden, P.H., West, L. Flockhart, D.A., Linclon, T.M., y McCarthy, D. (1978). *J. Biol. Chem.* 253: 3997-4003.
- Coso, O.A., Diaz-Añel, A.M, Martinetto, H., Muschiatti, J.P., Kazanietz, M.G., Fraidenraich, D., Torres, H.N, y Flawiá, M.M.(1992). *Biochem. J.*, 287:443-446.
- Coulter, L., y Hide, G., (1995). *Exp. Parasitol.*, 80: 308-318.
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., y Gutkind, J.S.,(1994). *Nature*, 369:418-420.
- da Silveyra,F.J., Zingales, B, Colli, W. (1977). *Biochim., Biophys. Acta*, 481: 722-733.
- Danchin, A. y Ullmann, A.(1985). En Spivek J., Glass, R. Eds. "Gene manipulation and expresion". Croom Helm, 255-272
- Danidl-Issakani,S., Spiegel, A.M., y Strulovici, B.(1989). *J. Biol. Chem.*, 264, 20240-24247.
- Debernardi, M.A.M Seki, T., y Brooker, G.(1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88; 9257-9261.
- Debernardi,M.A., Munshi, R., Yoshimura, M., Cooper, S.M.F. y Brooker, G.(1993). *Biochem. J.*, 293: 325-328.
- DeCrombrughe, B., Busby, S., Buc, H., (1984). *Science*, 224: 831-838.
- Desmier de Chenon, R., (1984). *Oleagineux*, 39: 1-6.
- Devreotes P., (1989). *Science*, 245: 1054-1058.
- Dohlman, Hg., Thorner, J., Caron, M.G., y Lefkowitz, R.J.,(1991). *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 653-688.
- Dollet, M. (1991). En *Electron Microscopy of Plant pathogens* (pp. 307-316), Springer- Verlag.
- Dollet, M. y Lopez, G.(1978). *Oleagineux*, 33: 209-213.

- Dollet, M., (1984). *Ann. Rev. Phytopatol.*, 22: 115-32.
- Dollet, M., Alvanil, F., Diaz, A, Louvet, C., Gargani, D. Segur, C., Muller, E., Julia, J.F., Calvache, H., Renard, J.L. y Maldes, JM.(1993). *Annales de la 3ieme Conference Internationale sur les ravageurs en agriculture Montpellier, 7-9 decembre. Tome III* (pp. 1321-1328). Paris -France.
- Dollet, M., Cambrony, D. & Gargani, D. (1982). *C.R. Acad. Sci. Ser. III*, 295: 547 -550.
- Dollet, M., Gargani, D., Cambroni, D. y Dzido J.L.(1983). *Can. J. Bot.*, 61:237-240.
- Dollet, M., Gianotti, J., y Ollagnier, M.(1977). *C.R.Acad. Sci; Paris, ser. D* 284: 643-645.
- Dollet, M.y Wallace, FG. (1987). *Oleagineux*, 42: 461-468.
- Donovan, (1909). *Lancet*, 177: 1495-1496
- Døskeland, S.O. & Ueland, P.M. (1977). *Biochem. J.*, 165: 561-573.
- Dratz, E.D. et al (1993). *Nature*, 363: 276-280.
- Drayer, A.L., y Van Haastert, PJM, (1993). *J. Biol. Chem.*, 267: 18387-18392.
- Dufau, ML., Horner, K.A., Hayashi, K., Tsuruhara, T., Conn, P.M., y Catt, KJ.,(1978). *J. Biol. Chem.*, 253: 3721-3729.
- Duronio, R.J., Jackson- Matchelski, E., Heuckeroth, R.O., Olins, P.O., Devine, C.S., Yonemoto, W., Slice, L.W., Taylor,S.S y Gordon, J.I.,(1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 87: 1506-1510.
- Eisenschlos C.; Flawia, M.M.; Torruela, M. y Torres, H.N. (1986a).*Biochem. J.* **236**: 185-191.
- Eisenschlos,C. D., Paladini, A.A., Molina y Vedia, L., Torres, H.N., y Flawiá, MM., (1986b). *Biochem. J.* 237, 913,-917.
- Engelberg, D, Poradosu, E, Simchen, G., Levitzki, A. (1990). *FEBS Lett.*, 261:413-418.

- Erlichman, J., Rosenfeld, R, y Rosen, O.M.(1974). *J. Biol. Chem.*, 249: 5000-5003.
- Evans, T., Brown, M., Fraser, E. & Northup, J. (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 7052-7059.
- Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, A., y Bourne, HR., (1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 7851-7854.
- Federman, A.D., conklin, BR., Schrader, KA., Reed, RR., y Bourne, HR., (1992). *Nature*, 356: 159-161.
- Fedor-Chaiken, M., Deschenes, RJ, Broach, JR.(1990). *Cell*, 61; 329-340.
- Feinstein, P.G., Schrader, K.A, Bakalyar, H.A., Tang, W.J., Krupinsky, J., Gilman, A.G., Reed, R.R. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 10173-10177.
- Ferguson, M.A.J., (1994). *Parasitology Today*, 10: 48-52.
- Field, J., Vojtek, A., Ballester, R., Bolger, G., ColiCelli, J., Ferguson, K., Gerst, J., Kataoka, T., Michaeli, T, Powers, S., Riggs, M , Rodgers, L., Wieland, I, Wheland B, Wigler, M.(1990). *Cell*, 1990, 61:319-327.
- Flawiá M.M. y Torres, H.N. (1972b). *J. Biol. Chem.*, 217, 6880-6883.
- Flawiá M.M. y Torres,H.N. (1972a). *J. Biol. Chem.*, 217: 6873-6879.
- Flawiá, M. M., Kornblihtt, A. R., Reig, J. M., Torruella, M., & Torres, H. N. (1983) *J. Biol. Chem.*, 247: 6873-6879.
- Fraindenraich, D., Peña, C., Isola, E., Lammel, E., Coso, O., Díaz Añel, A, Baralle, A., Torres, H.N., Flawiá, M.M.(1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 10140-10144.
- França(1914). *Archiv. Protistenk.*, 34: 108-132.
- França, (1920). *Ann. Inst. Pasteur*, 34: 432-465.
- Frey, U., Huang, Y-Y, Kandel, E.R. (1993). *Science*, 260, 1661-664.
- Freymuller, E., et al.(1990). *J. Protozool.*, 37: 225-229.

- Fukada, Y., Matsuda, T. Kokame, K., Takao, t., Shimonishi, Y., Akino, T., y Yoshizawa,T.,(1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 5163-5170.
- Gao, B. , Mumby, S.M. y Gilman, A.G(1987). *J. Biol. Chem.*
- Gao, B. y Gilman, A.G.(1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 10178-10181.
- Gargani D., Ménara, A., Segur, C., Dollet, M.,(1992). Report on the second Phytomonas workshop, Santa Marta, Colombia, 5-8 febrero. *Oleagineux*, 47: 596.
- Gershanovitch, V. N., Bolshakova, T.N, Molchanova, M.L, Umyarova, A.M., Dobrynina, O.Y., Grigorenko, Y.A., Erlagaeva, R.S., (1989). *FEMS. Microbiol. Rev.*, 63: 125-134.
- Gibbs, AJ.(1957). *Parasitology*, 47: 297-303.
- Gill M. y Woolkalis, MJ.(1991). *Meth of Enz.*, 195: 267-280. Johnson R. y Corbin J.(eds.). Academic Press.
- Gilman, A. C.(1984). *Cell*, 36: 577-579.
- Gilman, AG.,(1987). *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 615.
- Glaser, P., Munier, H., Gilles, A-M., Krin, E., Porumb, T., Barzu, O., Sarfati, R., Pellecuer, C., Danchin, A, (1991). *EMBO J.*, 10: 1683-1688.
- Goldsmith, P., Backlund, P.S., Rossiter, K., Carter, A., Milligan, G., Unson, C.G. & Spiegel, A. (1988). *Biochemistry*, 27: 7085-7090.
- Gonzales-Perdomo, M., Romero, P., y Goldenberg, S. (1988). *Exp. Parasitol.*, 66: 205-212.
- Graeser, D. y Neubig, R.R.(1993). *Mol. Pharmacol.* 43: 434-443.
- Guerrini, F., Segur, C., Gagani, D., Tibayrenc, M, Dollet, M.(1992). *J. Protozool.* 39 (4): 516-521.
- Hadwiger, J.A., Wilkie, T.M., Stratmann, M., y Firtel, RA.(1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 8213-8217.



- Hadwiger, JA., Lee, S. y Firtel, RA.(1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 10566-10570.
- Hadwiger,J.A. y Firtel, RA. (1992). *Genes& Dev.*, 6: 38-49.
- Hamm, H.E., Deretic, d., Arendt, A., Hargrave, PA., Koenig, B y - Hoffman, KP.,(1988). *Science*, 241: 832-835.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. (1988). *Science* 241: 42-52.
- Heath, S., Hieny, S. Sher, A. (1990). *Mol Biochem. Parasitol.* 43: 133.
- Hewlett, E.L.y Wolff J. (1976). *J. Bacteriol.*, 127: 890-898.
- Higashijima, T y Ross, M.,(1991). *J. Biol. Chem.*, 266: 12655-12661
- Higashijima, T, Bounier, J., Ross, M.,(1990). *J. Biol. Chem.*, 265: 14176-14186.
- Higgins, J.B y Cassey, P.J.,(1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 9067-9073.
- Hockberger, P.E.,y Swandulla, D. (1987). *Cell Mole. Neurobiol.* 7: 229-241
- Holmes,FO.(1925). *Phytopathology*, 15: 294-296.
- Humble, E., Berglund, L., Titanji, V., Ljungstrom, O., Edlund, B., Zetterqvist, O. y Engstrom, L.(1975). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 66: 614-621.
- Igarashi M., Strittmatter, S.M., Vartanian, T., Fishman, M.C.,(1993). *Science*, 259: 77-79,
- Ilg, T. Sierhof, Y-D.,Wiese,M.,y McConville, M.J.(1994). *Parasitology*, 108: S63-S71.
- Ishikawa, Y., Katsushika, S., Chen, L., Halnon, N.J., Kawabe, J., Homcy,C.J.(1992). *J. Biol. Chem.*, 267: 13553-13557.
- Ito, H., y Gilman, AG.,(1991). *J. Biol. Chem.*, 266: 16226-16231.
- Jacobowitz, O., Chen, J. Premont, RT., Iyengar, R. (1993). *J. Biol. Chem.*, 268: 3829-3832.

- Jahangeer, S y Rodbell, M.(1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 8782-8786.
- Janecek, J., Naprstek, J., Dobrova, Z., Jiresova, M. y Spizek, J.(1979). *FEMS Microbiol. Lett.*, 6: 305-307.
- Jankevicius, J.V., Jankevicius, SI, Campaner, M., Conchon, I, Maeda, LA., Texeira, MG., Freymuller, E. y Camargo EP., (1989). *J. Protozool.* 36(3): 265-271.
- Jankevicius, SI., De Almeida, ML, Jankevicius, JV., Cavazzana Jr. M. Attias M., y De Souza W.(1993). *J. Euk. Microbiol.*, 40: 576-581.
- Kahn R.A. (1991), En: *Methods in Enzymology*, **195**: 233-242. Johnson R.A. and Corbin J.D. (ed.).
- Kastelein, P. (1985). *De Surin. Landb.*, 33:62-64.
- Kastelein, P., Parsadi, M. (1988). *J. Protozool.*, 35(4): 533-536.
- Katada, T., Kusakabe, K, Oinuma, M. y Ui, M. (1987). *J. Biol. Chem.*, 262: 11897-11900.
- Kataoka, T, Broek, D, Wigler, M.,(1985). *Cell*, 1985, 43:493-505.
- Katsushika, S., Chen, L.,, Kawabe, J., Halnon, NJ, Homcy, CJ., Ishikawa, Y (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 10178-10182.
- Kawabe, J., Iwami, G., Ebina, T., Ohno, S., Katada, T., Ueda, Y., Homcy, C.J., Ishikawa, Y. (1994). *J. Biol Chem.*, 269, 16554-16558.
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., y Satoh, T.(1991). *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 349-400.
- Kemp, B.E., Benjamini, E., y Krebs, E. G.(1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73: 1038-1042.
- Kemp, B.E., Graves, D.J., Benjamini, E., y Krebs, E. G ,(1977). *J. Biol. Chem.*, 252: 4888-4894.
- Khyse-Andersen, J. (1984). *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 10: 203-209.

- Kitajima, EW., Vainstein, MH y Silveira, JSM. (1986). *Phytopathology*, 76:638-642.
- Klein, P. S, Sun, T.J., Saxe, C. L., Kimmel, A. R., Johnson, R. L., Devreotes, P.N., (1988). *Science*, 241:1467-1472.
- Kleuss, C., Hescheler, J., Ewel, C., Rosenthal, W., Schultz, G y Wittig, B. (1991). *Nature*, 353: 43-48.
- Kleuss, Scherubl, H., Hescheler, J., Schultz, G y Wittig, B (1993). *Science*, 259; 832-834.
- Kleuss, Scherubl, H., Hescheler, J., Schultz, G y Wittig, B.(1992). *Nature*, 358: 424-426.
- Kobayashi, Y. & Maudsley, D. (1974) En "*Biological Applications of Liquid Scintillation Counting*". Academic Press.
- Kobilka, BK., Kobilka, T.S., Daniel, K., Regan, J.W., Caron, M.g., y Lefkowitz, R.J., (1988). *Science*, 240: 1310-1316.
- Kopf G.S. & Woolkalis M.J. (1991), En: *Methods in Enzymology*, 195: 257-266. Johnson R.A. and Corbin J.D. (ed.).
- Kore-Eda S., Murayama, T. Uno, I. (1991). *Jpn J. Genet*, 66:317-334,
- Kozasa y Gilman,(1995)(en prensa).
- Krupinski J., Coussen F., Bakalyar, H.A., Tang, W.J., Feinstein , P.G., Oorth, K., Slaughter C, Reed, R.R., Gilman, A.G., (1989). *Science*, 244:1558-1564.
- Krupinsky J., Lehman, TC., Frankenfield, C.d., Zwaagstra, J.,C, y Watson, P.A.(1992). *J. Biol. Chem.*, 267:24858-24862.
- Kumagai, AM, Hadwiger, A, Pupillo, M, Firtel, RA. (1991). *J. Biol. Chem.*, 266: 1220-1228.
- Kumagai, AM, Pupillo, R, Gundersen, R, Miake-Iye, R., Devreotes, P, Firtel, RA.,(1989). *Cell*, 57: 265-275.
- Laemmli, U.K. (1970). *Nature*, 227: 680-685.
- Lafont, A. (1909). *C. R. Soc. Biol.*, 66:1011-1013.

- Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E., y Sigler, P.B.,(1994). *Nature*, 369: 621-628.
- Lechleiter, J., Girard, S., Clapham, D., y Peralta, E.(1991). *Nature*, 350: 505-508.
- Lee, CH., Katz, A., Simon, M.I.,(1995). *Mol. Pharmacol.*(en prensa)
- Leppla, SH., (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 3162-3166.
- Levin, LR y Zoller, Mj. (1990). *Molec. Cell. Biol.*, 10: 1066-1075.
- Levin, LR, Han, PI, Hwang, PM, Feinstein, PG, Davis, RL.(1992). *Cell*, 68:479-489.
- Lilly, P., Wu, L, Welker, DL., Devreotes, P.,(1993). *Genes& Develp.*, 7: 986-995.
- Lilly,P., y Devreotes, P, (1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 14123-14129.
- Linder, M.E., Ewald, D.A., Miller, RJ., y Gilman, AG.(1990). *J. Biol. Chem.*, 265: 8243-8251.
- Linse, K. y Mandelkow, E. (1988). *J. Biol. Chem.*, 263: 15205-15210
- Livingstone, MS., Sziber, P.P., Quinn, WG.,(1984). *Cell* 37, 205-215.
- Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, EJ., y Clapham, DE., (1987). *Nature*, 325: 321.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.C. y Randal, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 267-275.
- Luise, C, Dollet M., Mariau D., (1986). *Oleagineux* 41: 437-450.
- Lupas,A.N., Lupas, J.M., y Stock, JB.,(1992). *FEBS Lett.*, 314: 105-108.
- Lustig, K.D., Conklin, B.R., Herzmark, P., Taussig, R., Bourne, H.R.,(1993). *J. Biol. Chem.*, 268: 13900-13905.
- Mackman, RS y Sutherland, EW (1965). *J. Biol. Chem.*, 240 :1309-1314.

- Mancini, PE y Paton, C.L., (1981). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 3:19.
- Marché, S., Roth C, Manohar, SK. Dollet M., y Baltz T. (1993). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 57:261-268.
- Marché, S., Roth, C., Philippe, H., Dollet, M. y Baltz, T. (1995). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 71:15-26.
- Marshall, CJ.,(1995). *Cell*, 80: 179-185.
- Marshall, MS., Gibbs, JB., Scolnick, EM, Sigal, IS, (1988). *Mol. Cell. Biol.*, 8: 52-61.
- Massamba, NN., Mutinga, MJ. y Odero, BN. (1992). *Insect Sci. Applic.*, 13:293-306.
- Masson, P, Jacquemin, JM, Culot, M. (1984). *Ann Microbiol*, 135: 343-351.
- Mathews, K y Gull, K.(1994). *Parasitology Today*, 10: 473-476
- Matsumoto, K., Uno, I., Oshima, Y.,Ishikawa, T, (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 79: 2355-2359.
- McGhee, RB. y Hanson, WL. (1964). *J. Protozool.*, 11:555-562.
- Menara, A., Dollet, M., Gargani, D. y Louise, C. (1988). *C. R. Acad. Sci., Paris, Serie III* 307:597-602.
- Mitts, MR, Grant, DB, Heideman, W. (1990). *Mol. Cell. Biol.*, 10: 3873-3883.
- Mobashery, S. y Kaiser,E.T.(1988). *Biochemistry* , 27: 3691-3696.
- Mock, M, Labruyere E, Glase,P, Danchin, A, Ulman, A.(1988). *Gene*, 64:277-284.
- Molyneux, DH.y Ashford, RW. (1983). *The biology of Trypanosoma and Leishmania*, parasites of man and domestic animals. Taylor & Francis, Londres.
- Montminy, MR., y Bilezikjian, L.M., (1987). *Nature*, 328: 175-178.

- Morel, C., Chiari, E., Camargo, EP., Mattei, DM., Romanha, AJ. y Simpson, L. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:6810-6814.
- Moss, J., Tsai S., Russ Price, S., Bobak, D.A. & Vaughan, M. (1991). En: *Methods in Enzymology*, 195: 43-256. Johnson R.A. and Corbin J.D. (ed.).
- Muller, E., Gargani, D., Schaeffer, V., Stevens, J., Fernenandez-Becerra, C., Sanchez-Moreno, M., Dollet, M.(1994). *Europ. J. of Plant Pathol.*, 100:425-434.
- Nath, J., Eagle, G., y Himes, R.,(1985). *Biochemistry*, 24: 1555-1560
- Neer, E. J.(1994). *Protein Sci.*, 3: 3-14
- Northup, J., Smigel, J. y Gilman, A. (1982). *J. Biol. Chem.*, 257: 11416-11423.
- Northup, JK., Sternweis, PC., y Gilman, AG., (1980). *J. Biol. Chem.*, 258: 11361-11368.
- Nunes et al (1994). *J. Euk. Microbiol.* , 41:496-500.
- Ochatt, C M., Ulloa, R..M., Torres, HN,y Tellez-Iñón, M.T.(1993). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 57:73-81.
- Ogueta S.B., Solari A., Tellez -Iñon M.T. (1994) *FEBS letters* 337: 293-297.
- Opperdoes, FR. (1991). Glycosomes. En “*Biochemical Parasitology*” 134-144. Taylor & Francis editores, Londres.
- Opperdoes, FR., (1987). *Ann. Rev. Microbiol.* 41:127-151.
- Osawa, S., Heasley, LE., Dhanasekaran, N., Gupta, N., Woon, SK., Berlot, C. y Johnson, GL. (1990). *Mol. Cel. Biol.*, 10: 2931.
- Pandavoine, P. , Rolin,S., Van Assel, S, Geuskens, M, Jauniaux, J-C., Dinsart, C, Huet, G, Pays, E.(1992). *Mol. Cell. Biol.*, 3: 1218-1225.
- Parthasarathy, MV., van Slobbe, WG. y Soudant, C.(1976). *Science*, 192:1346-1348

- Paveto C, Egidy, G., Galvagno, M.A., Passeron, S. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 167: 1177-1184.
- Paveto C. et al. (1992). *FEBS Lett.* , 311: 1, 51-54.
- Pays, E. (1993) Genome organization and control of gene expression in trypanosomatids. En "*The eukaryotic genome*" 127-160. Cambridge University Press, Cambridge.
- Perthuis, B., Desmier de Chenon, R. y Merland, E. (1985). *Oléagineux*, 40:473-476.
- Peters, EP, Wilderspin, AF., Wood, SP., Zwelebil MJJM, Sezer, O, Danchin, A.(1991). *Mol.Microbiol*, 5: 1175-1181.
- Petry, K., Gargani, D., Baltz, T., Kastelein, P. y Dollet, M. (1989). *Phytopathology*, 126:59-68.
- Petry, K., Schottelius, J. y Dollet, M. (1987). *Parasitol. Res.*, 74:1-4.
- Pfeuffer, E. y Pfeuffer, T.,(1991) en *Methods in enzymology*; vol 195: 171-177. Johnson RA, Corbin JD, eds. Adenylyl cyclase, G proteins and guanylyl cyclase. San Diego: Academic Press.
- Pfeuffer, E., Mollner, S., Pfeuffer, T.,(1991). en *Methods in enzymology*; vol 195: 83-91. Johnson RA, Corbin JD, eds. Adenylyl cyclase, G proteins and guanylyl cyclase. San Diego: Academic Press.
- Pitcher, J.A., Inglese, J., Higgins, J.B., Arriza, J.L., Casey, P.J., Kim, C., Benovic, J.L., Kwatra, M.M., Caron, MG., y Lefkowitz. R.J.,(1992). *Science*, 257: 1264-1267.
- Pitt, G S, Milona, N, Borleis J., Lin KC, Reed RR, Devreotes PN.(1992). *Cell*, 69:305-315.
- Premont, RT, Chen, J.Q., Ma, H.W., Ponnappalli, M., y Iyengar, R(1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 89: 9809-9813.
- Pronin, AN., y Gautam, N.,(1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 6220-6224.

- Pupillo, M., Kumagai, A., Pitt, G.S., Firtel, R.A., Devreotes, P. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 4892-4896.
- Rahmatullah, M., y Robishaw, J.D., (1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 3574-3580.
- Rangel-Aldao, R y Rosen, O.M. (1976). *J. Biol. Chem.*, 251:7526-7529.
- Rangel-Aldao, R., Tovar, G., y Ledezma-Ruiz, M. (1983). *J. Biol. Chem.*, 258:6979-6983.
- Rangel-Aldao, R., Allende, O., Triana, F., Piras, R., Henriquez, D., Piras, M., (1987). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 22: 39-43
- Rasenick, M.M., Watanabe, M., Lazarevic, M.B., Hatta, S., y Hamm, H.E., (1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 21519-21528.
- Read L.K., Mikkelsen, R.B., (1991). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 45: 109-120.
- Reig Macia, J.A., Téllez-Iñón, M., Flawiá, M.M., Torres, H.N., (1984). *Biochem. J.*, 141: 1-11.
- Reuveny, E., Slesinger, P.A., Inglese, J., Morales, J.M., Iñiguez-Lluhi, J.A., Lefkowitz, R.J., Bourne, H.R., Jan, Y.N., y Jan, L.Y. (1994). *Nature*, 370: 143-146.
- Rodbell, M. (1967). *J. Biol. Chem.* 242: 5744-5750.
- Rolin, S., Paindavoine, P., Hancocq-Quertier, J., Hancocq, P., Claes, Y., Le Ray, D., Overath, P., y Pays, E., (1993). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 61: 115-126.
- Rosen, O.M. y Erlichman, J. (1975). *J. Biol. Chem.*, 250, 7788-7794.
- Roskoski, R. (1983). *Methods Enzymol.*, 99: 3-6.
- Ross, D.T., Raibaud, A., Floren, I.C., Sather, S., Gross, M.K., Storm, D.R., Eisen, H. (1991). *EMBO J.*, 10: 2047-2053.
- Roy A y Danchin A. (1982). *Mol. Gen. Genet.*, 188:465-471.
- Roy, A. y Danchin, A. (1981). *Biochimie*, 63:719-273.



- Rubinstein, M., Muschietti, J., Gershianik, O., Flawiá, M. & Stefano, F. (1989). *J. Pharmacol. Exp. Ter.*, 252: 810-816.
- Russel, DG., Xu, S. y Chakraborty, P. (1992). *J. Cell Sci.*, 103:1193-1210.
- Salomon, Y. (1979) . *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 10: 35-41.
- Salomon, Y., Londos, C. y Rodbell, M. (1974). *Anal. Biochem.*, 58: 541-548.
- Sanchez M., Zeoli, D., Lamo, E., Kavanaugh, MP, Landfear, S.M.(1995). *J. Biol. Chem.*, 270: 17551-17558.
- Sanchez Moreno, M., Fernández-Becerra, C., Entrala, E., Opperdoes, FR., Dollet, M., Osuna, A.(1995). *J. Euk. Microbiol.*, 42(3): 314-320
- Sanchez Moreno, M., Lasztity, D., Coppens, I. y Opperdoes, FR. (1992). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 54:185-200.
- Santa Coloma, T., Muschietti, J. & Charreau, E. (1986). *Comp. Biochem. Physiol.*, 85: 401-405.
- Sarkar, D., Erlichman, J. y Rubin, C.S.(1984). *J. Biol. Chem*, 259, 9840-9846.
- Saxe, CL, Johnson, RL., Devreotes, P, Kimmel, AR. (1991). *Genes & Dev.*, 5: 1-8.
- Schenkman, S. y Eichinger, D. (1993). *Parasitology Today*, 9:255-258.
- Schmidt, C.J., Thomas, T.C., Levine, M.A., y Neer, E.J., (1992). *J. Biol. Chem.*, 267: 13807-13810.
- Schulz, JE, Klumpp, S. Benz, R., Schürhoff- Goeters, W, Schmid, A.,(1992). *Science*, 255, 600-603.
- Scott, J.D y McCartney,S, (1994). *Mol. Endocrinol.*, 8: 5-11.
- Sherwin, T. y Gull, K. (1989). *Philos. Trans. Royal Acad. Sci., Serie B* 323:573-588.

- Shoji, S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Fischer, E.H. y Titani, K.(1983). *Biochemistry*, 22: 3702-3709.
- Shoji, S., Parmelee, D.C., Wade, R. d., Kumar, S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Neurath, H., Long, G.L., Demaille, J.G., Fischer, E.H.y Titani, K.,(1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78: 848-851.
- Simon, M., Strathmann, MP, y Gautman, N. (1991). *Science*, 252: 802-808.
- Simpson, L. y Shaw, J. (1989). *Cell*, 57:355-366.
- Skiba,NP., Artemyev, N.O., y Hamm, H.E., (1995). *J. Biol. Chem.*, 270: 13210-13215.
- Smiegel, M.D., (1986). *J. Biol. Chem.*, 261, 1976-1982.
- Smrcka, A.B., y Sternweis, P.C.(1993). *J. Biol. Chem.*, 268: 9667-9674.
- Solari, A., Muñoz, S., Venegas, J., Wallace, A., Aguilera, X., Apt, W., Brenière, SF. y Tibayrenc, M. (1992). *Exp. Parasitol.* 75:187-195.
- Sondek, J., Lambright, D.G., Noel, JP., Hamm, H.E, y Sigler, P.B.(1994). *Nature* , 372: 276-279.
- Spiegel A., (1990). en “*G Proteins*”, Iyengar R. y Birnbaumer, L. (eds.), Academic Press; (cap 6),115-143.
- Spring, D.J., y Neer, E.J.( 1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 22882-22886.
- Stahel , G. (1931). *Phytopathol. Z.*, 4:64-82.
- Steinberg, R., Cauthron,R, Symcox, M., y Shuntoh, H.(1993). *Molec. and Cell . Biology*, 13: 2332-2341.
- Strittmatter, S.M., Valenzuela, D, Kennedy, TE., Neer, E.J., Fishman, M.C., (1990). *Nature*, 344: 836-841.
- Stuart, K. y Feagin, JE. (1992). *Intl. Rev. Cytol.*, 141:65-88.
- Sutherland, E.W. y Rall, T.W., (1957). *J.Am. Chem. Soc.*, 79: 3608-

- Tanaka, K. Nakafuku, M, Satoh, T., Marshall, Ms, Gibbs, JB., Matsumoto K, Kaziro Y, Toh-e, A. (1990). *Cell*, 60: 803-807.
- Tang, W-J, y Gilman A.G.(1991). *Science*, 254: 1500-1503.
- Tang, W-J., Gilman, AG.,(1995). *Science*, 268:1769-1772.
- Tang, W-J., Krupinski, J., Gilman AG. (1991). *J. Biol. Chem.*, 266: 8595-8603.
- Taussig, R, Iñiguez-LLuhi, J., Gilman, AG, (1993). *Science*, 261: 218-221.
- Taussig, R, Tang, W-J., Hepler, J.R., Gilman, AG., (1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 6093-6100.
- Taussig, R., Quarmby, LM., Gilman, AG., (1993). *J. Biol. Chem.*, 268: 9-12.
- Taylor, S.S., Buecheler, J.A.,y Yonemoto, W.(1990). *A. Red. Biochem.*, 59: 971-1005.
- Teixeira et al., (1995). *J. Euk. Microbiol.*, 43(3):232-237.
- Tibayrenc, M. y Ayala, FJ. (1991). *C. R. Acad. Sci. Paris, t. 304, Serie III*, N°4.
- Titani, K., Sasagawa, T., Ericsson, L.H., Kumar, S., Smith, S.B., Krebs, E. G. y Walsh, K.A.(1984). *Biochemistry*, 23: 4193-4199.
- Toda, T, Cameron, S., Sass, T., Zoller,M., Scott, J.D., McMullen, B.,Hurwitz,M., Krebs, E.G. y Wigler, M.(1987). *Molec. Cell. Biol.*, 7:1371-1377.
- Toner-Webb, J. y Taylor, S. S., (1987). *Biochemistry* , 26: 7371-7378.
- Torruela, M., Flawiá, MM, Eisenchlos, C., Molina y Vedia, L. Reubisntein, C.P., Torres, H.N.,(1986). *Biochem.J.*, 234: 145-150.
- Touhara, K.J., Inglese, J., Pitcher, JA., Shaw, G., Lefkowitz, (1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 10217-10220.
- Ueda, K. y Hayaishi, O.(1985). *Annu. Rev. Biochem.*, 54: 73-100.

- Ullman, A. y Danchin, A.,(1983). En Greengard P., Robison GA Eds., "Advances in Cyclic Nucleotide Research", Vol 15, New York: Ravens Press, 1-52.
- Ullmann, A. y Monod, J.(1968). *FEBS Lett.*, 2: 714-717.
- Ulloa, R.M, Mesri, E., Esteva, M., Torres, H.N., y Tellez-Iñón, M.T., (1988). *Biochem. J.*, 255: 319-326.
- Vainstein, MH. y Roitman, I. (1986). *J. Protozool.* 33:511-513.
- Vickerman K. (1994). *Intern. J. Parasitol.* 24: 1317-1331
- Vickerman, K. y Dollet, M. (1992). *Oléagineux*, 47:593-600.
- Vickerman, K. y Tetley, L. (1990). Flagellar surfaces of parasitic protozoa and their role in attachment. En "Ciliary and Flagellar membranes" 267-304, Plenum Press, Nueva York.
- Vickerman, K., (1985). *British Medical Bulletin* 41:105-114
- Visconti, P., Muschiatti, J., Flawiá, M. & Tezón, J. (1990). *Biochim. et Biophys. Acta* 1054: 231-236.
- Vorherr, T., Knopfel, L., Hofmann, F., Mollner, S., Pfeuffer, T., y Carafoli, E.,(1993). *Biochemistry*, 32:6081-6088.
- Voyno-Yasenestskaya, T., Conklin, B.R., Gilbert, RL., Hooley, R., Bourne, HR., y Barber, D.L.(1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 4721-4724.
- Waldo, G., Evans, T., Fraser, E., Northup, J., Martin, M. y Henden, T. (1987). *Biochem. J.* 246: 431-439.
- Wall, M.A., Coleman, DE., Lee, E., Iñiguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, AG., Sprang, S.,(1995). *Cell*, 83: 1047-1058.
- Walsh, D.A., Ashby, C.D., Gonzalez, C., Calkins, D., Fischer, E.H., y Krebs, E.G.(1971). *J. Biol. Chem.*, 246: 1977-1985.
- Walter, RD, (1978). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359: 607.
- Wang, JYJ, Clegg, D.O., Kochland, D.E.Jr. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78: 4684-4688.

- Watson, A.J., Katz, A., and Simon, M.I., (1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 22150-22156.
- Weber, I.T., Takio, K., Titani, K y Steitz, T.A.(1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 7679-7683.
- Webster, P. y Russel, DG. (1993). *Parasitol. Today*, 9:201-206.
- West, R.E., Moss, J., Vaughn, M., Lin, T., y Liu, T-Y, (1985). *J. Biol. Chem.*, 260:14428-14430.
- Whitehouse, S, y Walsh, D.A.(1982). *J. Biol. Chem.* 257: 6028-6032.
- Wickman, KD., Iñiguez-Lluhi, JA., Davenport, PA., Taussig, R., Krapivinsky,GB., Linder, ME., Gilman, AG., and Clapham, DE., (1994). *Nature*, 368:255-257.
- Wilcox, MD., Schey, KL., Dingus, J., Mehta, D., Tatum, BS., Halushlea, M., Finch, JW., and Hildebrandt, JD., (1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 12508-12513.
- Wildman, DE, Tamir, H., Leberer, E., Northrup, J.K., y Dennis, M., (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:794-798.
- Wittinghofer A,(1994). *Cell*, 76: 201-204.
- Wolff, J y Cook, GH.(1973). *J. Biol. Chem.*, 248: 350-355.
- Wolff, J. Cook GH., Goldhammer, AR, Berkowitz SA.(1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77:3840-3844.
- Wong, S.K-F, y Ross, E.M.,(1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 18968-18976.
- Wong, Y.H., Federmen, a., Pace, A.M., Zachary, I., Evans, T., Poysegur, J., y Bourne, H.R., (1991). *Nature*, 351: 63-65.
- Wu, L., Gaskins, C., Gundersen, R., Hadwiger, J., Johson, R., Pitt, G., Firtel, R., Devreotes, P.,(1993). En *Handbook of Experimental Pharmacology, GTPases in Biology II*. B. Dickey and L. Birnbaumer, editors. Springer-Verlag Publication, Berlin, 335-349.
- Wu, L., Gaskins, C., Zhou, K., Firtel, RE., Devreotes, P., (1994). *Mol. Biol. Cell.*, 5: 691-702.

- Wu, L., Valkema, R., Van Haastert, PJM., Devreotes, P.,(1995). *J. Cell Biol.*, 129: 1667-1675.
- Wu, L., y Devreotes, P. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179: 1141-1147.
- Yamawaki-Kataoka Y., Tamaoki,T, Choe, H\_R, Tanaka, H, Kataoka, T. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 86: 5693-5697.
- Yoshimura, M., y Cooper, DMF.,(1993). *J. Biol. Chem.*, 268;4604-4607.
- Young D. , O'Neill K, Broek D., Wigler, M. (1991). *Gene*, 102:129-132.
- Young, D., Riggs M., Field, J, Vojtek, A, Broek, D. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 86: 7989-7993.
- Yunker C.E., Vaughn J.L. & Cory J. (1967). *Science*, 155: 1565-1566.
- Zoller, M. J. y Taylor, S.S.(1979). *J. Biol. Chem*, 254:8363-8368.

*APENDICE*

## Abreviaturas

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico copia

**ADNk:** ácido desoxirribonucleico del quinetoplasto

**ADP:** adenina dinucleótido

**AMPc:** adenosina 3'-5' monofosfato cíclico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**ARNr:** ácido ribonucleico ribosomal

**ATP:** adenosina 5' trifosfato

**BCIP:** 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil-fosfato

**BSA:** albúmina bovina sérica

**cPKA:** subunidad catalítica de la quinasa de proteínas

**cpm:** cuentas por minutos

**CT:** toxina de *Vibrio cholerae*

**dbAMPc:** dibitiril AMPc

**DEAE:** dietil aminoetil

**DTT:** ditioneitol

***E. characias:*** *Euphorbia characias*

**EDTA:** ácido etilen diamino tetracético

**EGTA:** ácido etilenglicol bis ( $\beta$ -aminoetileter) N,N,N',N' tetraacético

**GDP:** guanosina 5' difosfato

**GMPC:** guanosina 3'-5' monofosfato cíclico

**GTP:** guanosina 5' trifosfato

**GTP $\gamma$ S:** guanosina 5'-O-(3-tio trifosfato)

**hs.:** horas

**kDa:** kilo Daltones



**MP:** mastoparán

**min:** minutos

**MIX:** 3-isobutil-1-metil-xantina

**NAD:** nicotinamida adenina dinucleótido

**NBT:** azul de tetrazolio

**PAGE-SDS:** geles de poliacrilamida desnaturalizantes

**PBS:** solución de fosfatos

**PDE:** fosfodiesterasa

**PKA:** quinasa de proteínas dependiente de AMPc

**PKC:** quinasa de proteínas de tipo C

**PKI:** inhibidor de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc

**PM:** peso molecular

**PMSF:** fenilmetilsufonil fluoruro

**PT:** toxina de *Bordella pertussis*

**PLC:** fosfolipasa tipo C

**SDS:** dodecil sulfato de sodio

**TCA:** ácido tricloroacético

**TEMED:** N,N,N',N' tetrametil etilendiamina

**tox.:** toxina

**TRIS:** 2-amino-2 hidroximetil-1,3 propanodiol

**trips.:** tripanosomátidos

**Tween 20:** polioxietilensorbitano monolaurato

**UV:** luz ultravioleta

## Transducción de señales en *Phytomonas* (parásitos de plantas)

*Phytomonas* es un género de la familia Trypanosomatidae que parasita plantas. Si bien muchos de sus componentes no provocan daño a sus respectivos huéspedes, otros en cambio, son responsables de afecciones que acarrearán pérdidas económicas. Tal es el caso de las palmas aceiteras en países como Colombia, Venezuela y Guyana, el café en Brasil y algunos reportes de daño en algunos frutos como el tomate, tanto en Brasil como en España (Granada). La especie objeto de este estudio no es patógena y corresponde a la aislada de *Euphorbia characias* (planta laticífera). Contiene una adenilil ciclasa unida a membranas y un sistema transductor de señales de proteínas G, del tipo Gs y Gi. Estas proteínas afectan la actividad de la adenilil ciclasa y posiblemente participan en un mecanismo que involucra a una señal de tipo hormonal. Si bien no existen evidencias directas de la existencia de un receptor, la proteína del tipo Gi es capaz de interactuar con el péptido tóxico Mastoparín, que mimetiza la acción de los receptores acoplados a proteínas G.

Se analizaron distintas fracciones subcelulares para caracterizar una actividad de quinasa de proteínas modulada por AMPc (PKA). Las fracciones subcelulares purificadas por cromatografía en DEAE-celulosa mostraron dos picos de actividad enzimática frente a histona IIA y a képtido como sustratos. Usando un anticuerpo policlonal contra la subunidad catalítica de PKA de corazón bovino, se inmunoprecipitó un polipéptido con un peso molecular de 40 kDa. Estos datos en conjunto sugieren la presencia de dos tipos de actividad de quinasa de proteína de pendiente de AMPc (tipo I y II).

Experimentos in vivo con toxina del cólera, dieron como resultado un arresto del ciclo celular del parásito, poniendo en evidencia un efecto ambiguo de la vía de señalización mediada por AMPc, que requerirá de futuros estudios para su profundización.

Datos preliminares, aunque incompletos nos dan un primer indicio de la conservación de este tipo de vía en una cepa patógena (responsable del Hartrot de las palmas aceiteras). La extrapolación de los resultados anteriores, nos permitirán diseñar aquellos experimentos tendientes a tratar de develar dónde reside la diferencia de patogenicidad de ambas cepas.

## SIGNAL TRANSDUCTION IN *PHYTOMONAS* (PLANT PARASITE)

AUTHOR: Marisa D. FARBER

ADVISOR: Dr. Mirtha M. FLAWIA

*Phytomonas* constitute a genus of flagellated trypanosomatids with the capacity to infect plants. Although these trypanosomatids parasitize many plant species without apparent pathogenicity, in some cases they are responsible for economically important diseases including those affecting *Solanum lycopersicum* (tomato), *Coffea liberica* (coffee), *Cocos nicifera* (coconut) and *Elaeis guineensis* (oil palm).

*Phytomonas* sp membranes have an Adenylyl cyclase activity which is greater in the presence of  $Mn^{2+}$  than with  $Mg^{2+}$ . The  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  activity ratio varies from one preparation to another, suggesting that the Adenylyl cyclase has a variable activation state. A [ $^{35}S$ ] GTP- $\gamma$ -S-binding activity with a  $K_d$  of 171 nM was detected in *Phytomonas* membranes. Incubation of these membranes with activated cholera or pertussis toxins and [adenylate  $^{32}P$ ]NAD $^+$  led to incorporation of radioactivity into bands of about 40-44 kDa. Crude membranes were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels and analyzed by Western blotting with the 9188 anti- $\alpha$ s antibody and the AS/7 antibody (anti- $\alpha$ t, anti- $\alpha$ i1, anti- $\alpha$ i2). These procedures resulted in the identification of polypeptides of approximately 40-44 kDa. *Phytomonas* Adenylyl cyclase could be activated by treatment of membrane preparations with cholera toxin in the presence of NAD $^+$ , while treatment with pertussis toxin did not affect this enzyme activity. These studies indicate that in *Phytomonas*, Adenylyl cyclase activity is coupled to an unknown receptor entity through G $\alpha$ s proteins.

We have identified two types of cyclic AMP-dependent protein kinase activity in *Phytomonas* cytosol. Criteria to assert the authenticity of this activity are the following: 1- The enzyme is specifically activated by cAMP; 2- Specificity for phosphate acceptors characteristic of this type of phosphotransferase activity; 3- DEAE-cellulose fractions specifically bind [ $^3H$ ] cAMP; 4- Polyclonal antibodies to bovine heart catalytic subunit immunoprecipitates a 40 kDa phosphorylated polypeptide; 5- As occurs with mammalian type II cAMP dependent protein kinase, the activity corresponding to peak II is able to phosphorylate its own "regulatory component" and this does not occur with the enzyme obtained in peak I.

As the present results were done in *Phytomonas* isolated from *E. characias* (a non-pathogenic species) our next goal is to verify the regulation of this signaling pathway in other strains, trying to understand the relationship with the host, and find out why some of them are responsible of plant diseases.

## Palabras claves

*Phytomonas*

Adenilil ciclasa

Proteína G

Quinasa de proteínas dependiente de AMPc (PKA)

AMPc

tripanosomátidos

**Key words**

*Phytomonas*

Adenylyl cyclase

G-protein

cAMP-dependent protein kinase (PKA)

cAMP

trypanosomatids

*(Handwritten signature)*  
H. Farber

*(Handwritten signature)*