

Tesis de Posgrado

Clonado, organización genómica y expresión de la glutamato dehidrogenasa NADP dependiente (GluDH-NADP) de Trypanosoma Cruzi

Barderí, Patricia Alejandra

1998

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

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

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

Cita tipo APA:

Barderí, Patricia Alejandra. (1998). Clonado, organización genómica y expresión de la glutamato dehidrogenasa NADP dependiente (GluDH-NADP) de Trypanosoma Cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3065_Barderí.pdf

Cita tipo Chicago:

Barderí, Patricia Alejandra. "Clonado, organización genómica y expresión de la glutamato dehidrogenasa NADP dependiente (GluDH-NADP) de Trypanosoma Cruzi". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3065_Barderí.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**CLONADO, ORGANIZACION GENOMICA Y EXPRESION
DE LA GLUTAMATO DEHIDROGENASA
NADP DEPENDIENTE (GluDH-NADP) DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Autora: PATRICIA ALEJANDRA BARDERI

Director: Dr. JUAN JOSE CAZZULO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
«LUIS FEDERICO LELOIR», FUNDACION CAMPOMAR**

Nº 3 06 5

1998

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**THESIS IN FULFILMENT OF THE DEGREE OF DOCTOR
OF THE UNIVERSITY OF BUENOS AIRES**

**CLONING, GENOMIC ORGANIZATION AND
EXPRESSION OF THE NADP-DEPENDENT
GLUTAMATE DEHYDROGENASE (NADP-GluDH) OF
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Author: PATRICIA ALEJANDRA BARDERI

Director: Dr. JUAN JOSE CAZZULO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
«LUIS FEDERICO LELOIR»,
FUNDACION CAMPOMAR**

A mi madre, por su apoyo y estímulo continuo
y por su perseverancia en la vida.
A mi hermana, por su invalorable amistad.
A la memoria de mi padre, por los buenos momentos.

A mi querido Fernán, por todo.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e Instituciones que aportaron su granito de arena, para que de un modo u otro mi trabajo de Tesis Doctoral se concretara.

A la Comisión Directiva del Instituto de Investigaciones Bioquímicas “Fundación Campomar” por haber posibilitado mi formación, permitiéndome realizar los estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme adjudicado las becas que me sustentaron económicamente durante la realización de la Tesis Doctoral.

Al Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín y a su director el Dr. Alberto Carlos Frasch por el sustento económico durante la escritura de la Tesis Doctoral.

A la Dra. Sara H. Goldemberg por haberme permitido trabajar en su laboratorio, en el cuál me inicié en la investigación, contribuyendo en mi formación científica.

Al Dr. Juan José Cazzulo por haber confiado en mí, dándome la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por el aprendizaje que significó realizar la Tesis bajo su dirección. ¡Gracias por su apoyo y atención en los difíciles momentos iniciales!

Al Dr. Alberto Carlos Frasch por sus consejos y su estímulo, y por su disposición para la discusión oportuna de los resultados.

Al Dr. Oscar Campetella por el clon de la GluDH-NADP y su antisuero, y por sus consejos e interpretaciones de algunos experimentos.

A la Dra. Berta Franke por su amistad, ayuda y buena disposición en todo momento.

Al Dr. José A. Santomé, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA y al Dr. Ulf Hellman, del Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden, por la secuenciación de los péptidos.

Al Dr. Ulf Petterson, Jefe del Departamento de Medicina Genética del Biomedical Center, Universidad de Uppsala, por el análisis puntilloso de los resultados y del manuscrito del trabajo publicado.

A Laura Cremona, Verónica Pascuccelli, Oscar Campetella y Alejandro Buschiazzi por su ayuda y consejos en las técnicas de Biología Molecular.

A mi querido amigo Javier Martínez. Por nuestra amistad que pasó la barrera del tiempo y del espacio.

A Carolina Ceriani, Sandra Fernández, Marcelo Rodríguez, Vilma Duschak, Verónica Pascuccelli, Fabiola Parussini, Sandra Fanchiotti, Alejandra Guerchickoff, Silvana Merello, Mirtha Brignoni, Marina Marzocca y Nancy Cáceres, por haber compartido a lo largo de los años muchos momentos de charlas, trabajo y sobre todo amistad.

A todos mis compañeros de laboratorio, los míos los tuyos y los nuestros, desde que entré a trabajar en la Fundación: Laura Morello, Nancy Cáceres, Alejandro Menyhart, Javier Martínez, Vilma Duschak, Fernán Agüero, Fabiola Parussini, Denise Muñoz, Mirtha Brignoni, Carlos Labriola, Cristina Cazzulo, Juan Mucci, Liliana Sferco y Mayra García. A todos ellos, gracias por todos los momentos que compartimos durante las largas horas en el laboratorio.

A toda la banda del ex-112: Carlos Buscaglia, Javier Di Noia, Alejandro Buschiazzi, Guido Pollevick, Marcelo Guerin y Daniel Sánchez.

Y a todos los compañeros de otros laboratorios: Susana Raffo, Amy Curto, Verónica Morvillo, Marcela Barrio, Irma Mastronardi, Adrián Vojnov, Daniel Bassi, Roberto Rodríguez Suárez, Cristina Bertinetti, Fabiana Fernández, Karin Hagelin, Andrea Rostchild, Alejandro Rabossi, Eduardo Cafferata, Verónica Herrera.

A Georgina, Carlos y Cristina por su gran ayuda antes y después de la mudanza.

A Marta Bravo, Alejandra Raimondi y Mario Sakson por las corridas en HPLC y FPLC.

A Margarita por su disposición constante.

A mis amigas Gabriela, Ana y Cecilia por nuestra gran amistad que trasciende los años.

A mi querida tía Nola por estar con nosotros desde siempre brindándonos su afecto.

A Judith Diacovetzky, Estela Pezzi, Cristina Ascolani y a mis compañeros del CBC, especialmente a Verónica Herrera, por las mañanas tan temprano. Aunque como dice Estela "Amanece que no es poco".

A la Prof. A. Rizzo Ricci, la Lic. Alicia Renzi y la Lic. Susana Rutenberg porque desde diferentes ángulos contribuyeron (y continúan haciéndolo) positivamente en mi futuro.

A Alejandro, mi único hermano.

A mi nueva familia, Marta, la abuela Nélida, Lisandro y Ramiro.

A todos mis compañeros de la Facultad, con los que compartí todos o gran parte de los años de la carrera de Ciencias Biológicas, con las ilusiones y utopías de aquellos años y que hoy están desparramados por el país y el mundo.

“Clonado, organización genómica y expresión de la glutamato dehidrogenasa NADP dependiente (GluDH-NADP) de *Trypanosoma cruzi* “.

Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, el protozoo parásito que causa la enfermedad de Chagas, contienen dos glutamato dehidrogenasas diferentes (GluDHs), NAD y NADP dependientes. En este sentido los parásitos se asemejan a las bacterias, hongos y plantas y se diferencian de animales superiores que poseen sólo una enzima inespecífica para coenzima. La GluDH-NADP dependiente (EC 1.4.1.4) es un hexámero formado por subunidades idénticas de 47kDa, mostrando ser muy semejante a la correspondiente enzima de *E. coli* en cuanto a la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal. La forma NADP dependiente podría ser biosintética mientras la forma NAD dependiente podría tener un rol catabólico.

La GluDH-NADP dependiente fue purificada a homogeneidad proteica a partir de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* mediante un protocolo mejorado que incluye cromatografía de afinidad en Blue Sepharose. Se determinó la secuencia de aminoácidos de 11 péptidos internos, obtenidos por digestión con BrCN, tripsina, endopeptidasa Arg-C o endopeptidasa Lys-C. Dichas secuencias, correspondientes aproximadamente al 30% de la molécula, mostraron una identidad del 74% con la enzima similar de *E. coli*. Utilizando un suero policlonal monoespecífico producido contra la proteína purificada se realizó el rastreo de una biblioteca de expresión genómica de *T. cruzi* en el vector λ gt11. De esta forma pudo seleccionarse un único clon conteniendo 270 pb correspondientes al extremo 3' del gen que fue secuenciado completamente. Reacciones de PCR usando iniciadores contruídos de acuerdo a la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de la enzima madura y con la secuencia del clon correspondiente al extremo C-terminal pudieron clonarse y secuenciarse dos ORFs completos (*TcGluDH1* y *TcGluDH2*). Las secuencias obtenidas muestran mayor homología con la enzima de *Escherichia coli* (70-72% de identidad), y menor homología (52-57%) con la correspondiente enzima de eucariontes inferiores. A partir de la secuencia de ADN se predijo una proteína que contiene 446 aminoácidos. Usando el gen *TcGluDH1* como sonda se realizaron experimentos de Southern blot, usando fragmentos de restricción o cromosomas enteros separados por electroforesis en campo pulsado, indicando variaciones entre los diferentes clones y cepas de parásitos, sugiriendo la presencia de varios genes codificando para la GluDH-NADP. La expresión de la enzima resultó ser diferente en los distintos estadios del desarrollo. La forma epimastigote presenta mayor cantidad de ARNm y proteína (a juzgar por la actividad enzimática y ensayos de Western blot), en comparación con otras formas del parásito. El

gen clonado *TcGluDH1* fue expresado en *E. coli*, produciendo una enzima recombinante activa con constantes cinéticas similares a la enzima natural. A pesar de que las evidencias bioquímicas sugieren que la enzima se localiza tanto en el citoplasma como en la mitocondria, nuestros resultados indican una localización exclusivamente citosólica para la GluDH-NADP.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*; glutamato dehidrogenasa NADP dependiente; catabolismo de aminoácidos; purificación; secuenciación de ADN; comparación de secuencias; secuenciación de proteínas.

“Cloning, genomic organization and expression of the NADP-glutamate dehydrogenase (NADP-GluDH) of *Trypanosoma cruzi* “.

Epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, the parasitic protozoan which causes Chagas disease, contain two different glutamate dehydrogenases (GluDHs), one NADP-linked and one NAD-linked. The parasite therefore resembles bacteria, fungi and plants in this respect, and clearly differs from higher animals, which possess only one, coenzyme-unspecific, GluDH. The NADP-GluDH (EC 1.4.1.4), which is a hexamer made up of identical subunits of Mr 47.000, seems to be very similar to the enzyme from *E. coli* in terms of amino acid composition and N-terminal sequence. The NADP-GluDH might be biosynthetic, whereas the NAD-linked enzyme might have a catabolic role.

The NADP-linked glutamate dehydrogenase has been purified to homogeneity from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* by an improved procedure using Blue Sepharose affinity chromatography. The amino acid sequences of 11 internal peptides obtained by digestion with CNBr, trypsin, Arg-C endopeptidase or LysC endopeptidase, showed 74% identity with the similar enzyme from *E. coli*, over about 30% of the molecule. A polyclonal monoespecific antiserum against the purified enzyme was used for screening a genomic expression library of *T. cruzi* in λ gt11. A clone containing 270 bps at the 3'-end of the gene was selected, and completely sequenced. Using PCR reactions with oligonucleotide primers synthesized according to the amino acid sequence of the N-terminus of the mature enzyme, and to the nucleotide sequence of a clone corresponding to the C-terminus, two complete ORFs (*TcGluDH₁* and *TcGluDH₂*) were isolated and sequenced. The sequences obtained are most similar to that of the NADP-GluDH of *Escherichia coli* (70-72% identity), and less similar (52-57%) to those of lower eukaryotes. The protein predicted from DNA sequence contains 446 amino acids residues. Using *TcGluDH₁* as a probe, Southern blot experiments of both, restriction fragments and whole chromosomes separated by pulsed-field electrophoresis, indicated variations among different parasite strains and clones, and evidence for the presence of several genes. The expression of the enzyme was shown to be developmentally regulated, the epimastigote stage having a considerably larger amount of both, mRNA and protein (as judged from enzyme activity and Western blots), as compared with the other parasite forms. The cloned gene *TcGluDH₁* was expressed in *E. coli*, producing active recombinant enzyme with kinetic constants similar to those of the

natural NADP-GluDH. Although biochemical evidence had previously suggested that the enzyme has a multiple localization (cytosolic and mitochondrial localization), our results suggested an exclusively cytosolic localization for NADP-GluDH.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; NADP-linked glutamate dehydrogenase; amino acid catabolism; purification; DNA sequencing; sequence comparison; protein sequencing.

Las siguientes publicaciones contienen los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral.

Nacionales

Improved purification methods for the NADP-linked Glutamate dehydrogenase; Cruzipain, and its C-terminal domain from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*
Patricia Barderi, Carlos Labriola, Javier Martínez, Antonio Coira, Martha Bravo, Alejandra Raimondi and Juan José Cazzulo.

Anales Asoc. Quím. Argentina. 81 (2-3), 88-99 (1993).

Internacionales

The NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: sequence, genomic organization and expression.

P. Barderi, O. Campetella, A.C.C. Frasch, J.A. Santomé, U. Hellman, U. Petersson and J.J. Cazzulo.

Biochemical Journal. 330, 951-958 (1998).

Abreviaturas y Aclaraciones

A	absorbancia
α KG	α -cetoglutárico
ADNc	ADN copia
ADNk	ADN kinetoplástico
ATP	trifosfato de adenosina
BCIP	5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato
BrCN	bromuro de cianógeno
BSA	seroalbúmina bovina
CAPS	3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico
Ci	curie
CM	carboximetil
DEAE-celulosa	dietilaminoetil-celulosa
DEPC	dietilpirocarbonato
dNTP	2'-deoxinucleósido 5'-trifosfato
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilén diamino tetracético
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GluDH	glutamato dehidrogenasa
GST	glutación-S-transferasa
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IBz	o-iodosobenzoato
Ig	inmunoglobulina
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
kDa	kiloDaltones
kpb	kilopares de bases
λ	lambda
MEM	medio de Eagle modificado

MOPS	[3-(N-morfolino)-propanosulfónico]
NAD	nicotinamina adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	nicotinamina adenina dinucleótido (forma reducida)
NADP	nicotinamina adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	nicotinamina adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NBT	azul de nitrotetrazolio
NEM	N-etil maleimida
NP-40	nonidet P-40 (octilfenoxi-poliétoxietanol)
ORF	marco abierto de lectura
p/v	peso en volumen
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
pCMB	p-cloromercuribenzoato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PFGE	electroforesis en gel de campo pulsado
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
PVDF	polivinildifluoruro
RMN	resonancia magnética nuclear
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR acoplada a transcripción reversa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SSC	solución de sodio-citrato
splicing	corte y unión de moléculas de ARN
TBE	amortiguador tris borato-EDTA
TBS	amortiguador tris salino
TBS-T	TBS-Tween-20
TCA	ácido tricloroacético
TE	amortiguador tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N' tetrametil etilendiamina
TFA	ácido trifluoroacético
TLCK	tosililclorometilcetona
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1-3-propanodiol
UDO	unidad de densidad óptica

ufp	unidad formadora de placa de lisis
UTR	región no traducida
p/v	peso en volumen
v/v	volumen en volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

Indice General

Introducción 23

Protozoos Parásitos	24
Introducción	24
Clasificación	25
Taxonomía de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Los Trypanosomátidos	26
¿Como se reconstruye la historia evolutiva de estos organismos?	28
Características novedosas de estos organismos	30
El kinetoplasto	30
Una cromatina descondensada	31
Un fenómeno genético primitivo. Editado de una molécula de ARN o “editing”.	31
Transcripción discontinua de los ARNm	32
El “trans- splicing”	33
Los promotores en los Trypanosomátidos	34
El bolsillo flagelar	34
Ciclo de vida e interacción hospedador-parásito	35
Interacción hospedador-parásito	35
Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
Invasión de la célula hospedadora	38
Diferenciación	40
La Enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis Americana	41
Etapas de la enfermedad. Evidencias clínicas	41
¿Quiénes son los más afectados?	42
Formas de transmisión y contagio	42
Diagnóstico, quimioterapia, vacunas	43
Metabolismo	44
Utilización de la glucosa por los Trypanosomátidos	44
Productos finales del catabolismo de la glucosa	45
Metabolismo energético en <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
Utilización de nutrientes: carbohidratos, proteínas y aminoácidos	46
La fermentación aeróbica de la glucosa	47

Vías catabólicas	48
Sistemas de reoxidación del NADH glicolítico	49
Organelas y compartimientos subcelulares	52
El glicosoma	52
Catabolismo de proteínas y aminoácidos en Trypanosomátidos	54
Utilización de proteínas y aminoácidos	54
Actividades proteolíticas	55
Catabolismo de aminoácidos. Enzimas involucradas	56
Interrelaciones entre el catabolismo de carbohidratos y aminoácidos	57
Enzimas que unen nucleótidos	58
Dominios de unión al sustrato y al dinucleótido	59
El dominio de unión a la coenzima	59
Conservación del motivo $\beta 1-\alpha A-\beta 2$	60
Transferencia estereoespecífica	61
Evolución de los dominios de unión a coenzimas	62
El sitio de unión a la coenzima en las glutamato dehidrogenasas. Diferencias entre las enzimas NAD y NADP dependientes	62
La glutamato dehidrogenasa (GluDH)	63
Generalidades de las glutamato dehidrogenasas	63
Reacción que cataliza	63
Especificidad para coenzima	64
Familias de glutamato dehidrogenasas	67
Localización intracelular	68
Relación entre la conformación, el estado de asociación de las subunidades y la función catalítica	68
Efecto de pH y sales	69
Estabilidad frente a la temperatura	69
Efecto de reactivos de tioles	70
Propiedades regulatorias	70
Regulación de la síntesis	70
Regulación de la actividad	71
Funciones de las GluDHs	72
Otras funciones de las GluDHs	74
Características generales de los genes que codifican para las GluDHs	76
Las GluDHs en los protozoos parásitos	79
Las glutamato dehidrogenasas (GluDHs) de <i>Trypanosoma cruzi</i>	80
La glutamato dehidrogenasa-NAD dependiente (GluDH-NAD)	80

La glutamato dehidrogenasa-NADP dependiente (GluDH-NADP)	81
--	----

Objetivos..... 85

Materiales y Métodos..... 87

Preparación de los medios de cultivo.	88
Medios de cultivo para parásitos.	88
Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias y bacteriófagos.....	88
Reactivos y compuestos radiactivos.	89
Crecimiento y obtención del material de trabajo.....	90
Trypanosomátidos no patógenos.....	90
Trypanosomátidos patógenos.	90
Recuento de los parásitos.	91
Cepas bacterianas.	92
Purificación de la glutamato dehidrogenasa NADP dependiente (GluDH-NADP) de <i>Trypanosoma cruzi</i>	92
Obtención del extracto crudo.....	92
Fraccionamiento salino.	92
Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.	93
Cromatografía de afinidad en Blue Sepharose CL-6B (Cibacron blue F3G-A).	93
Determinación de la actividad enzimática de la GluDH-NADP.	94
Determinación de los valores de Km.	94
Determinación de la concentración de proteínas.....	94
Separación electroforética de proteínas.	95
Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.	95
Electroforesis en geles de poliacrilamida sin SDS.....	95
Tinción de proteínas en el gel.....	95
Tinción con Coomassie Brilliant Blue.	95
Tinción con nitrato de plata.	95
Western blot e inmunodetección.	96
Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.	96
Revelado de filtros conteniendo extractos y proteínas purificadas, con sueros y fosfatasa alcalina.	96
Sueros.	97
Secuenciación de la proteína.	97
Reducción y piridiletilación de la GluDH-NADP.	97
Clivaje en residuos metionina con BrCN.	97
Digestión triptica.	98
Digestión con las endopeptidasas Lys-C y Arg-C.	98

Secuenciación.	99
Clonado del gen de la GluDH-NADP de <i>Trypanosoma cruzi</i>	99
Preparación de bacterias <i>E. coli</i> Y1090 para la infección con fagos.	99
Titulación de una biblioteca genómica.	99
Rastreo inmunológico de una biblioteca genómica de <i>Trypanosoma cruzi</i> en λ gt11.	100
Expresión de proteínas recombinantes en el fago λ gt11.	100
Revelado del rastreo inmunológico.	101
Rastreo por hibridización de una biblioteca genómica de <i>Trypanosoma cruzi</i> en λ gt11.	101
Identificación, aislamiento y mantenimiento de los fagos positivos.	102
Aislamiento y purificación del ADN del fago λ	102
Preparación y análisis de ADN.	103
Aislamiento y purificación de ADN de parásitos.	103
Cuantificación de ADN.	104
Electroforesis en geles de agarosa.	104
Electroforesis en campo pulsado (PFGE).	105
Obtención de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa ultrapura de bajo punto de fusión.	105
Resolución y recuperación de pequeños fragmentos de ADN en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.	105
Electroforesis de ADN y transferencia pasiva a filtros de nitrocelulosa.	106
Ensayo de Southern blot.	106
Purificación de oligonucleótidos sintéticos.	107
Secuenciación de ADN.	107
Tratamiento enzimático de ADN.	108
Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.	108
Marcación radioactiva de sondas específicas de ADN por “Random Priming”.	108
Ligación de moléculas de ADN.	109
Transformación de células competentes.	109
Preparación y análisis de ARN.	110
Extracción de ARN de parásitos.	110
Cuantificación de ARN.	110
Electroforesis de ARN y transferencia a nitrocelulosa.	111
Ensayo de Northern blot.	111
Reacción de PCR.	112
PCR sobre colonias.	112
Reacción en cadena de la polimerasa semianidada acoplada a transcripción reversa (RT-PCR).	112
Expresión de proteínas recombinantes.	113
Inducción de bacterias <i>Escherichia coli</i> HB101 conteniendo el vector de expresión pGEX.	113

Miniinducción de bacterias <i>E. coli</i> BL26 (DE3) y BL26 (DE3)PLys S conteniendo el vector pET-22b(+).	114
Tratamientos para la obtención de la fracción sobrenadante que contiene la proteína recombinante.	114
Purificación de la glutamato dehidrogenasa NADP-dependiente recombinante por cromatografía de afinidad en Blue Sepharose CL-6B.	115

Resultados 116

Purificación de la GluDH-NADP de <i>T. cruzi</i>	117
Obtención de secuencias peptídicas de la GluDH-NADP.	120
Clonado del gen que codifica para la GluDH-NADP.	124
Rastreo inmunológico de una biblioteca de expresión genómica de <i>T. cruzi</i> en el fago λ gt11.	124
Obtención de clones conteniendo parte del gen de la GluDH-NADP de <i>T. cruzi</i>	124
Obtención del fragmento C-terminal de la enzima.	127
Estrategia para la construcción de una sonda.	127
Rastreo de una biblioteca de expresión genómica de <i>T. cruzi</i> en el fago λ gt11 usando una sonda marcada radioactivamente.	130
Estudios estructurales del gen.	147
Southern blot sobre ADN genómico.	147
Detección de polimorfismos con enzimas de restricción.	151
Polimorfismos detectados por secuenciación en el extremo N-terminal.	152
¿Los genes de la GluDH-NADP se organizan en tandem?	153
Electroforesis en campo pulsado (PFGE).	154
Expresión de la GluDH-NADP en los distintos estadios y cepas de <i>T. cruzi</i> y en otros parásitos.	156
Ensayos de Northern blot.	156
Medición de la actividad GluDH.	157
Detección de la GluDH-NADP en ensayos de Western blot.	158
Expresión de la GluDH-NADP recombinante en <i>E. coli</i> usando el vector de expresión pET-22b(+).	159
Estrategia para la obtención del clon recombinante.	159
Miniinducción para la expresión de la proteína recombinante.	163
Purificación de la proteína recombinante.	166

Estudios cinéticos comparados de la enzima natural y la recombinante.	167
Identificación de la forma citosólica de la GluDH-NADP de <i>T. cruzi</i> . ..	168
Discusión	172
Purificación.	173
Clonado, secuenciación y organización genómica.	173
Secuenciación de la proteína.	173
Clonado y secuenciación del gen.	174
Organización genómica.	177
Uso preferencial de codones.	179
Búsqueda de posibles isoformas de la GluDH-NADP.	181
Expresión de la proteína recombinante.	182
Expresión de la GluDH-NADP de <i>T. cruzi</i> en los diferentes estadios del ciclo de vida.	182
Conclusiones	186
Bibliografía	190

Índice de Tablas y Figuras

Introducción

Figura 1: Relación filogenética y origen del parasitismo en los trypanosomátidos.	29
Figura 2: Representación esquemática del proceso de <i>trans</i> -splicing y transcripción policistónica en trypanosomas.	33
Figura 3:	
(a): Formas del ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
(b): Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
Tabla 1: Productos finales del catabolismo de la glucosa en trypanosomátidos.	46
Figura 4: Catabolismo de la glucosa en <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
Figura 5: Participación de las glutamato dehidrogenasas en la reoxidación del NADH glucolítico en <i>T. cruzi</i>	51
Figura 6: Compartimentalización de las enzimas involucradas en el catabolismo de la glucosa en <i>T. cruzi</i>	53
Figura 7: Representación de los dominios de unión a la coenzima.	61
Tabla 2: Especificidad para coenzima.	66
Tabla 3: PM y número de subunidades de las GluDHs.	66
Figura 8: Comparación entre GluDHs-NAD, NADP e inespecíficas para coenzima.	78
Tabla 4: Km para cada sustrato de las enzimas GluDH-NAD y NADP dependientes de <i>T. cruzi</i>	83

Resultados y Discusión

Tabla 1: Purificación de la glutamato dehidrogenasa NADP-dependiente (GluDH-NADP) de <i>T. cruzi</i>	117
Figura 1: Purificación de la GluDH-NADP dependiente de <i>T. cruzi</i> por cromatografía de afinidad en Blue Sepharose.	119
Figura 2: Electroforesis en geles de poliacrilamida de los fragmentos proteicos obtenidos por digestión con BrCN.	120
Figura 3a: Perfil de elución de los péptidos obtenidos luego del tratamiento con la endopeptidasa Lys-C, en HPLC en fase reversa.	121
Figura 3b: Perfil de elución de los péptidos obtenidos luego del tratamiento con la endopeptidasa Arg-C, en HPLC en fase reversa.	122
Figura 4: Secuencia de aminoácidos de la GluDH-NADP dependiente de <i>T. cruzi</i> comparada con la enzima similar de <i>E. coli</i>	123
Figura 5: Inducción de la proteína recombinante GST-GluDH-NADP.	125
(a) SDS-PAGE 10% de la proteína de fusión Glutathion-S-transferasa-GluDH.	125
(b) Western blot revelado con un antisuero anti-GluDH-NADP.	125
Figura 6: Esquema del plásmido pUC19-GluDH-NADP.	126
Figura 7: Comparación de la secuencia del extremo C-terminal de la GluDH-NADP de <i>T. cruzi</i> y <i>E. coli</i>	127
Figura 8: Esquema de la estrategia empleada para la construcción de la sonda.	129

Figura 9: Reacción de PCR sobre los fagos positivos usando los iniciadores rev y fwd (del fago λ) combinados con el oligo TGA.	131
(A) Esquema de la reacción de PCR sobre el fago λ 11(1).	131
(B) Gel de agarosa 1% de cada reacción de PCR sobre los fagos positivos.	131
Figura 10: Southern blot del tratamiento de los fagos positivos con EcoRI.	132
Figura 11: Southern blot del tratamiento de los fagos positivos con SacI, KpnI.	133
Figura 12: Ubicación de los iniciadores Nter-1, Nter-3 y TGA.	135
Figura 13: Reacciones de PCR combinando los oligonucleótidos Nter-1 o Nter-3 con TGA.	136
Figura 14: Secuencia de los genes <i>TcGluDH1</i> y <i>TcGluDH2</i>	
(a) Secuencia nucleotídica acompañada de la secuencia de aminoácidos deducida de ellos.	138
(b) Comparación de las secuencias proteicas.	141
Figura 15: Comparación de la GluDH-NADP de <i>T. cruzi</i> con las GluDHs del banco de datos.	
(a) Alineamiento multiple	142
(b) Arbol filogenético de todas las GluDH-NADP dependientes conocidas del banco de datos.	145
Figura 16 (a): Preferencia en el uso de codones de la GluDH-NADP de <i>E. coli</i>	146
Figura 16 (b): Preferencia en el uso de codones de la GluDH-NADP de <i>T. cruzi</i>	147
Figura 17: Ensayo de Southern blot sobre ADN genómico de distintos parásitos, cepas y clones.	149
Figura 18: Polimorfismo en el sitio EcoRI.	151
Figura 19: Microheterogeneidades en la secuencia nucleotídica del extremo 5' de la región de código del gen.	153
Figura 20: Digestiones parciales con la enzima BglII para verificar si los genes de la GluDH-NADP dependiente se disponen en tandem.	154
Figura 21: PFGE de distintos parásitos, cepas y clones.	155
Figura 22: Ensayo de Northern blot.	156
Tabla 2: Actividad específica de las enzimas GluDH-NADP y GluDH-NAD dependientes de <i>T. cruzi</i> en diferentes cepas y estadios del ciclo de vida.	157
Figura 23: Detección de GluDH-NADP en distintos estadios del ciclo de vida por ensayos de Western blot.	159
Figura 24: Estrategia de clonado en el vector de expresión pET-22b(+).	161
Tabla 3: Comparación entre las células BL26(DE3)PLysS y BL26(DE3).	162
Figura 25: SDS-PAGE 10% de las distintas fracciones provenientes de una miniinducción.	163
Figura 26: Western blot del gel SDS-PAGE indicado en la Figura 25a.	165
Figura 27: Medida de la actividad específica de la proteína recombinante.	166
Figura 28: Expresión y purificación de la proteína recombinante.	167
Tabla 4: Km de la enzima natural y de la forma recombinante.	167
Figura 29: Ubicación de los iniciadores utilizados en la reacción de RT-PCR semianidada y estrategia empleada	169
Figura 30: Secuencia de la zona 5'UTR, miniexón y comienzo de la zona codificante correspondiente al gen de la GluDH-NADP.	171
Figura 31: Comparación de la secuencia de aminoácidos de una parte del dominio β_1 . α A. β_2 de unión al dinucleótido en algunas enzimas NADP y NAD dependientes	175
Figura 32: Comparación de la secuencia de aminoácidos de la región completa β_1 . α A. β_2 de varias GluDH-NADP dependientes.	176

Introducción

Introducción

Los protozoos son organismos unicelulares que se encuentran entre los procariontes y los eucariontes superiores, presentando características de ambos grupos. Son semejantes a las bacterias con respecto a su pequeño tamaño (entre 1-150 μm), sus tiempos cortos de generación, su alta tasa de multiplicación y su tendencia para inducir un estado inmunológico que les permite la reinfección de los hospedadores sobrevivientes. Por otro lado, son células eucariontes con organelas y caminos metabólicos semejantes al hospedador. Estos organismos han desarrollado numerosas estrategias para sobrevivir, tales como la evasión de la respuesta inmune. Esto hace que las infecciones con protozoos parásitos perduren más tiempo, a diferencia de las infecciones bacterianas.

Los protozoos no conforman un grupo natural. Inicialmente fueron considerados como un phylum dentro del reino Animalia. Sin embargo, en la actualidad no existe el concepto de Protozoa como un taxón, sino que se aplica a individuos de un subreino dentro del reino Protista (Levine *et al.*, 1980). Existen aproximadamente 45.000 especies de protozoos, de las cuales cerca de 10.000 son parásitos de invertebrados y de casi todas las especies de vertebrados.

Tanto el hombre como los animales domésticos son hospedadores de estos organismos. En el hombre causan serias enfermedades como la malaria, el mal de Chagas, la enfermedad del sueño y la leishmaniasis, consideradas entre otras como las enfermedades más importantes de los países tropicales afectando a una gran proporción de seres humanos en el mundo (Cox, 1993).

En los animales domésticos producen, entre otras, teileriosis y nagana, provocando numerosas pérdidas en el ganado en Africa y, coccidiosis, en el ganado y en las aves de corral en distintas partes del mundo. Los peces e invertebrados son afectados por una amplia variedad de protozoos, creando serios problemas en los criaderos de animales destinados a la alimentación.

Clasificación

La clasificación de los protozoos parásitos se basa en un amplio rango de características como: detalles de su estructura, variaciones en el ciclo de vida y diferencias moleculares y bioquímicas. Tradicionalmente y por conveniencia, los protozoos han sido separados en 4 grupos teniendo en cuenta su forma de locomoción: flagelados (flagelos) como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Giardia* y *Trichomonas*; ameboideos (por pseudopodos) como *Entamoeba*; esporozoos (sin forma evidente de locomoción) como *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Babesia* y *Theileria* y ciliados (ciliias) como *Balantidium* (Sleigh, 1989; Cox, 1993).

Taxonomía de *Trypanosoma cruzi*

El *T. cruzi* es un protozoo parásito cuya ubicación taxonómica ha sido determinada y revisada por el comité sobre sistemática y evolución de la Society of Protozoologists, como se detalla a continuación (Levine *et al.*, 1980):

Phylum Sarcomastigophora

La locomoción se realiza por medio de flagelos y/o pseudópodos. Presentan un único tipo de núcleo y la sexualidad es por singamia.

Subphylum Mastigophora

Presentan uno o más flagelos. La reproducción asexual es por fisión binaria y en algunos grupos existe reproducción sexual.

Clase Zoomastigophorea

Sin cloroplastos. La locomoción es por medio de uno o varios flagelos, en algunos grupos presentan formas ameboideas con o sin flagelo. La reproducción sexual se conoce en unos pocos grupos.

Orden Kinetoplastida

Uno o dos flagelos emergiendo de una depresión. Presentan una mitocondria única (en algunas formas no funcional) que se extiende a lo largo de la célula como un tubo, conteniendo una red de ADN que forma una prolongación de la mitocondria, llamada kinetoplasto. El aparato de Golgi se ubica en la zona de la depresión flagelar. La mayoría de las especies son parásitas y el resto son de vida libre.

Suborden Trypanosomatida

Único flagelo libre o unido al cuerpo celular por una membrana ondulante, el kinetoplasto es pequeño y compacto. Todas las especies son parásitas.

Familia Trypanosomatidae

Géneros Monogenéticos (un solo hospedador): *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*. Parásitos de invertebrados.

Géneros Digenéticos (dos hospedadores: invertebrado y vertebrado): *Leishmania* y *Trypanosoma*. Parásitos de vertebrados.

Género Trypanosoma

Se pueden agrupar de acuerdo al lugar de producción de los tripomastigotes metacíclicos dentro del insecto vector y la forma de infección del huésped vertebrado (Hoare, 1964).

Sección Salivaria. Completan su desarrollo en las glándulas salivales del insecto y se transmiten por su picadura: *T. brucei* y *T. congolense*.

Sección Estercoraria. Completan su desarrollo en la última porción del tubo digestivo del insecto vector. Se transmiten con sus deyecciones: *T. cruzi*, *T. lewisi*.

Los Trypanosomátidos

Son protozoos parásitos flagelados del Orden Kinetoplastida, la mayoría de los cuales provoca serias enfermedades en los seres humanos y en los animales domésticos.

En América del Sur y Centroamérica cerca de 20 millones de personas se encontrarían infectadas con *Trypanosoma cruzi*, parásito que provoca la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. En nuestro país se estima en 2 millones el número de personas infectadas en un área que abarca dos tercios de su superficie, constituyendo un serio problema de salud pública (Carlomagno *et al.*, 1989).

En Africa existen dos subespecies de parásitos que infectan seres humanos, *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*. Ambas causan la “enfermedad del sueño”, que lleva al coma y finalmente a la muerte, en el este, centro y oeste de Africa.

Los protozoos parásitos también afectan a los animales domésticos, donde en una vasta región de Africa, la tripanosomiasis es considerada endémica. *T. congolense* y *T. vivax* son extremadamente patógenos para el ganado, *T. brucei brucei* provoca serias enfermedades en caballos y camellos como así también en el ganado. Otros trypanosomas de animales domésticos son: *T. uniforme* (menos patógeno), *T. simiae* y *T. suis* (en

cerdos), *T. evansi* (en vampiros de América del Sur y Centroamérica), *T. equinum* (en caballos de América del Sur) y *T. equiperdum* (en caballos, mulas y burros en África, Siria, Turquía y partes de Asia) (Cox, 1993).

Varias especies de *Leishmania* son las responsables de los casos en seres humanos. Estas especies producen una variedad de enfermedades clínicas referidas como leishmaniasis. La virulencia de la enfermedad depende del estado inmunológico del paciente y de la especie en particular del parásito. Prevalen en regiones templadas y tropicales causando en el hombre tres tipos de enfermedades: leishmaniasis visceral, cutánea, y mucocutánea.

Las subespecies *Leishmania donovani* y *Leishmania chagasi* provocan la leishmaniasis visceral o kala-azar. Esta enfermedad se manifiesta con fiebre, trastornos en la alimentación, anorexia, pérdida de peso, agrandamiento del hígado e hipergamaglobulinemia y es causa de mortalidad en vastos territorios de la India, África, Latinoamérica y el litoral mediterráneo.

La leishmaniasis cutánea es más común, sus lesiones de tipo úlcera, son usualmente crónicas y puede provocar desfiguración, pero rara vez llevan a la muerte. Entre las subespecies que ocasionan esta enfermedad se encuentran: *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. pifanoi* en América y *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* en Europa, Asia, India y África.

La forma mucocutánea o espundia es producida en zonas endémicas de Latinoamérica por *L. braziliensis* y *L. panamensis* provocando lesiones destructivas de las mucosas de la nariz, labios y faringe, y en la cara (Jeronimo and Pearson, 1992).

Existen también trypanosomátidos no patógenos que infectan animales, cuyo ejemplo más destacado es *T. rangeli*. Entre sus hospedadores se encuentran, monos, gatos y perros e incluso seres humanos. Suele encontrarse en América del Sur y Centroamérica y para los hospedadores es inofensivo.

Dos géneros también inofensivos para los mamíferos son *Leptomonas* y *Crithidia* ya que solo infectan insectos.

También existen trypanosomátidos parásitos de plantas, como el género *Phytomonas*, cuyo vector es un insecto que succiona jugos vegetales.

¿Como se reconstruye la historia evolutiva de estos organismos?

Debido a la ausencia de registros fósiles, la construcción del árbol filogenético de los protozoos con kinetoplasto se realiza en base a la comparación de las secuencias del ARNr 9S y 12S, por ser zonas muy conservadas y por lo tanto adecuadas para este tipo de análisis.

Los parásitos con kinetoplasto presentan diferentes estilos de vida: vida libre, parasitismo monogenético involucrando a un solo hospedador, generalmente invertebrado, y parásitos digenéticos que alternan entre un hospedador que puede ser vertebrado, invertebrado o una planta.

Los géneros monogenéticos como *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia* y *Leptomonas*, se conocen como “trypanosomas inferiores”, y de la construcción del árbol filogenético resulta que *Crithidia fasciculata* es la especie más antigua, seguida por *Leptomonas sp.* Todos ellos son parásitos de artrópodos, principalmente en Insecta (Díptera, Hemíptera y también en Lepidóptera, Orthóptera, etc). En cambio, las especies digenéticas *Leishmania tarentolae*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* podrían provenir de un antecesor monogenético como *Leptomonas*, asumiendo que su aparición es anterior a la separación de África y América del Sur. En las especies digenéticas, la morfología del estadio del parásito que se encuentra en el insecto, es muy semejante al de las especies monogenéticas. El nodo más antiguo podría ubicarse hace 264 millones de años, muy cerca del origen de los fósiles del insecto hospedador (Hemíptero). Esto implicaría que el ancestro kinetoplástico y el insecto hospedador, podrían haber aparecido aproximadamente al mismo tiempo, sugiriendo la coevolución de los parásitos y su hospedador (Lake *et al.*, 1988).

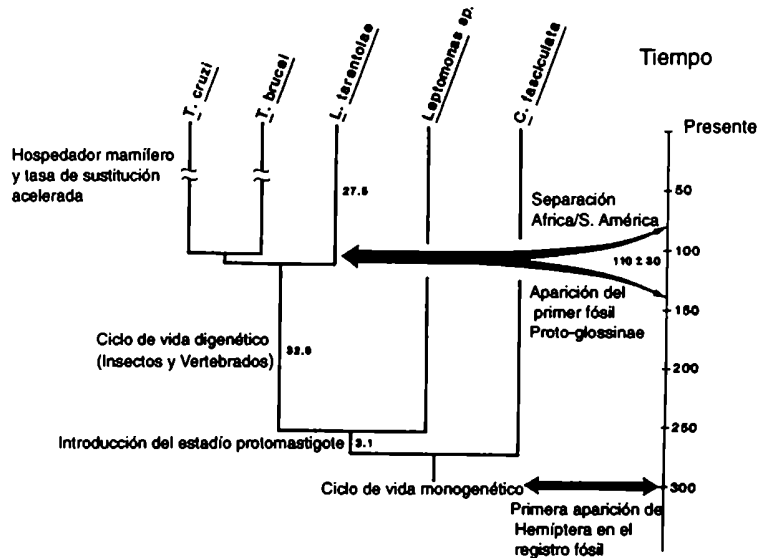
Por lo tanto, estudiando el ARN ribosomal de la mitocondria (contenido en el kinetoplasto) se sugiere que los géneros *Crithidia*, *Leptomonas*, *Leishmania* y *Trypanosoma* divergen sucesivamente, originándose el estilo digenético antes de la separación de *Leishmania*.

En cambio, el análisis del ARN ribosomal nuclear que corresponde a la subunidad menor del ribosoma, sugiere un árbol evolutivo distinto. Los géneros *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Leptomonas* y *Crithidia* formarían un grupo muy relacionado, mientras que *Phytomonas*, *Blastocrithidia*, *T. cruzi* y *T. brucei* se encontrarían a mayor distancia. En este nuevo árbol, *T. brucei* y *T. cruzi*, divergen antes del linaje de *Crithidia* y *Leishmania* (los cuales están estrechamente relacionados). Se propone que el origen del parasitismo a insectos y

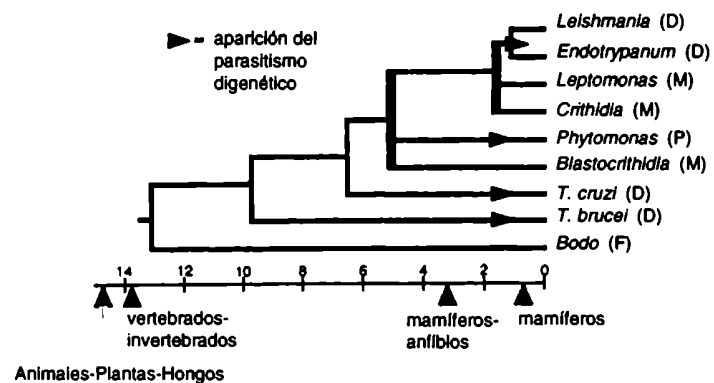
vertebrados se adquiere luego de la divergencia de *Bodo caudatus* (familia Bodonidae) (Fernández *et al.*, 1993). En la figura 1 se representan esquemáticamente los árboles filogenéticos propuestos por ambos grupos.

Figura 1: Relación filogenética y origen del parasitismo en los trypanosomátidos.

(a) Representación de las raíces del árbol filogenético que relaciona a los protozoos con kinetoplasto, construido por comparación entre las secuencias de los genes mitocondriales del ARNr 9S y 12S. Los pasos importantes en la evolución de estos organismos son: (i) la adquisición de un hospedador insecto (ciclo de vida monogenético), (ii) introducción del estadio protomastigote en el ciclo de vida, (iii) desarrollo de un ciclo de vida digenético, (iv) en *Trypanosoma* la adquisición de un hospedador mamífero y de una tasa acelerada de sustituciones evolutivas. Todas las distancias fueron estandarizadas con respecto a la de *L. tarentolae* (Lake *et al.*, 1988).



(b) Origen del parasitismo. El árbol filogenético representa una síntesis de las comparaciones realizadas entre las secuencias de los genes nucleares del ARNr de la subunidad mayor y menor del ribosoma. La escala horizontal fue construida teniendo en cuenta comparaciones entre los ARNr, en cambio las distancias verticales no tienen significado evolutivo. Las flechas horizontales representan el origen del parasitismo digenético. D: parásitos de vertebrados, digenéticos; P: parásitos de plantas, digenéticos; M: parásitos monogenéticos; F: organismos de vida libre (Fernández *et al.*, 1993).



Debido a su gran antigüedad en comparación con el resto de los eucariontes y a su particular comportamiento, los protozoos parásitos han despertado gran interés. A través de ellos se ha podido acceder al conocimiento de una cantidad de funciones y estructuras novedosas que incluyen organelas desconocidas como los glicosomas y el kinetoplasto en tripanosomátidos, hidrogenosomas en tricomonas y micronemas en apicomplexa. También se han estudiado importantes mecanismos moleculares como el *trans*-splicing, el editado del ARN, los rearrreglos programados en el ADN, la replicación de los minicírculos y maxicírculos y la variación antigénica de las proteínas de superficie. También, se han buscado durante mucho tiempo secuencias promotoras, importantes en la regulación de la expresión génica, con resultados limitados hasta el momento.

El kinetoplasto

El kinetoplasto es una zona de la matriz de la única mitocondria de los Trypanosomátidos que contiene el ADN kinetoplástico ó ADN mitocondrial. Este ADN contiene 2 tipos de estructuras: los minicírculos son círculos covalentemente cerrados, presentes en aproximadamente 10.000 copias y cuyo tamaño oscila entre 0,5 a 2,8 kilobases según la especie. En cambio, los maxicírculos se encuentran en menor número, de 25 a 50 y con un tamaño de 20 a 37 kilobases. Los círculos de ADN se encuentran concatenados formando una malla que puede visualizarse al microscopio electrónico y cuya estructura es única en la naturaleza.

Los maxicírculos contienen genes que codifican ARNs ribosomales y proteínas mitocondriales como el citocromo b y subunidades de la NADH dehidrogenasa y la citocromo oxidasa. Además llevan información para el proceso de editado del ARN y parecen ser idénticos entre sí (Ryan *et al.*, 1988).

Los minicírculos fueron durante mucho tiempo un enigma. Presentan a menudo secuencias muy heterogéneas y llevan información genética para pequeños ARNs guías (ARNg) que funcionan como templados específicos en el editado de ARNs mensajeros de genes mitocondriales crípticos. La heterogeneidad de los minicírculos es más destacada en *T. brucei* que en *Leishmania*, *Crithidia* y *T. equiperdum* y probablemente podría estar asociada con el editado (Borst, 1991).

La replicación de esta trama es complicada. Los minicírculos replican una sola vez por ciclo, a diferencia del ADN mitocondrial en animales, y para hacerlo se separan de la trama. En cambio los maxicírculos se replican unidos a la trama en forma de círculos rodantes (Ryan *et al.*, 1988).

Una cromatina descondensada

En los últimos años se han aportado muchos datos en relación con la forma particular en que se organiza la cromatina en los protozoos que permitirían explicar su fragilidad e imposibilidad de condensación para formar cromosomas durante la división celular.

Sin embargo, en *T. cruzi*, la cromatina se organiza en nucleosomas y es posible encontrar heterocromatina en células en interfase lo que indica que en trypanosomas existe una organización básica y que hay un cierto grado de condensación en aquellos parásitos que no se encuentran en división.

La histona H₁ carece del dominio globular esencial para la estabilización del ADN cercano al nucleosoma. Por otro lado, el alto número de sustituciones en los aminoácidos de las histonas H₂A, H₃ y H₄ y el acortamiento de la secuencia de la histona H₂B contribuyen al mantenimiento del estado descondensado de la cromatina (Galanti and Toro, 1994). Como consecuencia de lo expuesto, la mitosis en trypanosomátidos, está caracterizada por: la ausencia de cromosomas condensados, el mantenimiento de la membrana nuclear durante toda la división celular y la presencia de placas densas asociadas con un huso mitótico intranuclear.

Un fenómeno genético primitivo. Editado de una molécula de ARN o “editing”.

El editado del ARNm es uno de los mecanismos más novedosos presentes en trypanosomátidos. Es un proceso post-transcripcional que ocurre en la mitocondria e involucra a los maxicírculos y minicírculos, aunque se desconoce si ocurre antes o después de la poliadenilación (Stuart, 1991; Arts and Benne, 1996).

Consiste en la adición y delección de uridinas a una molécula de ARN mensajero. Este mecanismo puede crear un nuevo codón de iniciación para la traducción de una proteína mitocondrial, puede llevar a la corrección a nivel de ARN del desplazamiento en el marco de lectura e incluso la formación de un marco de lectura completo, obteniendo así un ARN completamente editado con un marco de lectura abierto y continuo.

La información necesaria para el editado se encuentra en los ARNg (guías), pequeños transcritos de aproximadamente 60 nucleótidos, complementarios a las secuencias del ARNm a editar. El proceso parece estar asociado con un complejo de alto peso molecular llamado editosoma que contiene ARNg, ARNm parcialmente editado y proteínas (Hajduk *et al.*, 1993).

Los ARNg están codificados en los maxicírculos y minicírculos del kinetoplasto y contienen un promedio de 15 nucleótidos de uridina. El número de ARNg diferentes, transcritos a partir de los minicírculos varía entre especies (Thieman *et al.*, 1994).

T. brucei presenta minicírculos en mayor número y heterogeneidad con respecto a *Leishmania* y *Crithidia*, lo cual sumado a las evidencias de un mayor editado sugieren la necesidad de minicírculos heterogéneos para un editado correcto y eficiente de los ARNm codificados por los maxicírculos de *T. brucei*. En cambio, *T. vivax* y *T. equiperdum* carecen de maxicírculos funcionales, presentando minicírculos muy homogéneos (Borst, 1991).

Debido a que los genes para los ARNg se encuentran localizados en los minicírculos, Simpson y Thieman (1995) concluyen que el editado es un rasgo genético que puede perderse fácilmente en ausencia de una presión de selección para mantener el producto editado. Se desconocen aún las ventajas adaptativas que otorga la aparición y el mantenimiento del editado, pudiendo obtenerse una proteína directamente a partir de su transcritos, sin necesidad de este proceso (Covello and Gray, 1993). Su origen en trypanosomátidos data de 100-200 millones de años, hecho correlacionado con la aparición del insecto vector en el registro fósil y con la divergencia de las especies del nuevo y viejo mundo (Landweber and Gilbert, 1994).

Transcripción discontinua de los ARNm

En estos organismos, la transcripción de una unidad transcripcional policistrónica ocurre ininterrumpidamente para generar ARNm policistrónicos. Luego, sufren dos importantes modificaciones: la poliadenilación en el extremo 3' no codificante y la unión por *trans-splicing* de una secuencia en una zona AG del extremo 5' no codificante del ARNm. Dicha secuencia está codificada por un exón separado, al que se llamó “miniexón”. Existen alrededor de 200 copias del “miniexón” codificadas en grupos en el genoma, cada una formando parte de una secuencia de 1.35 kpb repetidas en tandem (Laird, 1989).

Se dice que la transcripción de los ARNm es discontinua debido a que la secuencia del miniexón se transcribe en forma separada del resto de los ARNm.

Este mecanismo fue estudiado inicialmente en *T. brucei* en los genes correspondientes a la proteína variable de superficie (VSG) (Borst, 1986).

El “*trans*-splicing”

Los trypanosomátidos son organismos que carecen de intrones. Normalmente, en una unidad transcripcional pueden encontrarse varias zonas de código correspondientes a varias proteínas. El transcripto primario obtenido, es tratado por la maquinaria de *trans*-splicing y poliadenilación para generar un ARNm individual, maduro.

Todos los ARNm se generan por el ligado de dos transcriptos en un proceso post-transcripcional llamado *trans*-splicing. Como consecuencia, todos llevan una secuencia común de 39 nucleótidos en el extremo 5' llamada “miniexón”. Esta secuencia no es codificante y proviene de un transcripto de 140 nucleótidos llamado med ARN (donor de miniexón) (Laird, 1989), que lleva un extremo cap normal de 7-metil guanosina además de modificaciones en los primeros 4 nucleótidos y en la posición 6. El med ARN tiene una alta tasa de recambio y una vida media *in vivo* de solo 4 minutos.

Este sistema está claramente relacionado con el *cis*-splicing, aunque aún no se conoce si es una variación exótica o un resabio arcaico de este mecanismo (Laird, 1989). En la figura 2 se describe el proceso mencionado.

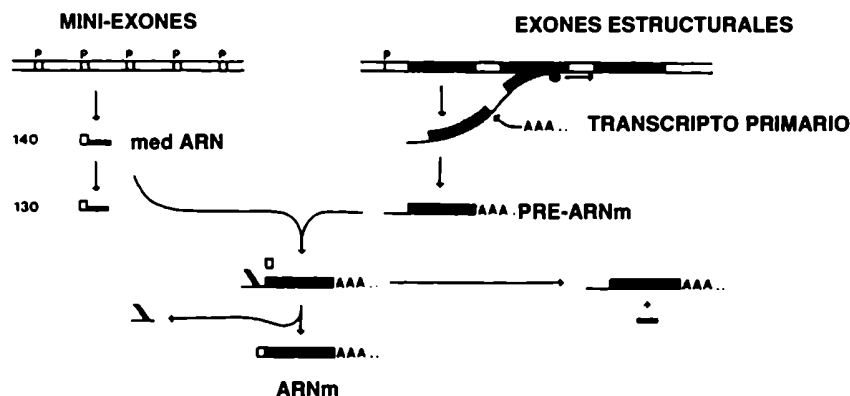


Figura 2: Representación esquemática del proceso de *trans*-splicing y transcripción policistónica en trypanosomas.

Las letras “P” indican la posición de los promotores. El transcripto primario es de tipo policistónico. El *trans*-splicing entre el ARN donador del miniexón (med ARN) y el mensajero poliadenilado (PRE-ARNm) resulta en la producción de ARNs maduros que tienen el miniexón de 39 pb en su extremo 5' (caja blanca), el exón codificante (caja negra) y una secuencia poli A en su extremo 3' (Laird, 1989).

Para el procesamiento de un ARN policistrónico, se producen dos cortes, uno de ellos realizado por la maquinaria de *trans*-splicing a una distancia río arriba del codón de iniciación, y el otro relacionado con la poliadenilación del gen anterior, localizado a aproximadamente mil nucleótidos en dirección 5' del sitio de adición del miniexón.

En *Leishmania* y *T. brucei* fueron identificadas secuencias ricas en pirimidinas y una zona AG, que podrían ser reconocidas para el proceso de *trans*-splicing (Matthews *et al.*, 1994). En cambio no se han encontrado secuencias conservadas para la poliadenilación, lo que llevó a suponer que ambos procesos podrían estar acoplados (LeBowitz *et al.*, 1993; Vassella *et al.*, 1994).

Los promotores en los Trypanosomátidos

Como consecuencia del *trans*-splicing, desaparecen las secuencias correspondientes al inicio de la transcripción de un gen resultando difícil la identificación y localización de las regiones reguladoras y promotoras.

Solo han sido identificados los promotores de los genes que codifican a las proteínas VSG (glicoproteínas variables de superficie) y PARP (proteínas repetitivas ácidas procíclicas) de *T. brucei* (Overath *et al.*, 1994).

En *T. cruzi* fue identificado el sitio de iniciación de la transcripción del gen del ARN ribosomal 18S. Al comparar dichas secuencias con las descritas en *T. brucei* y *C. fasciculata* no se obtuvo ningún consenso. Sin embargo, se encontraron algunas secuencias repetidas río arriba de las promotoras, que indicaron homología con aquellas y con las presentes en los promotores de los mencionados trypanosomátidos (Dietrich *et al.*, 1993).

La transcripción en los trypanosomátidos es realizada por tres ARN polimerasas como en el resto de los eucariontes. La ARN polimerasa II es la encargada de la transcripción de los genes que codifican proteínas y en *T. brucei* esta tarea es compartida, para algunos genes, con la ARN polimerasa I (Chung *et al.*, 1992).

El bolsillo flagelar

Es una estructura conservada entre los trypanosomátidos y constituye una región de su superficie altamente diferenciada que facilita la internalización de moléculas del hospedador. La membrana que rodea al cuerpo celular envuelve al flagelo en forma continua dejando una invaginación entre ellos que se llama bolsillo flagelar (Webster and Russell, 1993). En la abertura del bolsillo flagelar, donde emerge el flagelo, este se engrosa y su función

consiste en limitar el acceso del material a la cavidad del bolsillo y también como punto de anclaje al cuerpo celular. La profundidad del bolsillo es variable, en *Crithidia* es muy profundo y puede llegar casi hasta el núcleo, en cambio en *Trypanosoma* es relativamente superficial. A diferencia del cuerpo celular donde existe una gran trama de microtúbulos, por debajo del bolsillo flagelar desaparece dicha red. Tal vez sea consecuencia directa de su actividad endocítica a través de vesículas que brotan de la membrana del bolsillo y se comparan con los endosomas de mamíferos.

Ciclo de vida e interacción hospedador-parásito

Interacción hospedador-parásito

Los protozoos parásitos han desarrollado una gran habilidad para poder sobrevivir durante largos períodos de tiempo dentro de su hospedador. Entre las estrategias empleadas para lograrlo, se encuentran la variación antigénica, la resistencia al complemento y al ataque inmunológico y/o el escape hacia compartimientos tales como el citoplasma del hospedador. Lo interesante es conocer cómo estos parásitos pueden manipular a su hospedador, a distintos niveles y para su propio beneficio, logrando crear un ambiente menos hostil.

El género *Trypanosoma* comprende parásitos digenéticos cuyo ciclo de vida se desarrolla entre un hospedador invertebrado (insecto vector) y un hospedador vertebrado (mamífero).

Hospedador invertebrado

Orden Hemiptera:

Familia Reduviidae

Subfamilia Triatominae

La familia comprende vinchucas succionadoras de sangre o “*kissing bugs*”. Ambos sexos se alimentan de sangre durante la noche aumentando su peso de 3 a 4 veces. Esta alimentación es esencial para la producción de huevos viables (Molyneux, 1993).

Hospedador vertebrado

Trypanosoma cruzi es un patógeno que penetra y replica en una amplia variedad de células. Como consecuencia se produce una infección que en el hombre puede durar décadas. Para lograr acceder al hospedador mamífero, el parásito utiliza rutas alternativas de entrada, pero a diferencia de otros protozoos parásitos, *T. cruzi* no es inoculado directamente en la circulación sino que es depositado sobre su piel durante la ingesta-defecación del vector (Ortega-Barria and Pereira, 1992).

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

La vinchuca se infecta durante la alimentación, por ingestión de los tripomastigotes presentes en la sangre periférica de un mamífero infectado. En este estadio los parásitos no pueden dividirse y presentan un flagelo que corre a lo largo del cuerpo celular formando una membrana ondulante que les otorga gran movilidad (figura 3(a)). Los tripomastigotes sanguíneos llegan al intestino medio de la vinchuca donde sufren transformaciones morfológicas que conducen a la forma epimastigote, alrededor de 24 horas después de la ingesta. Esta forma se divide activamente por fisión binaria y es capaz de mantener indefinidamente la infección en el insecto vector. Los epimastigotes son alargados, su flagelo es libre y la posición del kinetoplasto es anterior al núcleo. No son capaces de infectar al hospedador mamífero y generalmente corresponden a la forma obtenida en cultivo líquido a 25°C en medios axénicos.

Luego de 4 días, los epimastigotes se encuentran en la ampolla rectal, donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. Son morfológicamente similares a los que se encuentran en la sangre del hospedador vertebrado, donde son infectivos.

Son alargados, delgados y más móviles que los epimastigotes, el kinetoplasto es posterior al núcleo y son incapaces de dividirse. Se eliminan con las heces y la orina durante o después de la ingesta de sangre iniciando una nueva infección. Llegan a la sangre del hospedador atravesando la piel o las mucosas a través de microescoriaciones.

Para poder multiplicarse deben invadir rápidamente células de diferentes tejidos como por ejemplo las fibras musculares esqueléticas y cardíacas, las células de la glía, el sistema retículo endotelial y el aparato digestivo.

Los tripomastigotes, tanto sanguíneos como metacíclicos, pueden sobrevivir a la fagocitosis de los macrófagos escapando de la vacuola fagocítica hacia el citoplasma, evadiendo la respuesta lisosomal de la célula hospedadora. En cambio los epimastigotes son eliminados por los macrófagos. Los tripomastigotes pueden penetrar células no fagocíticas por medio de adhesión seguida de endocitosis.

Luego de 3 horas de haber penetrado en la célula, los tripomastigotes se diferencian a amastigotes cuya forma es redondeada y su flagelo pequeño. Así permanecen inactivos durante 35 horas hasta comenzar a dividirse. Luego de aproximadamente 9 divisiones, se pueden detectar aproximadamente 500 amastigotes por célula, que se diferencian a tripomastigotes unas horas antes de la lisis celular. Al liberarse a la sangre pueden reiniciar el ciclo invadiendo una nueva célula del mismo individuo ó infectar una vinchuca durante la alimentación de ésta (figura 3(b)) (Avila, 1992).

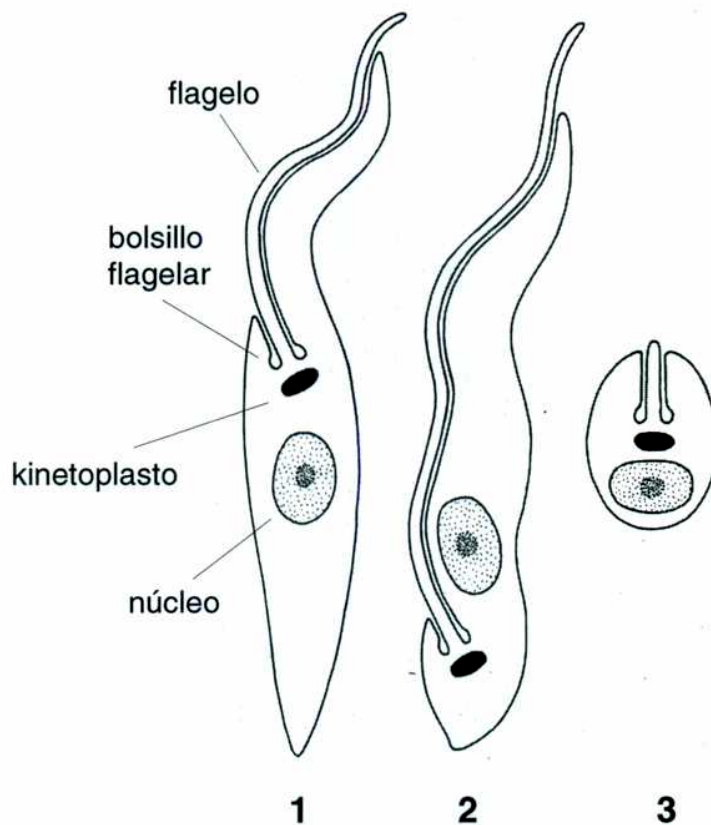


Figura 3(a): Formas del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.
1, epimastigote; 2, tripomastigote; 3, amastigote. (Cox, 1993).

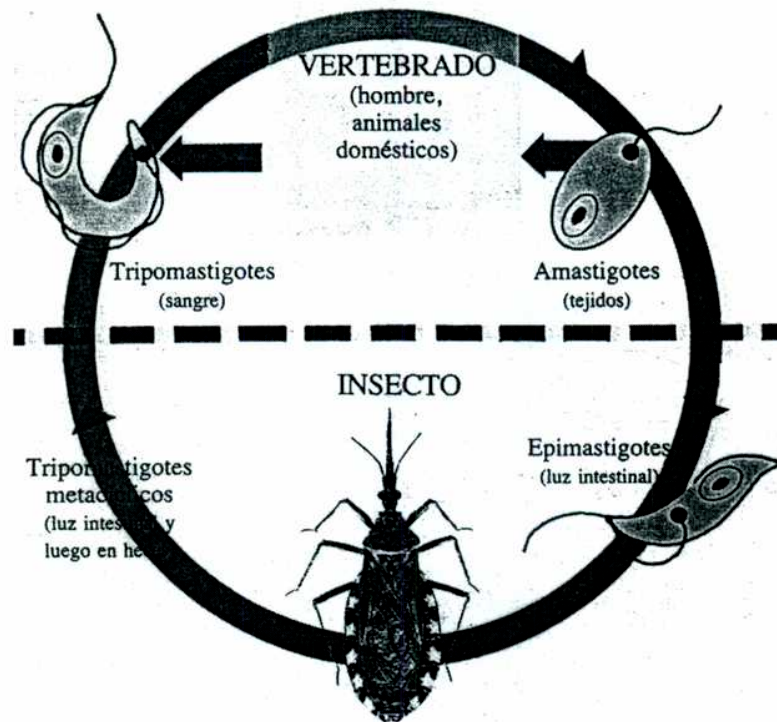


Figura 3(b): Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*.
(Carlomagno *et al.*, 1989).

Invasión de la célula hospedadora

Para poder completar su ciclo de vida, algunos protozoos parásitos deben alojarse dentro de las células del hospedador mamífero. Por ejemplo, el estadio sanguíneo de los parásitos de la malaria invaden exclusivamente glóbulos rojos y *Leishmania*, *in vivo*, solo se localiza dentro de los macrófagos. En cambio, *T. cruzi* es menos estricto ya que infecta células del miocardio, macrófagos y células del sistema nervioso autónomo. *In vitro* es aún menos selectivo e invade fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales con alta eficiencia.

Los tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* acceden al hospedador a través de la piel donde son depositados durante la picadura de la vinchuca. La infección ocurre luego de que el parásito accede a los tejidos cercanos.

El primer contacto entre la célula y el parásito y la invasión, incluyen la adhesión a moléculas ricas en ácido siálico, proteoglicanos o moléculas de la matriz extracelular, como el colágeno, la fibronectina y glicoproteínas que pueden influir en la dirección y sitio de colonización.

In vitro, la penetración de *T. cruzi* en células epiteliales y fibroblastos es polarizada (por su dominio basolateral), especialmente a través de los bordes de la célula que contienen receptores de la matriz extracelular. Estas regiones establecen el contacto inicial y podrían contener receptores para tripomastigotes (Schenkman *et al.*, 1988).

Las evidencias indican que la penetración ocurre por un proceso de endocitosis distinta de la clásica fagocitosis, ya que no hay emisión de pseudopodos durante la entrada del parásito (Schenkman *et al.*, 1988). Este mecanismo no necesita energía ni participación de los microfilamentos del hospedador. En cambio, la invasión requiere energía metabólica del parásito (Schenkman *et al.*, 1991a; Ortega-Barria and Pereira, 1992).

Los parásitos invaden en los márgenes periféricos de las células en una zona pobre en lisosomas e inmediatamente comienza a formarse una vacuola. Luego, los lisosomas se agregan en forma organizada en el sitio de unión del parásito y se fusionan con la vacuola durante los primeros momentos de su formación. Este evento está facilitado cuando los lisosomas son transportados por microtúbulos hacia la periferia celular. En cambio, alrededor del parásito recién internalizado no se detecta actina polimerizada, e incluso la desorganización de los microfilamentos de actina facilita la invasión (Tardieux *et al.*, 1992). Entre una y dos horas después de la invasión, la vacuola se rompe y los tripomastigotes escapan al citoplasma.

Ley *et al.* (1990) han demostrado que dicha vacuola es un compartimiento ácido y que el aumento del pH inhibe el escape de los parásitos al citoplasma.

En el proceso de ruptura de la membrana vacuolar está involucrada una hemolisina secretada por el parásito. Esta proteína llamada Tc-TOX presenta una actividad formadora de canales iónicos en bicapas de fosfolípidos a bajo pH, dañando la membrana. La proteína es semejante al componente C9 del complemento (Andrews *et al.*, 1990).

Dentro de la célula del mamífero, los amastigotes se dividen intensamente por fisión binaria y se transforman en tripomastigotes sanguíneos que entran en la circulación sanguínea. Estos pueden invadir una gran variedad de células de tejidos cercanos u órganos específicos más alejados (Ortega-Barria and Pereira, 1992).

Al emerger de la célula, el tripomastigote sanguíneo contiene poco o nada de ácido siálico en su superficie. Al entrar en la circulación expresan una única actividad de trans-sialidasa, que transfiere ácido siálico desde moléculas del hospedador hacia moléculas de la superficie del parásito, principalmente hacia un epítopo llamado Ssp-3, encontrado exclusivamente en las membranas de los tripomastigotes infectivos. Esta reacción permitiría la adquisición de la estructura de Ssp-3 requerida para el reconocimiento y adhesión a la célula

hospedadora (Schenkman *et al.*, 1991b). Los amastigotes intracelulares no expresan transialidasa, pero ésta comienza a sintetizarse durante la transformación en tripomastigote, dentro de la célula, horas antes de la lisis.

Los receptores para *T. cruzi* presentes en la superficie celular están sialidados y ha sido comprobado que la presencia de estas moléculas beneficia el proceso de invasión (Schenkman and Eichinger, 1993). También se involucra a la trans-sialidasa en el proceso de ruptura de la vacuola fagocítica facilitando la acción de la proteína Tc-TOX.

Diferenciación

Para desarrollar formas moleculares de prevención de la enfermedad, es decisivo el conocimiento de los mecanismos regulatorios que controlan la expresión de los genes involucrados en la diferenciación de una forma invasiva y no replicativa como el tripomastigote a una forma intracelular y multiplicativa como el amastigote. En este sentido se ha visto que la expresión de muchos polipéptidos varía siguiendo este patrón de diferenciación (Ruiz-Ruano *et al.*, 1991).

El proceso de diferenciación, conocido como metaciclogénesis, puede ser inducido en cultivos líquidos de epimastigotes de diferentes formas: por medio de componentes del suero de mamíferos, por el uso de medios imitando la orina del insecto ó con extractos del intestino medio de la vinchuca, por stress metabólico, ó AMPc. En este sentido, los tripomastigotes metacíclicos presentan mayores niveles de AMPc intracelular que los epimastigotes.

Fraidenraich *et al.* (1993) han demostrado que un péptido derivado de la hemoglobina, proveniente del intestino medio del insecto es el responsable de la activación de la adenilato ciclasa en membranas de epimastigotes, luego de unirse a un receptor específico, estimulando la diferenciación *in vitro* de los epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos. Muy probablemente, la transducción de señales vía proteína G es la responsable del aumento en los niveles de AMPc intracelular que activan una proteína kinasa A provocando la fosforilación de proteínas específicas relacionadas con la diferenciación. Se ha visto que dicho receptor es específico para péptidos que lleven determinadas secuencias de β -globina.

La Enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis Americana

Esta enfermedad afecta seres humanos de 15 países del continente americano y constituye uno de los problemas más serios de la salud pública. Se estiman alrededor de 90 millones de personas expuestas al contagio por vivir en zonas endémicas. En nuestro país el área afectada abarca las dos terceras partes de su superficie.

Esta enfermedad difícilmente curable y muchas veces mortal es producida por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* identificado por primera vez en 1909 por Carlos Chagas en Brasil. El vector que lo transmite al mamífero es el insecto *Triatoma infestans* o vinchuca. Esta infección era solo propia de animales selváticos pero debido a la incursión del hombre, algunas especies de vinchuca se adaptaron a la vivienda humana. Solo las especies domiciliadas son las que por evolución adaptativa están involucradas en la infección (Carlomagno *et al.*, 1989).

Por esta razón, las zonas rurales son las más desprotegidas debido a que la vinchuca vive en los techos de paja y paredes de adobe y también suele encontrarse en gallineros, corrales y depósitos de leña. Los animales domésticos como el perro y el gato que conviven con el hombre, constituyen un reservorio natural y permiten el desarrollo de un ciclo hombre-vinchuca-animal.

En realidad esta es una enfermedad relacionada con la pobreza ya que los problemas sociales y culturales, económicos y políticos llevan asociados carencias en la alimentación y en la salud básica de los habitantes, reduciendo considerablemente su calidad de vida.

Etapas de la enfermedad. Evidencias clínicas

En la enfermedad de Chagas se pueden distinguir tres etapas: una aguda, una indeterminada y una crónica (Carlomagno *et al.*, 1989).

La fase aguda se presenta inmediatamente luego de la infección inicial, en general con signos inespecíficos y solo en muy pocos casos es reconocible por el característico ojo casi cerrado debido a la hinchazón del párpado o signo de Romaña. También se detecta una fuerte parasitemia, supresión del sistema inmune y activación policlonal. Al terminar esta fase, los infectados pasan por un período prologado de tiempo sin manifestaciones clínicas.

Solo en un tercio de los infectados se desarrollan los síntomas característicos de la fase crónica, como la miocardiopatía o patologías de aparato digestivo con diferentes grados de severidad.

Si bien en algunos enfermos la fase aguda resulta fatal, en la mayoría de ellos la respuesta inmune logra reducir los niveles de parasitemia hasta hacerlos indetectables. De esta forma el paciente entra en la fase crónica de la enfermedad. De acuerdo a la gravedad de los síntomas, puede reducirse la capacidad física del paciente en forma parcial o total, disminuyendo de esta forma su calidad de vida y el tiempo real de la misma.

¿Quiénes son los más afectados?

En los mamíferos varía ampliamente el grado de susceptibilidad a la enfermedad. El hombre, los cánidos y félidos como también algunos roedores de laboratorio (ratones, ratas jóvenes y hámsters), sufren infecciones agudas y a veces fatales.

Experimentos realizados en perros y ratones han mostrado mayor susceptibilidad en individuos jóvenes y machos, incluso prepúberes, descartando que exista relación con las hormonas sexuales. En los seres humanos las observaciones clínicas también sugieren que hay mayor susceptibilidad en individuos jóvenes y del sexo masculino (Barriga, 1991). Los hombres y mujeres enfermos que tienen entre 30 y 40 años ven como consecuencia de la infección muy limitada su capacidad de trabajo. Los niños menores de 10 años son también muy sensibles.

Formas de transmisión y contagio

Como la vinchuca tiene hábitos nocturnos, se apoya sobre la piel de una persona dormida, la pica y se alimenta de su sangre. Al mismo tiempo elimina sus deyecciones que contienen los parásitos, que atraviesan la piel y las mucosas a través de las escoriaciones producidas por el rascado. Alcanzan los vasos sanguíneos que los conducen a los distintos tejidos donde el parásito se multiplica. Esta vía de transmisión se llama vectorial y es la más importante.

Otra forma puede ser por medio de transfusiones de sangre. El parásito puede permanecer infectivo hasta después de 3 semanas de extraída la sangre, si es mantenida a 4°C. El riesgo aumenta en las zonas de mayor incidencia de la enfermedad.

La tercera forma es la transmisión congénita. La infección de una mujer embarazada puede afectar el embarazo y modular el desarrollo de la inmunidad en el bebé. La mayoría de estas mujeres han sido infectadas durante la infancia y en la etapa reproductiva se encuentran en el estadio crónico de la enfermedad. A pesar de esto, la infección transplacentaria o congénita ocurre entre el 0,7 al 10,5% de los niños de madres seropositivas (Brabin, 1993).

Pueden ocurrir casos congénitos asintomáticos debido a la infección tardía en la gestación y a una respuesta inmune intensa.

Los valores mencionados son altos al compararlos con otras enfermedades parasitarias donde la infección congénita está asociada con infecciones agudas en mujeres con el sistema inmune deprimido.

Por otro lado, las mujeres con infecciones crónicas corren mayor riesgo de repetir la infección congénita en sucesivos embarazos contrariamente a lo que ocurre en murinos. A pesar de no tener evidencias de que la interacción entre la madre y el feto tenga influencia en el riesgo cardíaco o gastrointestinal de la enfermedad, este fenómeno ha sido observado en grupos familiares con enfermedades cardiovasculares en Brasil (Brabin, 1993).

Diagnóstico, quimioterapia, vacunas

En la etapa aguda, la enfermedad puede ser fácilmente diagnosticada examinando la sangre del paciente infectado. En cambio, en la etapa crónica, los parásitos no son detectados en sangre ya que se alojan en los tejidos, por lo cual se debe recurrir al diagnóstico por ensayos inmunológicos, a través de anticuerpos específicos. Solo en la mitad de los pacientes crónicos se puede realizar un diagnóstico parasitológico directo por xenodiagnóstico o hemocultivo. Actualmente, se utilizan moléculas antigénicas que permiten hacer el diagnóstico y precisar la etapa de la enfermedad en la que se encuentra el paciente.

Para curar la etapa aguda de la enfermedad de Chagas, se utilizan las drogas Nifurtimox y Beznidazol que resultan en general efectivas, mientras que para la etapa crónica no existen aún formas de tratamiento.

Los esfuerzos realizados con el objeto de desarrollar una vacuna no han sido todavía exitosos ya que los ensayos experimentales producen protecciones parciales frente a la enfermedad. Por otro lado, las reacciones de autoinmunidad generadas en el paciente limitarían los intentos de vacunación (Frasch *et al.*, 1991).

Utilización de la glucosa por los Trypanosomátidos

Los tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei* son las células eucariontes con la mayor tasa de consumo de glucosa, ya que utilizan esta sustancia a una velocidad 10 veces mayor que las células de su hospedador mamífero. La mayoría del resto de los trypanosomátidos estudiados también presenta altas tasas de consumo de glucosa, sin que esto guarde relación con la cantidad de glucosa presente en el medio circundante. La glucosa es la fuente preferida de energía pero la fructosa, manosa y glicerol también pueden ser usadas para la respiración.

C. fasciculata se desarrolla en el intestino del insecto donde los niveles de glucosa son bajos, sin embargo presenta una tasa de consumo de glucosa semejante a la forma sanguínea de los trypanosomas africanos.

Leishmania, *T. cruzi* y *T. lewisi* presentan un consumo de glucosa más bajo de manera similar a la forma procíclica de *T. brucei* (Cazzulo *et al.*, 1988a).

Un rasgo importante en los trypanosomátidos es la ausencia del “Efecto Pasteur”. En la mayoría de los organismos, la transición entre la anaerobiosis y la aerobiosis, va acompañada de una rápida y considerable caída del consumo de glucosa. La inhibición de la glucólisis por el oxígeno se llama “Efecto Pasteur”, e implica una forma de regulación del camino glucolítico. Debido a que la glucólisis aeróbica aporta un mayor rendimiento energético que la glucólisis anaeróbica, las células logran obtener la misma cantidad de energía utilizando considerablemente menor cantidad de carbohidratos, los cuales pueden ser almacenados como polisacáridos. Este fenómeno ocurre en levaduras o en células musculares, donde debido a la presencia de oxígeno se provoca una drástica inhibición en la producción de etanol o lactato, respectivamente, y un aumento en la producción de CO₂.

Como los trypanosomátidos no presentan Efecto Pasteur (Cannata and Cazzulo, 1984a) o aún lo tienen invertido, la utilización de la glucosa es igual o menor bajo condiciones anaeróbicas. Además, no se han encontrado en ninguno de ellos reservas de polisacáridos (Cannata and Cazzulo, 1984a).

El Efecto Pasteur invertido ha sido estudiado en detalle en *Leishmania* spp y también en *T. cruzi* (Urbina *et al.*, 1990).

Productos finales del catabolismo de la glucosa

Los trypanosomátidos degradan la glucosa dando como productos CO₂ (solo parcialmente) y ácidos orgánicos excretados al medio (Darling *et al.*, 1987; Fairlamb and Oppenheimer, 1986). Este proceso fue llamado “fermentación aeróbica” por von Brand (1979) para resaltar que durante el metabolismo eran liberados productos fermentativos típicos de un proceso anaeróbico, pero producidos en condiciones aeróbicas.

Los productos finales del catabolismo de la glucosa en trypanosomas Africanos y Americanos, *Crithidia* spp y *Leishmania* spp han sido estudiados utilizando técnicas variadas, incluyendo resonancia magnética nuclear usando glucosa marcada con ¹³C y ensayos enzimáticos específicos de catabolitos.

Dichos productos se resumen en la tabla 1.

En *T. brucei* existen importantes diferencias cualitativas, dependiendo de la presencia o no de oxígeno y del estadio del ciclo de vida. En los tripomastigotes sanguíneos largos y delgados, la mitocondria está reducida a un canal sin crestas, donde no hay citocromos y el Ciclo de Krebs no es funcional. Por esta razón depende enteramente de la glucólisis para la producción de energía. Produce casi exclusivamente piruvato (con trazas de CO₂) en condiciones aeróbicas, mientras que en anaerobiosis produce piruvato y glicerol en cantidades semejantes y algo de L-alanina y dihidroxipropionato (Oppenheimer, 1987; Fairlamb *et al.*, 1986). En cambio, los tripomastigotes sanguíneos cortos y gruesos presentan una mitocondria ampliada con desarrollo de crestas.

Cuando los tripomastigotes son ingeridos por el vector, la forma corta se diferencia en el intestino medio a la forma tripomastigote procíclica. Esta presenta una mitocondria muy bien desarrollada con crestas mitocondriales extensas y citocromos. Esta forma crece principalmente en un medio con aminoácidos más que con glucosa y excreta mayoritariamente CO₂, succinato, acetato y L-lactato bajo condiciones aeróbicas. Luego de la migración a las glándulas salivales, ocurre la diferenciación a la forma metacíclica, infectiva, de la cual se conoce poco en relación al metabolismo.

Con excepción de los tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei*, el resto de los trypanosomátidos producen succinato como producto principal del catabolismo de la glucosa, generalmente acompañado de otro producto.

Organismo	Estadio	Condición	Productos
<i>T. brucei</i>	BT	Aerobiosis	Pir-(glicerol)-(CO ₂)
	BT	Anaerobiosis	Pir-glicerol-(L-ala)-(Dihidroxiopropionato)
	PT	Aerobiosis	CO ₂ -Succ-Ac-L-Lac
	PT	Anaerobiosis	L-Lac-glicerol-Succ-Ac
<i>T. cruzi</i>	BT	Aerobiosis	CO ₂ -Succ-Ac-(L-Lac)
	BT	Anaerobiosis	Succ-Ac-(L-Lac)
	E	Aerobiosis	CO ₂ -Succ-L-ala-(L-mal)-Ac
	E	Anaerobiosis	Succ-L-ala-(Ac)
<i>L. pifanoi</i>	P	Aerobiosis	CO ₂ -Succ-(L-ala)-(Ac)-L-mal
	P	Anaerobiosis	Succ-L-ala-Ac-glicerol-(Pir)-(lac)
	A	Aerobiosis	CO ₂ -(Succ)-L-ala-Ac-(L-mal)
	A	Anaerobiosis	Succ-L-ala-Ac-glicerol-(Pir)-(lac)
<i>L. braziliensis</i>	P	Aerobiosis	CO ₂ -Succ-L-ala-Ac-Pir-D-lac
	P	Anaerobiosis	Succ-L-ala-Ac-D-lac-glicerol
<i>C. fasciculata</i>	Ch	Aerobiosis	CO ₂ -Succ-Etanol-(glicerol)-(Ac)
	Ch	Anaerobiosis	Succ-Etanol-glicerol-(L-mal)-(Ac)
<i>C. luciliae</i>	Ch	Aerobiosis	Succ-Pir-Ac-Etanol
	Ch	Anaerobiosis	Succ-Pir-Ac-Etanol

Tabla 1: Productos finales del catabolismo de la glucosa en trypanosomátidos.

BT, tripomastigote sanguíneo; PT, tripomastigote procíclico; Ch, coanomastigote; P, promastigote; E, epimastigote. Los productos minoritarios se indican entre paréntesis (Cazzulo, 1992b).

Metabolismo energético en *Trypanosoma cruzi*

Los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*, pueden ser obtenidos tanto en cultivos axénicos como en cultivo de células de mamífero o a partir de células de mamífero infectadas. La mayoría de los estudios metabólicos y enzimológicos en *T. cruzi* han sido realizados con cultivos axénicos de epimastigotes, presumiblemente semejantes a la forma presente en el insecto vector.

Estudios comparativos usando las distintas formas del ciclo de vida, permiten asegurar que por lo menos en forma cualitativa presentan características metabólicas similares, a diferencia de los tripanosomas africanos (Cazzulo, 1992a).

Utilización de nutrientes: carbohidratos, proteínas y aminoácidos

Los epimastigotes de *T. cruzi*, son capaces de tomar del medio y consumir tanto hidratos de carbono como aminoácidos, liberando como producto de excreción succinato y NH₃. La glucosa es preferida sobre los aminoácidos cuando ambos están presentes en el medio (Cannata and Cazzulo, 1984a; Cazzulo *et al.*, 1985). Esto ocurre a pesar de que el medio normal de los epimastigotes es el intestino de la vinchuca, muy rico en proteínas y

aminoácidos y pobre en hidratos de carbono. Por otro lado las necesidades nutricionales varían según el estadio del ciclo de vida. Mientras los epimastigotes pueden usar glucosa (preferida durante la fase exponencial del crecimiento) y aminoácidos (consumidos durante la fase estacionaria), los cultivos axénicos de una forma extracelular similar al amastigote presentan exclusivamente catabolismo glucolítico. En cambio, los tripomastigotes metacíclicos presentan catabolismo no glucolítico, obteniendo la energía exclusivamente de aminoácidos y proteínas.

Ambos sustratos, glucosa y aminoácidos son incorporados activamente por los epimastigotes del medio de cultivo. Las proteínas ingresan por pinocitosis, principalmente en la zona del bolsillo flagelar, y pueden cubrir las necesidades energéticas del parásito. Las proteínas y los aminoácidos pueden constituir una reserva energética para los parásitos, en circunstancias como la diferenciación de la forma epimastigote a tripomastigote metacíclico. En el estadio epimastigote específicamente, se encuentran los reservosomas que contienen proteínas ingeridas por el parásito y también la cisteína proteinasa principal (cruzipaina). Durante la diferenciación pueden consumir parte de su proteína como combustible. Estas organelas desaparecen durante la diferenciación.

La mayoría de los autores coincide en que *T. cruzi* no sintetiza polisacáridos de reserva. La biosíntesis de oligosacáridos podría limitarse a la porción glucídica de las glicoproteínas y lipopéptidofosfoglicanos.

Por otro lado, dentro del parásito existe una gran acumulación de aminoácidos, de los cuales, casi la mitad es L-alanina. Prolina, glicina y ácido glutámico también son abundantes.

La fermentación aeróbica de la glucosa

Durante el catabolismo de la glucosa, los epimastigotes y los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* producen ácidos orgánicos. Para profundizar en el tema, se han realizado ensayos enzimáticos específicos para la detección y cuantificación de los catabolitos producidos y, utilizando técnicas no invasivas de RMN- (^{13}C) se pudo realizar el seguimiento de la glucosa marcada durante el metabolismo de una célula viva.

Los resultados indicaron que el succinato y la L-alanina son los catabolitos principales, aunque también se ha detectado formación de acetato (Cazzulo *et al.*, 1985). Una pequeña parte del acetato provendría del catabolismo de la glucosa y, probablemente, la mayor parte derive del catabolismo de lípidos o aminoácidos.

Los estudios de RMN indican la presencia de dos reservorios diferentes de alanina, uno de los cuales es excretado, mientras que el otro es retenido dentro de la célula.

A diferencia de otros trypanosomátidos, los epimastigotes de *T. cruzi* no producen etanol ni glicerol (Cazzulo *et al.*, 1988a) como así tampoco lactato, piruvato o malato (Cannata and Cazzulo, 1984a).

Vías catabólicas

La glucólisis funciona en todos los trypanosomátidos estudiados tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. La vía de las pentosas es activa en epimastigotes, aunque se conoce menos acerca de su funcionamiento (Cannata and Cazzulo, 1984a).

La glucólisis presenta dos características que la distinguen del hospedador mamífero. Por un lado, la mayoría de las enzimas glicolíticas se encuentran en un compartimiento llamado “glicosoma” descubierto en *T. brucei* por Oppendoerf y Borst (1977). Por otro lado, las enzimas regulatorias claves de la mayoría de los sistemas glicolíticos desde bacterias hasta mamíferos, como la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa, son poco o nada afectadas en trypanosomátidos por los efectores comunes.

El único mecanismo claro de control de ésta vía es la gran activación de la piruvato quinasa presente en epimastigotes de *T. cruzi* (Juan *et al.*, 1976) por bajas concentraciones de fructosa 2,6 difosfato (Cazzulo *et al.*, 1989b).

Bajo condiciones aeróbicas, las evidencias indican que el Ciclo de Krebs y la cadena respiratoria son funcionales en *T. cruzi*, como en la mayoría de los Trypanosomátidos (Cazzulo, 1992a,b); todas las enzimas del ciclo, con excepción de la α -oxoglutarato dehidrogenasa, fueron detectadas en extractos libres de células. Una excepción es la forma sanguínea de *T. brucei* que no tiene las enzimas del Ciclo de Krebs y los citocromos, reoxidando el NADH glicolítico a través de una α -glicerofosfato oxidasa mitocondrial (Fairlamb *et al.*, 1986).

En la figura 4 se resumen los conocimientos actuales sobre el catabolismo de la glucosa en *T. cruzi*.

Para mantenerse funcionales, todos los sistemas glicolíticos deben tener un sistema eficiente de reoxidación del NADH producido en esta vía. Bajo condiciones aeróbicas funciona la cadena respiratoria y en condiciones anaeróbicas varios caminos fermentativos.

En *T. cruzi* existen distintas formas de reoxidación del NADH, operando bajo condiciones aeróbicas: (1) producción de succinato, (2) producción de L-alanina y (3) oxidación de metabolitos reducidos, en la cadena respiratoria.

(1) Producción de succinato: La producción de succinato depende de la fijación del CO₂ realizada por la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) (Cazzulo, 1992a) sobre un producto de la glucólisis, el fosfoenol piruvato (PEP). Para la obtención de succinato, el oxaloacetato (OA) debe ser reducido a L-malato, éste deshidratado a fumarato y éste finalmente reducido a succinato.

La reducción a L-malato sería suficiente para la reoxidación de todo el NADH glicolítico si ambas moléculas de PEP se convirtieran en succinato, sin pérdida de energía, produciéndose un ATP tanto en la reacción catalizada por la PEPCK como por la piruvato quinasa.

No se conoce con seguridad la razón de la producción y excreción del succinato, pero ha sido encontrado en todos los estudios realizados en el tema, mientras que el L-malato solo fue encontrado en raras oportunidades (Cazzulo, 1992a). Turrens ha propuesto que el succinato es la vía necesaria de entrada de los equivalentes de reducción a la cadena respiratoria, al faltar la enzima NADH dehidrogenasa (Boveris *et al.*, 1986; Turrens, 1989).

(2) Producción de L-alanina: Duschak y Cazzulo (1991) han propuesto que la producción de L-alanina podría estar asociada con la reoxidación del NADH glicolítico a través de la participación de las enzimas glutamato dehidrogenasa NAD y NADP dependientes (GluDH-NAD y NADP), la enzima málica y la alanina aminotransferasa.

La coenzima reducida podría reoxidarse por la acción de la GluDH-NAD dependiente produciendo L-glutamato que reaccionaría con el piruvato glicolítico en una reacción de transaminación catalizada por la alanina aminotransferasa. Para el funcionamiento de este camino sólo se necesitarían cantidades catalíticas de L-glutamato y α -oxoglutarato y un aporte continuo de NH₃. En relación a lo expuesto, se ha informado que la excreción de NH₃ al medio es prácticamente nula durante el consumo de glucosa (Cazzulo *et al.*, 1988a; Engel *et al.*, 1987), lo que podría deberse a que no es producido o a su utilización de la manera descripta.

La L-alanina puede obtenerse también en el citoplasma a partir de L-malato (producido por reducción del oxalacetato dentro del glicosoma) a través de la acción de la enzima málica, la GluDH-NADP dependiente y la alanina aminotransferasa. Este camino, descrito en la figura 5, convertiría L-malato y NH_3 en alanina y CO_2 y no requeriría de NADH citosólico.

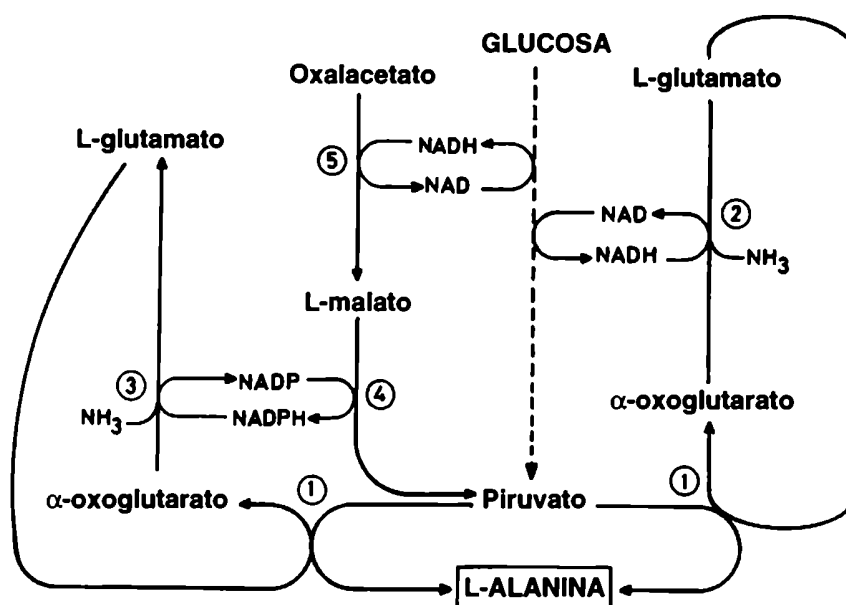


Figura 5: Participación de las glutamato dehidrogenasas en la reoxidación del NADH glucolítico en *T. cruzi*.

En la figura se indica la posible participación de la glutamato dehidrogenasa en el proceso de reoxidación del NADH. Las enzimas son: 1, alanina aminotransferasa; 2, glutamato dehidrogenasa NAD dependiente; 3, glutamato dehidrogenasa NADP dependiente; 4, enzima málica; 5, malato dehidrogenasa. (Cazzulo, 1992a).

(3) Oxidación en la cadena respiratoria: Bajo condiciones aerobias, parte del NADH glucolítico es reoxidado a través de la cadena respiratoria, que consiste en los citocromos b, C₅₅₈ y las oxidasas alternativas ($\text{a}+\text{a}_3$), citocromo 0 y citocromo d.

En epimastigotes los niveles de algunos citocromos son menores en comparación con los encontrados en las mitocondrias de las células de mamíferos. Junto con la relativa ineficiencia de la cadena respiratoria, pueden ser algunas de las razones de la existencia de la “fermentación aeróbica” como un camino complementario para la reoxidación del NADH glucolítico cuando la glucosa es usada masivamente (Cazzulo, 1992a).

El transporte del NADH desde el glicosoma donde se produce hacia la mitocondria para ser reoxidado en la cadena respiratoria, se realiza mediante el L-malato producido en el glicosoma y oxidado en la mitocondria.

La cadena respiratoria esta acoplada a la fosforilación oxidativa. Como en otros organismos, la fosforilación oxidativa esta mediada en *T. cruzi* por una ATPasa mitocondrial dependiente de Mg^{++} , sensible a oligomicina (Frasch *et al.*, 1978).

Organelas y compartimientos subcelulares

Debido a la ausencia de los controles habituales responsables del “Efecto Pasteur” *T. cruzi* puede consumir tanta glucosa como sea capaz de ingresar a la célula. Sin embargo, es necesario algún tipo de control para evitar ciclos fútiles que puedan interferir con la reoxidación del NADH (con el proceso de fermentación aeróbica). En este sentido, la reacción catalizada por la enzima málica debe ser controlada para evitar el reciclado de los productos de la PEPCK.

Estas evidencias sugieren que la compartimentalización subcelular es el mayor factor involucrado en la regulación de la glucólisis en Trypanosomátidos. En primer lugar, el gran consumo de glucosa podría deberse a la alta concentración de enzimas glicolíticas e intermediarios dentro del glicosoma.

En segundo lugar, el posible ciclo fútil entre la PEPCK y la enzima málica se evita ya que la PEPCK se localiza en el glicosoma (Cannata *et al.*, 1982) mientras que la enzima málica presenta dos isoenzimas, una mitocondrial y otra citosólica (Cannata and Cazzulo, 1984b).

En la figura 6 se detallan los compartimientos subcelulares de las enzimas en *T. cruzi* como también las interrelaciones entre la glucólisis y el Ciclo de Krebs y los caminos propuestos para la reoxidación del NADH.

El glicosoma

Esta organela es única del orden Kinetoplastida. Contiene varias enzimas de la glucólisis y del metabolismo del glicerol como también enzimas involucradas en diversas rutas metabólicas como la fijación del dióxido de carbono, la biosíntesis de pirimidinas y de lípidos, la oxidación de ácidos grasos y la recuperación de purinas.

Opferdoes y Borst (1977) describieron por primera vez la asociación de nueve enzimas con esta organela en *T. brucei*, de las cuales siete estaban relacionadas con la glucólisis y dos con el metabolismo del glicerol (Opferdoes, 1988). Además, fueron descritas otras diez enzimas incluídas en los glicosomas de estos organismos involucradas en distintas vías metabólicas (Opferdoes, 1988).

Esta organela esta presente en otros trypanosomátidos y es homogénea en cuanto al tamaño. Ha sido muy bien estudiada en *T. brucei*, donde en promedio, la forma sanguínea contiene 240 glicosomas, lo que representa entre un 4-8% del volumen celular total. En otros géneros los glicosomas son menos abundantes. En la forma promastigote de *Leishmania tropica* hay entre 50-100 por célula, mientras que los amastigotes de *L. mexicana* no tienen más de 10.

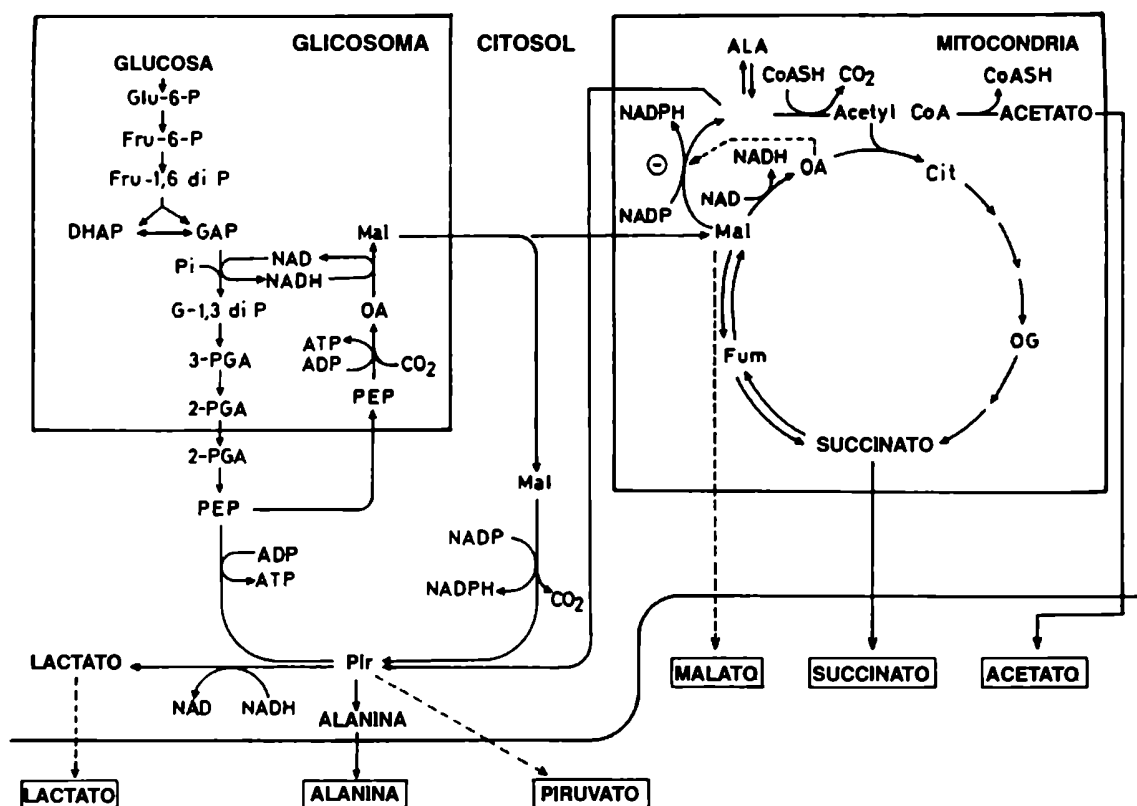


Figura 6: Compartimentalización de las enzimas involucradas en el catabolismo de la glucosa en *T. cruzi*.

Las abreviaturas son semejantes a las detalladas en la figura 4. Se agrega ALA, L-alanina. (Cazzulo, 1992a).

Debido a sus funciones inusuales, la presencia de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos y a su morfología, se piensa que los glicosomas están muy relacionados con los peroxisomas de otros protozoos, plantas y animales (Oppenheimer, 1988).

Catabolismo de proteínas y aminoácidos en Trypanosomátidos

Utilización de proteínas y aminoácidos

T. cruzi contiene entre el 43-53% de su peso en proteínas y un reservorio de aminoácidos libres que constituyen hasta el 5,2% del nitrógeno proteico total. De los aminoácidos libres, la L-alanina representa casi la mitad. Los aminoácidos prolina, glicina y ácido glutámico también son abundantes (O'Daly *et al.*, 1983).

El reservorio intracelular de aminoácidos libres en epimastigotes de *T. cruzi* puede usarse tanto para la biosíntesis de proteínas y la obtención de otras sustancias, como para la producción de energía. Estos aminoácidos son probablemente obtenidos por proteólisis de proteínas endógenas o exógenas o por incorporación directa del medio de cultivo. Una importante proporción de la L-alanina puede ser obtenida como un producto del catabolismo de la glucosa.

Los epimastigotes de *T. cruzi* consumen proteínas y aminoácidos durante su crecimiento en cultivo liberando NH_3 al medio como producto final, provocando un aumento del pH, disminuido por la excreción de ácidos orgánicos (Cáceres and Fernández, 1976). Estos datos concuerdan con los obtenidos por Yoshida y Camargo (1978) que muestran que *T. cruzi*, a diferencia de otros Trypanosomátidos, es estrictamente amoniotélico y carece de las enzimas del ciclo de la urea (Camargo *et al.*, 1978).

T. cruzi puede sintetizar algunos aminoácidos. A partir de glucosa se puede obtener alanina, aspartato, y glutamato. Además existe interconversión de algunos aminoácidos. Se conoce muy poco acerca de la forma en que *T. cruzi* incorpora aminoácidos del medio. La captación de lisina y arginina no es lineal y posiblemente se realiza mediante un sistema de transporte saturable.

También se ha observado que los epimastigotes de *T. cruzi* toman treonina y excretan cantidades casi equimolares de glicina, sugiriendo que funciona una vía que transforma la treonina en acetato y glicina similar a la propuesta por Cross *et al.* (1975) para *T. brucei*.

El acetato así producido sería usado preferencialmente en la síntesis de lípidos. En efecto, Roitman y Gutteridge (1978) mostraron que *T. cruzi* es capaz de sintetizar ácidos grasos luego de la incubación de los parásitos con L-(U-¹⁴C) treonina.

Actividades proteolíticas

En *T. cruzi* han sido descritas varias actividades proteolíticas (Itow and Camargo, 1977; Avila *et al.*, 1976). Los primeros estudios fueron realizados en extractos crudos, lo que hace difícil distinguir si los resultados corresponden a enzimas diferentes.

Se han purificado a homogeneidad tres proteinasas en epimastigotes, que pertenecen al grupo de las cisteína proteinasas. Una de ellas es de alto peso molecular (cerca de 200 kDa) (Bongertz and Hungerer, 1978; Ashall, 1990), en cambio las otras dos presentan valores de peso molecular inicialmente informados como cercanos a los 60 kDa (Bontempi *et al.*, 1984; Cazzulo, 1984) pudiendo tratarse de la misma enzima.

La cisteína proteinasa principal de *T. cruzi*, llamada cruzipaina, es una glicoproteína de alta manosa, con un peso molecular aparente de entre 35 y 60 kDa dependiendo de las condiciones electroforéticas, encontrada en los lisosomas y en la superficie del parásito (Bontempi *et al.*, 1989; Souto-Padrón *et al.*, 1990). La enzima madura presenta un dominio N-terminal con actividad enzimática y un dominio C-terminal altamente antigénico *in vivo*, siendo reconocida por la mayoría de los sueros de pacientes chagásicos crónicos (Martínez *et al.*, 1991). A las funciones en la digestión intracelular, como proteasa lisosomal, se le agregarían otros papeles, uno de los cuales podría ser en el mecanismo de evasión del sistema inmune por degradación parcial de las inmunoglobulinas, impidiendo la activación de la cascada del complemento. Además podría estar involucrada en la penetración de los tripomastigotes en la célula hospedadora, un proceso esencial para la perpetuación de la infección (Souto-Padrón *et al.*, 1990).

También se ha informado la presencia de una serín proteinasa, no identificada apropiadamente (Sakanari *et al.*, 1989) y una prolil-oligo-peptidasa (Burleigh *et al.*, 1997) así como de una metalo proteinasa, que podría ser parecida a la proteína gp63 de *Leishmania* (Greig and Ashall, 1990). No existen evidencias de la posible presencia de aspartil proteinasas en *T. cruzi*.

Catabolismo de aminoácidos. Enzimas involucradas

Los epimastigotes de *T. cruzi* pueden oxidar los aminoácidos a través del Ciclo de Krebs (Mancilla *et al.*, 1967; Sylvester and Krassner, 1976).

Las vías metabólicas para el catabolismo de la leucina y prolina son probablemente similares a las presentes en otros organismos aunque no han sido estudiadas en detalle ni se han caracterizado las enzimas involucradas en la degradación de la cadena carbonada de los aminoácidos. Se conoce mucho más acerca de las enzimas responsables de la transferencia y eliminación reversible del grupo amino de los aminoácidos.

Se han informado dos grupos de dichas enzimas: las transaminasas y las glutamato dehidrogenasas. La participación conjunta de ambas enzimas incluye la transferencia del grupo amino de diferentes aminoácidos al α -oxoglutarato por acción de las transaminasas para dar glutamato, el cual es luego oxidativamente deaminado por las glutamato dehidrogenasas dando NH_3 libre excretado al medio. Como las reacciones involucradas son reversibles, estas vías pueden utilizarse para la biosíntesis de aminoácidos por fijación de NH_3 siempre y cuando esté disponible el correspondiente α -oxoácido.

En epimastigotes de *T. cruzi* varios aminoácidos son capaces de transaminarse con el α -oxoglutarato o el piruvato para dar L-glutamato o L-alanina, respectivamente (Zeledón, 1960). Las enzimas involucradas, aspartato aminotransferasa (ASAT) (Cazzulo *et al.*, 1977) y la alanina aminotransferasa (ALAT) (Barros and Caldas, 1983; Zelada *et al.*, 1996) fueron purificadas y caracterizadas en epimastigotes y parecen ser semejantes a las de mamíferos.

También se encontraron las enzimas responsables del catabolismo de aminoácidos aromáticos, la tirosina aminotransferasa (TAT) y la L- α -hidroxiácido dehidrogenasa aromática (AHADH) (Nowicki *et al.*, 1992; Montemartini *et al.*, 1994). Ambas fueron purificadas a homogeneidad (Montemartini *et al.*, 1993).

Al estudiar la localización subcelular de todas estas enzimas, se encontró que estaban presentes en dos compartimientos: el citoplasma y la matriz mitocondrial, aunque distribuidas de diferente manera (Duschak and Cazzulo, 1991; Nowicki *et al.*, 1992).

Los epimastigotes de *T. cruzi* presentan también dos glutamato dehidrogenasas diferentes, una NADP dependiente (GluDH-NADP) y otra NAD dependiente (GluDH-NAD) (Cazzulo *et al.*, 1977, 1979; Walter and Ebert, 1979). Estas enzimas son semejantes a las correspondientes en bacterias, hongos y plantas y son claramente diferentes de las de mamíferos (inespecíficas para coenzima). Ambas han sido purificadas a homogeneidad y serán descritas con mayor detalle más adelante.

En estos parásitos, debe existir un balance entre las vías metabólicas para la producción de energía tanto a partir de hidratos de carbono como aminoácidos y siempre ha sido materia de especulación cuál de las dos vías es la más importante.

La oxidación de los intermediarios en el Ciclo de Krebs, como el oxalacetato y el α -oxoglutarato provenientes del catabolismo de los aminoácidos, necesita de la conversión previa en Acetil-CoA. Este mecanismo puede realizarse por medio de la acción de la enzima málica sobre el L-malato ó a través de la acción de la oxalacetato decarboxilasa sobre el oxalacetato.

Urbina y Azavache (1984) y Urbina (1987) han sugerido que en epimastigotes de *T. cruzi*, el uso preferencial de la glucosa sobre los aminoácidos se debe a la estrecha regulación de la GluDH-NAD dependiente y de la PEPCK, además de la ausencia de controles en la glucólisis. Las primeras enzimas pueden permanecer inhibidas cuando la glucólisis funciona activamente debido a la alta concentración de ATP y pueden empezar a activarse al agotarse la glucosa y disminuir la cantidad de ATP.

Sin embargo, las evidencias experimentales indican que la PEPCK participa en la excreción del succinato, actuando mientras la glucólisis es activa (como una vía auxiliar de este camino) a pesar de la inhibición por ATP de la reacción de carboxilación, propuesta por Urbina (1987). Esta inhibición por ATP no fue confirmada, sin embargo, por Cymering *et al.* (1995).

De acuerdo con Urbina, el catabolismo de aminoácidos puede ser mediado por el transporte del L-malato desde la mitocondria al glicosoma, la formación de OA por la malato dehidrogenasa, su decarboxilación a PEP por la PEPCK y el transporte del PEP al citoplasma para la posterior formación de ácido pirúvico por la piruvato kinasa y su transporte a la mitocondria donde puede ser oxidado a Acetil-CoA y finalmente incorporado al Ciclo de Krebs a través de la reacción de la citrato sintasa. El camino es posible debido a que la reacción catalizada por la PEPCK es reversible y es muy posible que la enzima málica I (mitocondrial) esté involucrada en lugar de la PEPCK. Esta conversión solo puede ocurrir en la mitocondria a pesar de que se necesitan para que ocurra, compartimientos como la mitocondria, el glicosoma y el citoplasma.

La fuerte inhibición que ejerce el OA sobre la enzima málica I, sugiere que la enzima estará activa solo cuando las concentraciones del intermediario se mantengan bajas por la citrato sintasa y el ciclo esté funcionando activamente.

En *T. cruzi* y otros Trypanosomátidos, la PEPCK tiene una función catabólica, sugerida por la ausencia de represión por glucosa, característica de las PEPCKs que presentan un rol gluconeogénico (Cazzulo *et al.*, 1985).

De todas maneras, se necesitan más evidencias experimentales para poder concluir la relevancia relativa del catabolismo de aminoácidos y de hidratos de carbono. Por el momento se puede concluir que ambos son importantes y que uno puede ser preferido sobre el otro de acuerdo al sustrato disponible y también al conjunto de enzimas que se encuentran presentes en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito.

Las características particulares del metabolismo y las diferencias con el hospedador mamífero, abren la posibilidad para desarrollar nuevas drogas efectivas contra varias enfermedades tropicales comunes, por inhibición selectiva.

Enzimas que unen nucleótidos

Los procesos enzimáticos que involucran nucleótidos, pueden ser divididos en dos clases dependiendo que parte del nucleótido esté comprometida en la reacción. El grupo tal vez más numeroso involucra la unión fosfato de alta energía como en el ATP. El segundo grupo, utiliza la base nitrogenada para la transferencia de electrones en procesos de oxidoreducción. En este caso se utilizan dos bases diferentes, la nicotinamida y la flavina, incorporadas a través de la dieta por medio de las vitaminas, debido a nuestra incapacidad para sintetizarlas.

Esta transferencia de átomos de hidrógeno desde el sustrato a la base del nucleótido es catalizada por dehidrogenasas y oxidasas.

Una molécula de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido), consiste en adenina-ribosa-fosfato-fosfato-ribosa-nicotinamida. La primera porción llamada AMP, se une a la segunda NMN (nicotinamida mononucleótido) por un enlace pirofosfato.

El NAD⁺ es usado casi exclusivamente en procesos de degradación oxidativa que llevan a la producción de ATP, mientras que el NADPH es utilizado, con algunas excepciones, en reacciones de biosíntesis reductiva. La presencia del grupo fosfato extra en la molécula de NADP⁺ es lo que permite distinguir a estas enzimas, mostrando el asombroso poder de reconocimiento molecular en las reacciones bioquímicas.

La base flavina esta presente en dos nucleótidos activos, FMN (flavín mononucleótido) y FAD (flavín adenina dinucleótido).

Las proteínas que unen dinucleótidos cumplen un rol central en la producción, intercambio y consumo de energía. Las reacciones en las que están involucradas forman parte de caminos metabólicos tan fundamentales como la glucólisis y la fotosíntesis. Son proteínas que se encuentran en organismos muy diversos como arqueobacterias, eubacterias y organismos eucariontes incluyendo levaduras, plantas, animales y seres humanos.

Hasta el momento se conocen más de 100 enzimas que unen dinucleótidos y la mayoría de ellas presentan motivos de unión a la coenzima. Estas enzimas no solo deben reconocer y unir al dinucleótido y al sustrato, sino que también deben ubicarlos muy cerca uno del otro en el sitio activo, con la orientación correcta de manera de permitir la transferencia directa del hidrógeno (Branden and Tooze, 1991).

Dominios de unión al sustrato y al dinucleótido

En estas enzimas se pueden identificar claramente dos dominios, uno de unión a la coenzima (exhibe similitudes en la organización y en la forma de unión a la coenzima) y el otro de unión al sustrato, que provee los aminoácidos necesarios para la catálisis (con muy diferentes funciones y organización estructural).

El sitio activo se encuentra en una hendidura entre los dos dominios. Los sitios de unión del sustrato y de la coenzima, están orientados de tal forma que la parte reactiva de la coenzima está muy cercana al átomo de hidrógeno que será transferido desde el sustrato (Branden and Tooze, 1991).

El dominio de unión a la coenzima

Rossmann *et al.* (1974) compararon la estructura de las 4 proteínas cuya estructura tridimensional se conocía hasta ese momento, capaces de unir dinucleótidos: lactato dehidrogenasa (LDH), malato dehidrogenasa (MDH), alcohol dehidrogenasa (ADH) y gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH). Los resultados indicaron que las 4 proteínas presentaban un gran parecido en el dominio de unión a la coenzima, en cuanto a su estructura tridimensional y no por homología en las secuencias. En cambio, la estructura del dominio catalítico de dichas enzimas resultó ser diferente.

El sitio de unión a la coenzima está formado por 6 segmentos con estructura en forma de hoja plegada β , paralelos entre sí y flanqueados a ambos lados por estructuras en α -hélice.

La estructura α/β es alternada y simétrica porque forma parte de una organización en dos mitades con idéntica topología y arreglo similar (dando un patrón $\beta\alpha\beta\alpha\beta.\beta\alpha\beta\alpha\beta$). Cada mitad $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ está formada por un par de motivos $\beta-\alpha-\beta$. Las dos mitades están ligadas entre sí por una α -hélice y unidas por uniones puente de hidrógeno (figura 7).

Cada mitad de este dominio simétrico se llama motivo de unión a mononucleótido o motivo de Rossmann. Se denomina así porque cada mitad del dominio se une a uno de los dos nucleótidos del dinucleótido y además porque en algunas proteínas como la flavodoxina, que unen mononucleótidos (FMN), aparece solo una mitad del dominio.

A lo largo del motivo $\beta\alpha\beta\alpha\beta$, el grupo pirofosfato de la coenzima se une a la región central del dominio y los nucleósidos se ubican hacia los costados. La adenosina se une al primer motivo de unión a mononucleótido y la nicotinamida-ribosa se une al segundo motivo.

La longitud total del dominio de unión a la coenzima es de aproximadamente 140 aminoácidos en las cuatro enzimas mencionadas.

Conservación del motivo β_1 - α A- β_2

A pesar de que no existe gran homología de secuencia entre los sitios de unión a la coenzima, ciertas posiciones permanecen invariantes y permiten predecir la región de la cadena de aminoácidos involucrada en la unión a la coenzima.

Al principio de la unidad $\beta\alpha\beta\alpha\beta$, existe una región de aproximadamente 30-35 aminoácidos, llamada motivo β_1 - α A- β_2 altamente conservado que presenta:

(1) Tres residuos de glicina conservados en el amino terminal de la primera α -hélice incluidos en una secuencia Gli-X-Gli-X-X-Gli, donde X puede ser cualquier aminoácido. Esta zona es importante para ubicar la parte central de la coenzima en la conformación correcta, permitiendo el contacto del entorno de la proteína con el difosfato de la coenzima.

(2) Seis residuos hidrofóbicos también conservados, importantes para la interacción entre las estructuras secundarias.

(3) Un ácido aspártico conservado en el carboxilo terminal de la cadena β_2 de la enzima que se une al grupo oxidrilo de la ribosa de la coenzima. Es la principal forma por la cual las enzimas pueden discriminar entre las coenzimas NAD y NADP.

(4) También se conserva un aminoácido cargado positivamente en el extremo amino terminal de la cadena β_1 , lisina o arginina. Aunque su función se desconoce, se asocia con la estabilidad de la interacción de las cadenas β .

A diferencia de la primera unidad, no se distingue un motivo semejante en la segunda unidad $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ (Bellamacina, 1996).

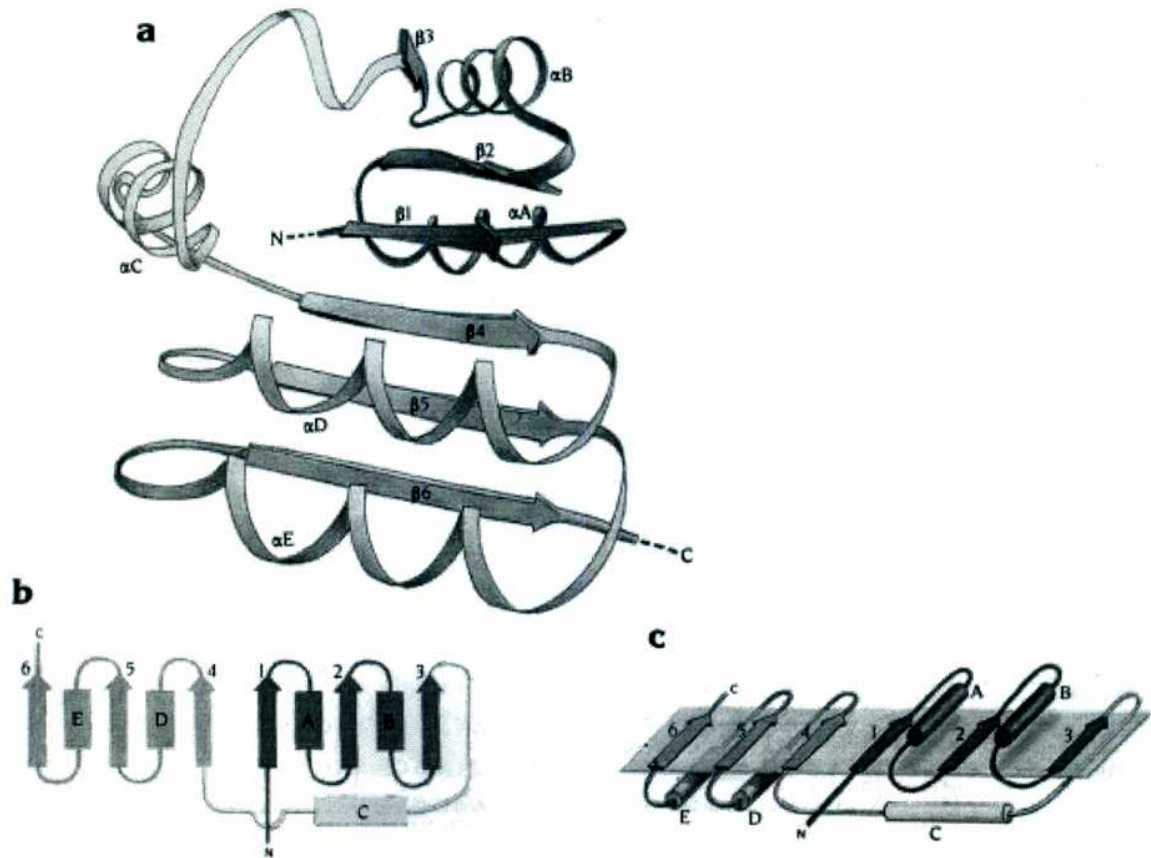


Figura 7: Representación de los dominios de unión a la coenzima.

(a) Los dominios de unión a la coenzima tienen similar estructura tridimensional pero diferente secuencia de aminoácidos. La estructura α/β presenta una hoja plegada β en el centro, rodeada por α -hélices. Dicha estructura está dividida en dos mitades (rojo y verde) llamados motivos de Rossmann o motivos de unión a mononucleótido.

(b) y (c) Diagrama topológico de (a). (Branden and Tooze, 1991).

Transferencia estereoespecífica

Las dehidrogenasas transfieren un átomo de hidrógeno desde el sustrato al C4 del anillo de la coenzima de manera estereoespecífica. Este anillo es asimétrico y los átomos de hidrógeno en el C4 de la forma reducida de la coenzima no son equivalentes. Esto permite una clasificación de las dehidrogenasas, teniendo en cuenta si el átomo de H es transferido desde el sustrato a una posición por delante o por detrás del plano del anillo. Estas diferencias reflejan desigualdades en la estructura del sitio catalítico.

El anillo de la nicotinamida se coloca en la hendidura entre los dos dominios de la enzima. Una cara del anillo establece interacción con los aminoácidos del dominio de unión a la coenzima y la otra cara con el sitio de unión al sustrato. La interacción entre el grupo

carboximida (responsable de la asimetría del anillo) y la región de la proteína que une los dos dominios, determina que cara del anillo enfrenta al sustrato, estableciendo la estereoespecificidad de la transferencia del átomo de H (Branden and Tooze, 1991).

Evolución de los dominios de unión a coenzimas

El rol fundamental de los nucleótidos en el metabolismo implica que las enzimas que unen nucleótidos deben haber surgido muy tempranamente en la evolución de los seres vivos. Estas enzimas podrían haber surgido en forma independiente unas de otras o descender de una o de un grupo pequeño de proteínas ancestrales que unen nucleótidos. A pesar de no poder determinar aún la historia evolutiva de estas enzimas, algunas teorías proponen una evolución divergente a partir de un antecesor común.

Los estudios del potencial redox y la evolución del transporte biológico de electrones, sugieren un origen común para las proteínas que unen NAD, FAD y FMN (Rossmann *et al.*, 1974).

En cambio, la teoría convergente propone un antecesor de las dehidrogenasas que involucra fusión de genes: un gen codificante para una proteína con capacidad de unión a nucleótidos, común para todas las dehidrogenasas, fusionado con otro gen con información para una proteína capaz de unirse a un sustrato, diferente para las distintas dehidrogenasas (Ohlsson *et al.*, 1974).

La localización subcelular de las enzimas que unen NAD, como las dehidrogenasas, tanto en el citoplasma como en la mitocondria, permite especular que su aparición debería ser anterior al origen de los eucariontes, o sea hace aproximadamente 1.500 millones de años. Incluso podría ser anterior ya que son enzimas requeridas por los primeros procariontes para realizar la glucólisis, trasladando el tiempo de su origen 3.200 millones de años atrás (Rossmann *et al.*, 1974).

El sitio de unión a la coenzima en las glutamato dehidrogenasas. Diferencias entre las enzimas NAD y NADP dependientes

Estudios de predicción de la estructura secundaria y comparación de secuencias permitieron la identificación de los dominios estructurales en varias glutamato dehidrogenasas, resultando parecidos a los dominios de unión a la coenzima de otras

dehidrogenasas (Wootton, 1974). De esta manera pudieron establecerse los aminoácidos críticos para la unión a la coenzima, usados como criterio para alinear los dominios de las GluDH estudiadas.

Scrutton *et al.* (1990) han estudiado las bases estructurales de la especificidad de las dehidrogenasas por NAD o NADP, por experimentos de mutagénesis dirigida, analizando los aminoácidos de la zona saliente de la región de unión al nucleótido. En el amino terminal de la primera α -hélice, se encuentran tres residuos de glicina conservados e incluidos en una secuencia Gli-X-Gli-X-X-Gli. La secuencia Gli-X-Gli-X-X-**Gli** indicaba especificidad por NAD mientras que la secuencia Gli-X-Gli-X-X-**Ala** fue el marcador de las NADP.

En la última posición, la alanina, junto con otra alanina cuatro posiciones más adelante, quedan con los grupos metilo hacia el mismo lado, ocupando más espacio que la correspondiente glicina de las NAD dependientes, originando una modificación local de la conformación del polipéptido. Esto está asociado con el cambio de la especificidad para la coenzima (Scrutton *et al.*, 1990).

Otra forma para discriminar entre las enzimas que unen NAD o NADP es a través de la conservación o no del aminoácido aspártico. En las enzimas dependientes de NAD, la coenzima establece un puente de hidrógeno entre el 2'OH de la adenosina-ribosa y el aspártico en la enzima. En cambio, las enzimas dependientes de NADP, presentan un grupo fosfato en la posición 2'OH, impidiendo la unión con el aminoácido por repulsión entre las cargas negativas de ambos grupos. Por esta razón este tipo de enzimas tienen residuos de glicina o arginina en lugar de aspártico y asparagina, respectivamente, permitiendo la interacción entre las cargas positivas del aminoácido con el grupo fosfato de la coenzima NADP.

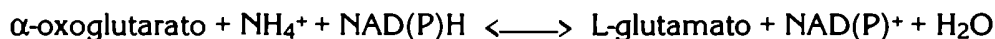
La glutamato dehidrogenasa (GluDH)

Generalidades de las glutamato dehidrogenasas

Reacción que cataliza

Las glutamato dehidrogenasas (GluDHs) son enzimas que cumplen un importante rol en el metabolismo del carbono y del nitrógeno.

Catalizan una reacción reversible, que en un sentido provoca la aminación reductiva del α -cetoglutarico para dar L-glutamato con la oxidación de NAD(P)H y en el sentido opuesto, provoca la desaminación oxidativa del L-glutamato para dar 2-oxoglutarato y amonio con la concomitante reducción de una molécula de NAD(P)⁺.



Esta reacción permite la interconversión del amonio libre y el nitrógeno de los grupos α -amino, en conjunto con la acción de las aminotransferasas. Las GluDHs de diferentes especies generalmente participan más en un tipo de metabolismo que en el otro. Pueden estar relacionadas con la asimilación de amonio o el catabolismo del glutamato o, en el caso de los mamíferos, pueden tener un rol anfibólico.

Especificidad para coenzima

Existen tres tipos de glutamato dehidrogenasas en cuanto a la especificidad de unión a la coenzima NAD(H) ó NAD(P)H.

GluDH(NAD): son específicas para NAD (EC 1.4.1.2.).

GluDH(NAD(P)): son enzimas inespecíficas para coenzima ya que pueden utilizar tanto NAD como NADP (EC 1.4.1.3.).

GluDH(NADP): son específicas para NADP (EC1.4.1.4.).

Muchos organismos presentan más de un tipo de GluDH (NAD y NADP dependientes) y con diferente localización intracelular.

En la tabla 2 se detallan las GluDHs obtenidas de distintos organismos indicando su especificidad para coenzima. (I: indica inespecificidad de coenzima).

ORGANISMO	COENZIMA	CITA
Arqueobacterias		
<i>Pyrococcus furiosus</i>	NAD	Eggen <i>et al.</i> , 1993
	I	Robb <i>et al.</i> , 1992
<i>Pyrococcus endeavori</i>	I	DiRuggiero <i>et al.</i> , 1993
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	I	Maras <i>et al.</i> , 1992
<i>Sulfolobus shibatae</i>	NADP	Benachenhrou <i>et al.</i> , 1994
<i>Halobacterium salinarum</i>	NADP	Benachenhrou and Baldacci, 1991
Eubacterias		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	NAD	Joe <i>et al.</i> , 1993
<i>Clostridium symbiosum</i>	NAD	Lilley <i>et al.</i> , 1991; 1992
<i>Clostridium difficile</i>	NAD	Lyerly <i>et al.</i> , 1991
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	NAD	Snedecor <i>et al.</i> , 1991
<i>Thermatoga maritima</i>	I	Kort <i>et al.</i> , 1997
<i>Mycoplasma laidlawii</i>	I	Yarrison <i>et al.</i> , 1972

ORGANISMO	COENZIMA	CITA
<i>Micrococcus aerogenes</i>	I	Kew and Woolfolk, 1970
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	I	Engelhardt and Klemme, 1978
<i>Nitrosomonas europea</i>	NADP	Hooper <i>et al.</i> , 1967
<i>Aerobacter aerogenes</i>	NADP	Tempest <i>et al.</i> , 1970
<i>Escherichia coli</i>	NADP	Veronese <i>et al.</i> , 1975; McPherson and Wootton, 1983
<i>Bacillus licheniformis</i>	NADP	Meers and Pedersen, 1972
<i>Bacillus megaterium</i>	NADP	Hemmilä <i>et al.</i> , 1978
<i>Synechocystis sp.</i>	NADP	Chávez <i>et al.</i> , 1995
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	NADP	Börmann <i>et al.</i> , 1992
<i>Haemophilus influenzae</i>	NADP	Fleischmann <i>et al.</i> , 1995
<i>Salmonella typhimurium</i>	NADP	Bansal <i>et al.</i> , 1989
Protozoos		
<i>Leishmania tarentolae</i>	NAD	Bringaud <i>et al.</i> , 1997
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	I	Hooper <i>et al.</i> , 1974
<i>Trypanosoma cruzi</i>	NAD	Cazzulo <i>et al.</i> , 1979
	NADP	Cazzulo <i>et al.</i> , 1977
<i>Crithidia fasciculata</i>	NAD	Higa <i>et al.</i> , 1979
	NADP	
<i>Plasmodium chabaudi</i>	NADP	Walter <i>et al.</i> , 1974
<i>Giardia intestinalis</i>	NADP	Yee and Dennis, 1992
Invertebrados		
<i>Loligo pealeii</i> (calamar)	NAD	Storey <i>et al.</i> , 1978a
<i>Drosophila melanogaster</i>	I	Papadopoulou and Louis, 1990
Peces		
<i>Thunnus thynnus</i>	NAD	Veronese <i>et al.</i> , 1976
<i>Arapaima gigas</i>	NAD	Corman and Kaplan, 1967
<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>	NAD	Storey <i>et al.</i> , 1978b
<i>Conger myriaster</i>	I	Tang <i>et al.</i> , 1992
Hongos		
<i>Neurospora crassa</i>	NAD	Austen <i>et al.</i> , 1977; Haberland and Smith, 1980
	NADP	Holder <i>et al.</i> , 1975
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NAD	Boles <i>et al.</i> , 1993
	NADP	Nagasu and Hall, 1985
<i>Emericella nidulans</i>	NADP	Hawkins <i>et al.</i> , 1989
<i>Debaryomyces accidentalis</i>	NADP	De Zoysa <i>et al.</i> , 1991
<i>Laccaria bicolor</i>	NADP	Lorillou and Martin, no publicado
<i>Agaricus bisporus</i>	NADP	Schaap <i>et al.</i> , 1996
<i>Dictyostelium discoideum</i>	NAD	Pamula and Wheldrake, 1991
	NADP	Pamula and Wheldrake, 1991
<i>Achlya klebsiana</i>	NAD	LeJohn <i>et al.</i> , 1994
Algas		
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	I	Shatilov and Kretovich, 1977
	NADP	
<i>Chlorella sorokiniana</i>	NAD	Meredith <i>et al.</i> , 1978
	NADP	Cock <i>et al.</i> , 1991
Plantas		
<i>Zea mays</i>	NAD	Sakakibara <i>et al.</i> , 1995
Hojas de trigo	NAD	Bulen, 1956
Cotiledones de soja	NAD	King and Wu, 1971
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	NAD	Restivo <i>et al.</i> , no publicado

ORGANISMO	COENZIMA	CITA
<i>Solanum lycopersicum</i>	NAD	Purnell <i>et al.</i> , no publicado
<i>Vitis vinifera</i>	I	Syntichaki <i>et al.</i> , 1996
Raíz de guisante	No está claro	Pahlich and Joy, 1971
Aves		
<i>Gallus gallus</i>	I	Moon <i>et al.</i> , 1973
Mamíferos		
<i>Bos indicus</i>	NAD	Cho <i>et al.</i> , 1995
<i>Bos taurus</i>	I	Moon and Smith, 1973
<i>Mus musculus</i>	I	Tzimagiorgis and Moschonas, 1991
<i>Rattus norvegicus</i>	I	Das <i>et al.</i> , 1989
<i>Homo sapiens</i>	I	Julliard and Smith, 1979; Banner <i>et al.</i> , 1987; Nakatani <i>et al.</i> , 1987

Tabla 2: Especificidad para coenzima.

En la tabla se detallan las especificidades para coenzima de todas las GluDHs encontradas en el banco de datos. (I) Indica inespecificidad de coenzima.

Peso molecular y de subunidad

El peso molecular de las GluDHs varía según la especie. Mayormente son enzimas formadas por subunidades iguales, constituyendo tetrámeros o hexámeros, cuyo peso molecular es también variable entre especies. Son generalmente proteínas grandes. En la tabla 3 se detallan algunos ejemplos de las diferencias mencionadas.

Organismo	GluDH	Nº de sub.	PM/sub kDa	PM kDa
Hígado bovino	Inespecífica	6	55,9	320
Hígado de pollo	Inespecífica	6	55,6	320
Hígado porcino	Inespecífica	6	55,6	320
Calamar	NAD	6	55,6	320
<i>Neurospora crassa</i>	NAD	4	115	480
<i>Neurospora crassa</i>	NADP	6	48	288
<i>Escherichia coli</i>	NADP	6	48	250
<i>Mycoplasma laidlawii</i>	Inespecífica	6	48	250
<i>S. cerevisiae</i>	NADP	6	48	280
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Inespecífica	6	48	300
<i>Chlorella sorokiniana</i>	NAD	4	48	180

Tabla 3: PM y número de subunidades de las GluDHs.

En la tabla se detallan algunos ejemplos de GluDHs con especificidad para NAD o NADP e inespecíficas, indicando el PM de la enzima completa y de cada subunidad mostrando en cada caso si son hexaméricas o tetraméricas.

Familias de glutamato dehidrogenasas

Las glutamato dehidrogenasas pueden ser agrupadas en dos clases, según el número de subunidades. Las GluDH-NADP dependientes de bacterias y hongos y las GluDH inespecíficas para coenzima de los vertebrados tienen seis subunidades idénticas, con un peso molecular por subunidad de 48 kDa en *Escherichia coli* y 55 kDa en vertebrados. En cambio, las enzimas dependientes de NAD pueden tener tanto seis subunidades idénticas de 48 kDa como en *Clostridium symbiosum* ó cuatro subunidades también idénticas de 115 kDa como en el caso de *Neurospora crassa*.

La comparación de secuencias de GluDHs de fuentes diferentes, muestra que las enzimas hexaméricas son estructuralmente similares, cualquiera sea su especificidad para coenzima (Lilley *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1992). En los primeros residuos del extremo N-terminal la homología es baja, pero luego aumenta considerablemente, pudiendo encontrar zonas muy similares en los siguientes 350 aminoácidos.

Con respecto al extremo C-terminal, la semejanza encontrada puede dividirse en 2 clases: los invertebrados y los vertebrados. Las enzimas de los invertebrados están muy relacionadas entre sí, mientras que las enzimas de los vertebrados, muestran muy poca similitud en esta región y además tienen 50 aminoácidos más.

La primera mitad de la molécula es la que presenta mayor semejanza, ya que allí se ubica la zona de unión del glutamato/oxoglutarato y el sitio catalítico. En esta región, se encontró una identidad del 95% entre las enzimas bovina y de pollo.

A diferencia de los datos disponibles acerca de las GluDH hexaméricas, se conoce muy poco de las enzimas tetraméricas. Solo se aislaron de *S. cerevisiae*, *Pichia jardinii* (llamada inicialmente *Candida utilis*) y *N. crassa*. Cada uno de estos organismos posee, además de la forma tetramérica, una GluDH-NADP hexamérica genéticamente distinta.

Estudios de difracción por rayos X, permitieron resolver la estructura tridimensional de la GluDH-NAD de *Clostridium symbiosum* (Britton *et al.*, 1992). El análisis comparativo entre la forma tetramérica de *N. crassa* y la secuencia y estructura tridimensional de la enzima de *C. symbiosum* reveló que existen grupos de aminoácidos conservados en la estructura tridimensional y sitios marcadamente similares dispuestos en el sitio activo de la enzima.

En base a la comparación de secuencias, se sugiere que las GluDH-NAD podrían haber surgido como ramificaciones separadas de la familia principal, de las GluDH-NADP (de *N. crassa* y *E. coli*) o de las inespecíficas de mamíferos (Lilley *et al.*, 1991).

Localización intracelular

Las glutamato dehidrogenasas de células animales fueron detectadas inicialmente en la fracción mitocondrial y por esta razón utilizadas como marcadores mitocondriales.

Hoy se conoce que estas enzimas tienen varias localizaciones subcelulares incluyendo la mitocondria, el citoplasma e incluso el núcleo.

En algunos organismos que poseen más de una glutamato dehidrogenasa con diferente localización subcelular, las enzimas difieren en sus propiedades catalíticas y estructurales.

Relación entre la conformación, el estado de asociación de las subunidades y la función catalítica

En la enzima inespecífica de hígado bovino, la unidad mínima activa de la enzima es un hexámero que puede formar estructuras lineales constituídas por un número indefinido de unidades hexaméricas (Thusius, 1975). El equilibrio entre ambas formas, hexámero y polímero, depende de la concentración de enzima, del pH, la fuerza iónica y la temperatura. Además, es decisiva la acción concertada de ligandos específicos como coenzimas, sustratos y efectores sobre el estado de polimerización (Jallon *et al.*, 1970).

La enzima es un hexámero de subunidades idénticas y resulta importante conocer el significado de la interacción entre ellas, como responsables del mantenimiento de la configuración nativa de la enzima, como así también de sus propiedades catalíticas y regulatorias. Strambini *et al.* (1989) han demostrado que usando agentes desnaturizantes se puede lograr la disociación de la proteína, primero en trímeros y finalmente en monómeros con pérdida reversible de la actividad. Tanto la actividad catalítica como el efecto de inhibidores no son exclusivos de la forma hexamérica sino también del trímero. Estos agentes desnaturizantes afectan la conformación de la enzima independientemente del estado de agregación de las subunidades.

Estudios realizados con la GluDH-NADP de *N. crassa* mostraron una transición estructural reversible lenta, que lleva unos pocos minutos, entre el estado activo e inactivo de la enzima, aunque no se detectaron cambios conformacionales de consideración entre ambos estados (Ashby *et al.*, 1974).

Este tipo de enzimas, que responden lentamente frente a cambios rápidos en la concentración de sustrato y de los modificadores, se han llamado enzimas histeréticas. Este tipo de respuesta podría estar relacionado con una agregación o desagregación lenta de las subunidades o con un paso de unión a determinados ligandos, también lento.

Las enzimas con este comportamiento particular, generalmente se encuentran en puntos clave de control en rutas metabólicas muy ramificadas o en vías que utilizan intermediarios comunes. De esta forma una respuesta lenta podría “amortiguar” el cambio en las concentraciones de los intermediarios. Por ejemplo, la GluDH-NADP dependiente de *N. crassa* es una enzima que interviene en una reacción que ocurre inmediatamente antes de un sitio de múltiples ramificaciones de las vías metabólicas (Ashby *et al.*, 1974).

Efecto de pH y sales

Las características del medio de reacción en cuanto a fuerza iónica, pH y electrolitos, inciden de manera diferente sobre las propiedades regulatorias y catalíticas de las GluDHs, provocando cambios conformacionales en la proteína que pueden llevar a su desnaturalización.

La GluDH mitocondrial de hígado bovino presenta un pH óptimo de 7,6 en ausencia de electrolitos. El agregado de fosfato inorgánico aumenta la actividad a pHs altos. Estos mismos resultados se obtienen con ClNa o Tris, indicando que el efecto no es específico. El pH y los electrolitos modifican también inespecíficamente las propiedades regulatorias de la enzima. Por ejemplo a pH bajo, la activación por NAD es mínima y a pH neutro el ADP es inhibidor mientras que a pH alcalino es activador. El GTP funciona mejor como inhibidor a pH alcalino que neutro, dependiendo también de la concentración de electrolitos (Di Prisco, 1975).

Estabilidad frente a la temperatura

Muchas GluDHs de origen animal son más estables en amortiguador fosfato que en Tris. Se han estudiado la estructura, actividad y grado de exposición de los grupos tioles al medio, de las GluDHs en amortiguador Tris, fosfato, borato y Hepes. La GluDH de hígado bovino, en amortiguador fosfato, tiene alto contenido de α -hélice y ningún grupo tiol accesible, mientras que en Tris o borato se produce una pérdida de la α -hélice y de la actividad, exponiéndose al medio los 6 grupos sulfhidrilos de las subunidades. La GluDH-NADP de *E. coli* es estable a 4°C varios días y se desnaturaliza a 65°C y, la GluDH-NAD de *N. crassa* es estable por meses a la misma temperatura en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y se desnaturaliza rápidamente a 50°C (Juan, 1979).

Efecto de reactivos de tioles

Las GluDHs de fuentes diferentes varían en su respuesta a reactivos que interaccionan con grupos sulfhidrilos (SH). Dicha variación guarda relación con el amortiguador presente en el medio de reacción. En la GluDH de hígado bovino no se puede detectar ningún grupo SH en amortiguador fosfato mientras que son accesibles al DTNB los 6 SH de cada subunidad en amortiguador Tris-ClH. La GluDH-NADP de *E. coli* no fue afectada por p-hidroximercuribenzoato (p-HMB), iodoacetamida, DTNB y NEM. La GluDH-NAD de *N. crassa* puede ser afectada por pCMB, NEM, DTNB, IBz y ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico (NTCB) pero no por iodoacetamida o iodoacetato (Juan, 1979).

Propiedades regulatorias

Las GluDHs son enzimas reguladas a distintos niveles. Por un lado, a través de mecanismos de inducción y represión de la síntesis de la enzima realizados por determinados metabolitos y por otro lado, debido al efecto de ciertos ligandos y nucleótidos de purina di y tri-fosfato que afectan su actividad.

Regulación de la síntesis

Las GluDHs cumplen diferentes roles fisiológicos ya que están involucradas en uno o dos tipos de metabolismo. Las GluDH-NADP dependientes de bacterias, hongos y plantas, están relacionadas con la asimilación del NH_3 del medio, por lo tanto tienen un rol anabólico. En cambio las GluDH-NAD dependientes, intervienen en funciones catabólicas (catabolismo del glutamato) y las enzimas inespecíficas de coenzima presentes en vertebrados, podrían presentar un rol anfibólico.

Estas conclusiones acerca las funciones en el metabolismo de las GluDHs, se basan en estudios realizados con metabolitos que regulan *in vivo* la síntesis de la enzima a través de mecanismos de inducción o represión catabólica.

La GluDH-NADP de *E. coli* es inducida en un medio con glucosa como única fuente de carbono y niveles apropiados de NH_4^+ (Veronese *et al.*, 1975).

La síntesis de las dos GluDHs de *Neurospora crassa* está regulada por la presencia o ausencia de N orgánico en el medio. En presencia de NH_3 o glutamato se induce la GluDH-NAD y se reprime la GluDH-NADP (Sanwal and Lata, 1962); mientras que la glucosa o sacarosa tienen un efecto contrario.

En ***Chlorella sorokiniana*** la GluDH-NADP es inducida por NH_4^+ y la GluDH-NAD constitutiva es sintetizada en medios con amonio o nitrato (Yeung *et al.*, 1981).

En ***Bacillus subtilis*** la GluDH-NAD tiene un rol catabólico, es inducida en un medio rico o mínimo conteniendo glutamato como fuente de carbono y está sujeta a represión catabólica (Kane *et al.*, 1981).

Salmonella typhimurium presenta una GluDH-NADP cuya actividad no varía durante el crecimiento, usando diferentes fuentes de N (Rosenfeld *et al.*, 1982). La enzima puede funcionar con exceso o en condiciones limitantes de NH_4^+ .

En ***S. cerevisiae*** la actividad de GluDH-NADP es alta y la de GluDH-NAD es baja cuando las células son crecidas en medios con NH_3 como fuente de N. Cuando se utiliza glutamato la inducción/represión es inversa. Si en el medio hay glucosa o galactosa se induce la GluDH-NADP y se reprime la GluDH-NAD dependiente (Bogonez *et al.*, 1985).

La GluDH-NADP de ***Corynebacterium glutamicum*** es la responsable de la formación de glutamato a altas concentraciones de amonio y en condiciones limitantes de biotina. A bajas concentraciones de amonio, la formación de glutamato se realiza por medio de las enzimas glutamina sintetasa/glutamato sintasa (Börmann *et al.*, 1992).

Regulación de la actividad

La actividad de las GluDHs inespecíficas de coenzima se encuentra sujeta a modulación por moléculas de distinta naturaleza como los nucleótidos de purina (ADP, GTP, etc), cationes (Zn^{++}), sustratos y coenzimas, lípidos y hormonas.

En la enzima de hígado bovino, el GTP y el GDP son inhibidores mientras que el ADP funciona como activador. Este no favorece la unión de la coenzima NADH mientras que el GTP la fortalece, detectándose los mismos efectos para las coenzimas en estado oxidado. Cuando el GTP y las coenzimas NADH o NADPH son agregados a la GluDH de hígado bovino, se producen una serie de cambios asociados con la depolimerización que llevan a la pérdida de la actividad (Jallon *et al.*, 1970). La fijación del NADH a la enzima aumenta la afinidad por el GTP. Estos datos apoyan la teoría de Frieden (1959) que indica que el NADH y no el NADPH puede unirse a dos sitios diferentes en la enzima, un sitio activo y otro sitio regulatorio. El NADH y NAD actuarían en el segundo sitio como inhibidor y activador alostérico respectivamente. En cambio el NADPH podría unirse solamente al sitio activo.

Jallon e Iwatsubo (1971) evidenciaron la unión de una molécula de NADPH y de dos moléculas de NADH por cada subunidad a través del anillo de nicotinamida. El sitio común de ambas coenzimas (sitio activo) presenta igual afinidad por ellas en estado reducido e interacciona con el sustrato L-glutamato. El segundo sitio (solo para NADH), interacciona con efectores alostéricos como el GTP y el Zn^{++} . En presencia de éstos el NADH podría unirse con mayor afinidad al sitio regulatorio debido a cambios conformacionales provocados por el efector que desenmascaran el segundo sitio de unión a la coenzima. Todos estos datos sugieren una interacción concertada entre tres clases de moléculas (sustratos, coenzimas y efectores) que repercute en el estado de asociación de los hexámeros y que implica que los cambios conformacionales se propaguen a partir de los sitios de fijación.

El L-glutamato actúa de forma semejante al GTP, aunque en sitios diferentes.

La leucina activa la enzima como el ADP, pero en sitios distintos y muy cercanos entre sí, ya que la unión de uno afecta en forma positiva la unión del otro.

Acetilcolina, serotonina, norepinefrina y triptamina son inhibidores no competitivos de la GluDH y la epinefrina y dihidroxifenilalanina son activadores. La fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, cardiolopina y otros fosfolípidos son inhibidores (Juan, 1979).

La enzima inespecífica de hígado bovino y las de mamíferos en general son inhibidas por GTP y GDP y activadas por ADP, ATP, AMP y leucina (Frieden and Colman, 1967). La actividad de la GluDH-NADP de *E. coli* es afectada por nucleótidos de purina. En el sentido de la aminación reductiva, la enzima se activa por bajas concentraciones de ATP y AMP. En cambio, altas concentraciones de AMP resultan inhibitorias (Veronese *et al.*, 1975).

La GluDH inespecífica de *Bacillus subtilis* no es afectada por nucleótidos de purina (Kimura *et al.*, 1977) de la misma forma que la enzima NADP dependiente de *S. cerevisiae* (Venard, 1975).

Funciones de las GluDHs

El amonio es un intermediario obligado en la asimilación de fuentes inorgánicas de nitrógeno, realizado por plantas y microorganismos. Uno de los principales productos de dicha asimilación en compuestos carbonados es el L-glutamato que funciona como el mayor distribuidor de grupos amino en la síntesis de aminoácidos y purinas y es un precursor de los aminoácidos de la familia del L-glutamato.

La asimilación del amonio para formar glutamato puede ser realizada a través de la acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT) ó por medio de la glutamato dehidrogenasa (GluDH). La operatividad de ambos caminos depende de la concentración de amonio intracelular. El ciclo GS-GOGAT solo representa el camino principal para la síntesis de L-glutamato en plantas superiores, algas y organismos procariontes fotosintéticos. En bacterias, cuando la concentración de amonio es alta, la GluDH-NADP es responsable de la síntesis del L-glutamato, en cambio cuando la concentración es baja, el L-glutamato se forma por medio de las enzimas GS/GOGAT, debido a que en dichas condiciones, la GS tiene mayor afinidad por el sustrato que la GluDH.

(1) Reacciones de desaminación oxidativa

La desaminación ocurre en la primera fase del catabolismo de la mayoría de los aminoácidos. El esqueleto carbonado restante puede ser degradado por diferentes vías, pero generalmente termina en un compuesto intermediario del ciclo de Krebs, pudiendo ser utilizado para la producción de energía o con fines anabólicos. Las reacciones de desaminación pueden ser oxidativas o no oxidativas.

Glutamato dehidrogenasa: Esta enzima ampliamente distribuida en los seres vivos está relacionada con la transaminasa del par L-glutamato- α -cetoglutarato, que lleva a cabo la transferencia del grupo amino de los aminoácidos al α -cetoglutarato para dar L-glutamato y el α -cetoácido correspondiente.

Dicho L-glutamato es posteriormente desdoblado en NH_3 libre liberado como producto de excreción, recuperándose el α -cetoglutarato que puede funcionar nuevamente como aceptor de grupos amino. Sin la actividad de la GluDH el aminoácido L-glutamato sería un callejón sin salida en el catabolismo de los grupos amino de los aminoácidos.

El L-glutamato, y a través de él otros aminoácidos como arginina, glutamina, prolina e histidina, pueden entrar al ciclo de Krebs bajo la forma de α -cetoglutarato, pudiendo intervenir en la producción de energía ó en el anabolismo de glúcidos.

Las coenzimas reducidas que se producen durante la reacción pueden involucrarse en procesos de biosíntesis ó reoxidarse.

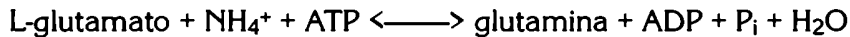
(2) Reacciones de amlnación.

Corresponden al grupo de reacciones en las que se produce la asimilación del amonio del medio y están catalizadas por las enzimas:

Glutamato dehidrogenasa: La enzima es crucial en la síntesis de aminoácidos, siendo en muchos organismos la principal forma para obtener grupos amino a partir del amoníaco presente en el medio.

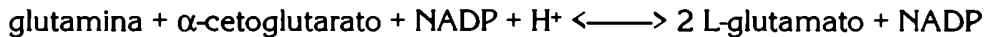
Glutamina sintetasa y asparagina sintetasa: Estas enzimas provocan la fijación del NH_3 sobre el L-glutamato o el aspartato para dar como producto glutamina o asparagina respectivamente. En ambos casos se consume ATP. La glutamina producida puede funcionar como transportadora o dadora de NH_3 durante la síntesis de purina y citidina trifosfato.

GS



Glutamato sintetasa: La enzima glutamina sintetasa lleva a la formación de glutamina con gasto de energía metabólica. La glutamina es capaz de ceder su grupo amino al α -cetoglutarato a través de una reacción de aminación reductiva mediada por la glutamato sintetasa. El producto final obtenido es el L-glutamato.

GOGAT



Otras funciones de las GluDHs

Como ya hemos visto la localización intracelular de las GluDHs varía entre el citoplasma, la mitocondria y el núcleo. A pesar de que la forma nuclear ha sido purificada y demostradas sus diferentes propiedades cinéticas, inmunológicas y físicas con respecto a la enzima mitocondrial (DiPrisco and Casola, 1975), durante mucho tiempo, se dudó si en realidad no era una isoenzima o GluDH mitocondrial contaminante. Por otro lado, la presencia de la enzima en el núcleo era inquietante desde el punto de vista metabólico. McDaniel (1995), ha demostrado que la función principal de la proteína en el núcleo tiene relación con la regulación de la transcripción. Los estudios con GluDH de hígado bovino le asignan propiedades de una proteína de unión al ARN. Se propone que la GluDH podría regular la transcripción de ciertas proteínas uniéndose al ARN. Dicha unión estaría influenciada por el estado metabólico celular en cuanto a las concentraciones de las moléculas efectoras de la enzima como el ADP, GTP, etc.

En el mismo sistema, Preiss *et al.* (1995) llegaron a una conclusión similar. Al estudiar la regulación post-transcripcional de la isoforma de hígado de la citocromo c-oxidasa, encontraron una proteína llamada COLBP implicada en la regulación de la expresión del ARNm, por medio de su unión al extremo 3' UTR, provocando un incremento en la estabilidad del ARNm. Los datos de purificación y secuencia de esta proteína y experimentos de fraccionamiento subcelular e inmunocompetencia, permitieron identificarla como una GluDH de la matriz mitocondrial.

Recientemente, se ha asignado una nueva función a las GluDHs. En *L. tarentolae* se identificó una proteína de unión a ARNg (guía) de 110 kDa como una GluDH-NAD dependiente mitocondrial. Dicho reconocimiento fue realizado a través de experimentos de cosedimentación de la actividad e identificación por sueros policlonales además de estudios de comparación de secuencias. Dicha proteína reconocería el extremo 3' poli(U) de los ARNg y en la interacción estaría involucrado el sitio de unión al dinucleótido. Además se vió que la enzima es capaz de unirse a UTP monomérico. Los autores proponen que una de las funciones biológicas de la GluDH mitocondrial podría ser unir UTP y presentarlo en el sitio de editado.

Algunas enzimas con dominios de unión a coenzimas y funciones en el metabolismo, han sido propuestas como una nueva clase de proteínas de unión al ARN. Entre ellas la gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa, se une al ARN_t y se la relaciona con la exportación nuclear; la timidilato sintasa y la dihidrofolato reductasa humana, se unen a su propio ARNm y pueden autorregular la traducción; la isocitrato dehidrogenasa-NAD dependiente mitocondrial de levadura es capaz de unirse al extremo 5'UTR de los ARNm mitocondriales. Se ha propuesto que las enzimas que se unen a ARN participan en circuitos regulatorios generales estableciendo nexos entre funciones metabólicas y mecanismos regulatorios. Por otro lado también se propone que estas proteínas son en realidad "fósiles moleculares" como estructuras de transición entre ARN y proteína, en las cuales las propiedades de unión al ARN no tendrían ningún significado funcional (Bringaud *et al.*, 1997).

Características generales de los genes que codifican para las GluDHs

Como una forma de entender la estructura, función, regulación y relación evolutiva de las GluDHs, se han podido determinar las secuencias nucleotídicas completas de los genes correspondientes a un gran número de enzimas de distintas fuentes y diferente especificidad para coenzima.

En las bacterias entéricas, el gen *gdhA* codifica para la GluDH-NADP dependiente. En cambio la glutamato sintasa esta codificada por el gen *gltB*.

El gen *gdhA* de ***Escherichia coli K-12*** fue clonado en varios laboratorios (Sánchez-Pescador *et al.*, 1982; Valle *et al.*, 1983; Mc Pherson and Wootton, 1983). La región codificante del gen contiene 1341 nucleótidos que corresponden a una proteína de 447 aminoácidos. Cerca del codón de iniciación se encuentra un sitio de unión al ribosoma y a mayor distancia río arriba, tres zonas que cumplen los criterios de los promotores procariontes. Río abajo del gen existe una secuencia que predice un terminador de la transcripción rho-independiente. Existen preferencias en el uso de los codones, lo que estaría reflejando niveles de expresión, ya que la GluDH-NADP es una enzima bastante abundante dentro de la bacteria.

El gen *am* de la GluDH-NADP de ***Neurospora crassa*** (Kinnaird and Fincham, 1983) presenta una región codificante interrumpida por dos intrones muy parecidos entre sí en secuencia. Existen 4 aparentes sitios de iniciación de la transcripción y un sitio único de poliadenilación. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la enzima de *E. coli* y *N. crassa* muestra una muy fuerte homología, con una identidad del 59%.

En ***Saccharomyces cerevisiae***, el gen GDH1 codifica para la enzima GluDH-NADP, (Nagasu and Hall, 1985; Moye *et al.*, 1985). La región codificante tiene 1362 nucleótidos y no presenta intrones. El 84% de los aminoácidos de la proteína se encuentran codificados por codones de uso preferencial en muchos genes que codifican para enzimas de la glucólisis en levadura. La proteína representa aproximadamente el 0,5% de la proteína total soluble de levaduras.

Benachenhou y Baldacci (1991) clonaron y secuenciaron el gen *gdhA* de copia única, de la GluDH-NADP dependiente de la arqueobacteria halófila extrema ***Halobacterium salinarum***. La comparación de secuencias mostró que la GluDH de este organismo,

tiene mayor homología con la misma proteína de eucariontes superiores (bovina y de pollo) que con la de eubacterias o eucariontes unicelulares. Estos organismos también presentan una GluDH-NAD dependiente aún no caracterizada.

El gen de la GluDH-NADP de ***Giardia lamblia*** (Yee and Dennis, 1992) presenta 1350 nucleótidos que codifican para una proteína de 449 aminoácidos sin intrones. Probablemente, el transcripto primario no está sujeto a edición. La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida con las enzimas de otras fuentes mostró una gran homología con las enzimas dependientes de NADP de eubacterias (57.7%) y hongos (55.3%).

En ***Clostridium symbiosum*** (Teller *et al.*, 1992) el gen estructural de la GluDH-NAD dependiente tiene 1353 nucleótidos y codifica para una proteína de 450 aminoácidos. Esta enzima tiene la particularidad de presentar un motivo de unión a la coenzima, en este caso NAD, característico de las GluDH-NADP dependientes. Se conocen las secuencias regulatorias para la iniciación de la transcripción, sin embargo no se encontraron secuencias para la terminación de la misma.

A partir de hígado de ***Homo sapiens*** fueron aislados y caracterizados varios ADNc que codifican para una GluDH mitocondrial, inespecífica para coenzima, de 558 aminoácidos que incluye un péptido de tránsito a la mitocondria de 53 aminoácidos. La secuencia del ADNc consiste en un región 5'UTR de 70 pb, un marco abierto de lectura de 1677 pb, una región 3'UTR de 1262 pb y 15 bases de poli(A) (Amuro *et al.*, 1988). Experimentos de Southern blot indican la presencia de más de un gen para GluDH, posiblemente una pequeña familia multigénica. La GluDH humana presenta una identidad del 95% con la enzima de hígado bovino (Mavrothalassitis *et al.*, 1988). Posteriormente se identificó el gen funcional GLUD1 de 45 kpb organizado en 13 exones (Michaelidis *et al.*, 1993).

El estudio del ADNc de la GluDH inespecífica de ***Mus musculus*** mostró gran conservación al compararlo con el de humano y rata (Tzimagiorgis and Moschonas, 1991). Experimentos de Northern blot indicaron expresión tejido específica.

En ***Rattus norvegicus*** el gen para la GluDH inespecífica ocupa 34 kpb repartidas en 13 exones. El gen es único, autosómico y presenta polimorfismo para varias enzimas de restricción. La región 5' flanqueante contiene una secuencia TTAAAA en la posición -29 en lugar del TATA box (Das *et al.*, 1993).

En ***Drosophila melanogaster*** existe un solo gen para la GluDH inespecífica, localizado en el brazo derecho del cromosoma 3. El transcripto incluye un intrón largo que madura a un ARN poliadenilado de 2,4 kpb de longitud cuya expresión se encuentra bajo control en el desarrollo (Papadopoulou and Louis, 1990).

En base a todas las secuencias de GluDHs conocidas de la bibliografía, con sus respectivas especificidades para coenzima, se construyó un árbol filogenético que permitió relacionarlas como se observa en la figura 8. Claramente pueden identificarse los tres grupos de enzimas; inespecíficas para coenzima, NAD y NADP dependientes.

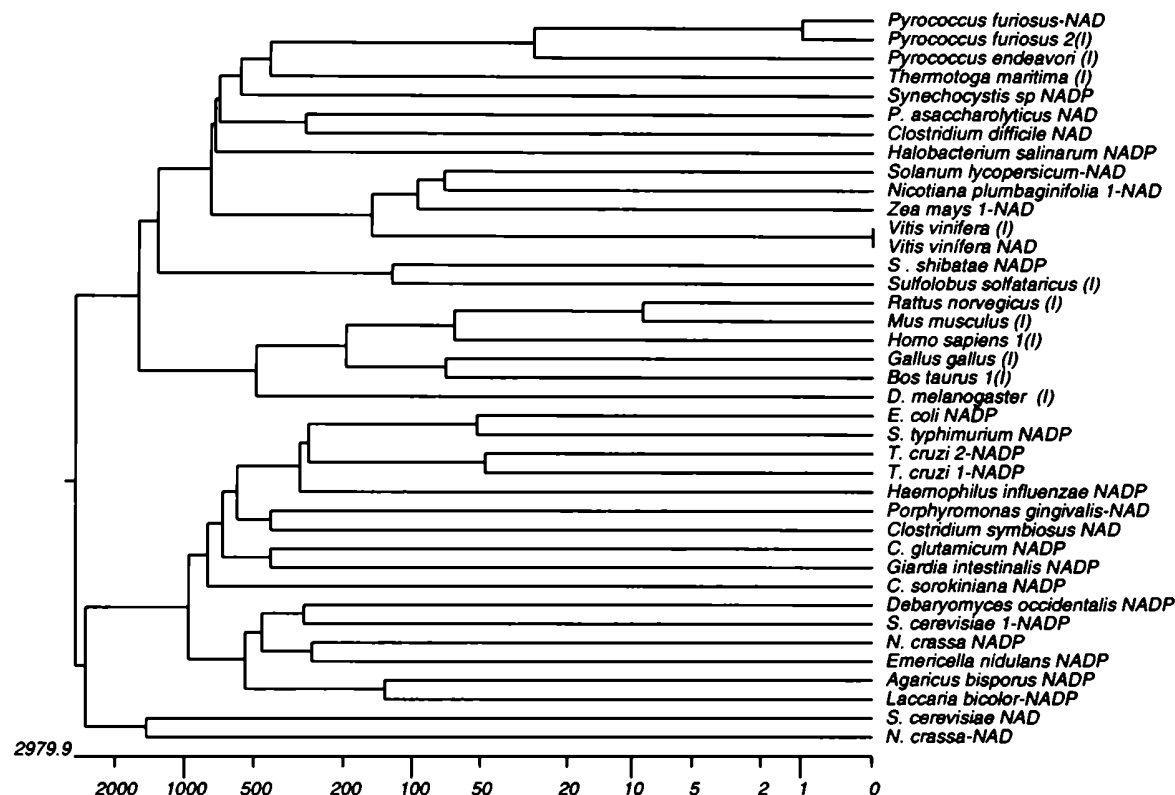


Figura 8: Comparación entre GluDHs-NAD, NADP e inespecíficas para coenzima.

Se realizó una comparación en base a las secuencias proteicas de las enzimas encontradas en el banco de datos obteniéndose un diagrama donde pueden identificarse en forma bastante clara (salvo algunas excepciones) los tres grupos de enzimas; inespecíficas para coenzima, NAD y NADP dependientes. Se compararon las siguientes enzimas: GluDHs-NADP dependientes: *E. coli* (Valle et al., 1983); *S. typhimurium* (Bansal et al., 1989); *H. influenzae* (Fleischmann et al., 1995); *G. intestinalis* (Yee and Dennis, 1992); *C. sorokiniana* (Cock et al., 1991); *Corynebacterium glutamicum* (Börmann et al., 1992); *Debaryomyces occidentalis* (De Zoysa et al., 1991); *S. cerevisiae* (Nagasu and Hall, 1985); *Emicella nidulans* (Hawkins et al., 1989); *N. crassa* (Kinnard and Fincham, 1983); *Agaricus bisporus* (Schaap et al., 1996); *Laccaria bicolor* (Swiss-Prot Accession Number P54388); *H. salinarum* (Benachenhau and Baldacci, 1991); *Synechocystis* sp (Chávez et al., 1995) y *S. shibatae* (Benachenhau-Lahfa et al., 1994), además de incluir las secuencias obtenidas en este trabajo de Tesis Doctoral, *TcGluDH₁* y *TcGluDH₂*.

GluDHs-NAD dependientes: *Pyrococcus furiosus* (Eggen et al., 1993); *P. asaccharolyticus* (Snedecor et al., 1991); *Clostridium difficile* (Lylerly et al., 1991); *Solanum lycopersicum* (Pumell et al., no publicado); *Nicotiana plumbaginifolia* (Restivo et al., no publicado); *Zea mays* (Sakakibara et al., 1995); *Vitis vinifera* (Syntichaki et al., 1996); *Porphyromonas gingivalis* (Joe et al., 1993); *Clostridium symbiosum* (Lilley et al., 1991); *Neurospora crassa* (Austen et al., 1977); *Saccharomyces cerevisiae* (Boles et al., 1993).

GluDHs-inespecíficas: *Pyrococcus furiosus* (Robb et al., 1992); *Pyrococcus endeavori* (DiRuggiero et al., 1993); *Thermatoga maritima* (Kort et al., 1997); *Vitis vinifera* (Syntichaki et al., 1996); *Sulfolobus solfataricus* (Maras et al., 1992); *Rattus norvegicus* (Das et al., 1989); *Mus musculus* (Tzimagiorgis and Moschonas, 1991); *Homo sapiens* (Banner et al., 1987); *Gallus gallus* (Moon et al., 1973); *Bos taurus* (Moon and Smith, 1973); *Drosophila melanogaster* (Papadopoulou et al., no publicado).

Para dicha comparación se utilizó el programa de alineamiento Múltiple de Secuencia, Megalign, de Lasergene (DNA STAR, Inc, Madison, WI, USA) que emplea el algoritmo de Jotun Hein (Hein, 1990).

Las GluDHs en los protozoos parásitos

A pesar del amplio conocimiento sobre estas enzimas en organismos eucariontes y procariontes, se conoce relativamente poco acerca de ellas en protozoos.

En *Tetrahymena pyriformis* se encontró una sola enzima inespecífica de coenzima (Hooper et al., 1974). En *Plasmodium chabaudi* (Walter et al., 1974) y *Trypanosoma cruzi* (Cazzulo et al., 1977; Juan et al., 1978) se detectó una GluDH-NADP con propiedades distintas de la enzima correspondiente de mamífero. *T. cruzi* presenta además, aunque en menor cantidad, una GluDH-NAD dependiente (Cazzulo et al., 1979). En *Crithidia fasciculata*, fueron encontradas dos enzimas NAD y NADP dependientes, de las cuales la forma NADP presenta mucha menor actividad. La GluDH-NAD fue altamente purificada y estudiada en mayor detalle (Higa et al., 1979), presentando una fuerte inhibición por ATP y GTP, menos por ADP y GDP y poco afectada por AMP. Esto sugiere que la enzima de los trypanosomátidos tiene un rol catabólico siendo inhibida por la carga energética de la célula.

La caracterización del gen que codifica para la GluDH-NADP de *Giardia lamblia* fue de gran importancia ya que es un parásito muy primitivo y posiblemente el primer grupo de individuos de la línea eucarionte, ya que a pesar de ser eucarionte no presenta mitocondrias ni peroxisomas y su metabolismo es anaerobio (Yee and Dennis, 1992). *G. lamblia* tiene solo una GluDH-NADP dependiente codificada por un gen de copia única. A diferencia de otros organismos, *Giardia* utiliza esta enzima casi exclusivamente para mantener el equilibrio redox en el reservorio intracelular de NAD(P).

En *Leishmania tarentolae* se encontró una GluDH-NAD dependiente cuya secuencia de aminoácidos es similar a la forma tetramérica de *N. crassa*. El peso molecular por subunidad de esta enzima es de 110 kDa y su localización mitocondrial (Bringaud et al., 1997). Esta proteína podría estar relacionada con el editado del ARN.

Las glutamato dehidrogenasas (GluDHs) de *Trypanosoma cruzi*

Los cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* presentan dos glutamato dehidrogenasas (GluDHs) diferentes, una NAD y otra NADP dependiente (Cazzulo *et al.*, 1979; Walter and Ebert, 1979). En este sentido ambas enzimas se parecen a las correspondientes en bacterias, hongos y plantas y difieren claramente de las de mamíferos, ya que estos presentan una única GluDH inespecífica para coenzima. Esta diferencia, entre otras, entre el parásito y su hospedador, es sumamente importante ya que si la GluDH cumple un papel indispensable en el metabolismo del parásito, podría convertirse en un blanco para el ataque quimioterápico contra la enfermedad de Chagas sin provocar alteraciones en la salud del hospedador mamífero.

Ambas GluDHs fueron purificadas (Juan *et al.*, 1978; Walter and Ebert, 1979) y sus propiedades estudiadas en detalle (Cazzulo, 1984).

La glutamato dehidrogenasa-NAD dependiente (GluDH-NAD)

La enzima GluDH-NAD dependiente fue detectada en epimastigotes (Cazzulo *et al.*, 1979) y purificada a homogeneidad (Walter and Ebert, 1979). La cantidad de enzima detectada depende del procedimiento empleado en la ruptura de los parásitos y de la cepa empleada. La enzima es muy lábil y gran parte de la actividad se pierde durante los pasos de purificación a menos que haya glicerol en los amortiguadores durante el protocolo.

Por filtración en gel en una columna Sephadex G-200 se pudo determinar el peso molecular de la forma nativa que resultó ser de 360 kDa, mientras que el peso molecular de cada subunidad determinada por SDS-PAGE fue de 58 kDa, correspondiendo a una enzima hexamérica como la GluDH-NADP (Walter and Ebert, 1979).

Los valores de K_m aparente para NADH, α -oxoglutarato y NH_4 fueron 0.16, 3.8 y 18mM respectivamente y los valores para NAD y L-glutamato fueron 1.4 y 11mM (Cazzulo *et al.*, 1979).

El pH óptimo de la reacción en el sentido de la aminación reductiva fue 7,6 y en el sentido de la desaminación oxidativa 8,6 (Cazzulo *et al.*, 1979).

La actividad de esta enzima, a diferencia de la GluDH-NADP fué inhibida por nucleótidos de purina como AMP, ADP, ATP, GDP y GTP (Cazzulo *et al.*, 1979; Walter and Ebert, 1979; Urbina and Azavache, 1984) y por Acetil-CoA (Urbina and Azavache, 1984). Los resultados de inhibición son consistentes con un rol catabólico para la enzima de *T. cruzi*, siendo inhibida por la carga energética de la célula.

Los estudios acerca de los efectos de los inhibidores de grupos sulfhidrilos, mostraron que la enzima fue inhibida por fluoresceín mercuriacetato (FMA), NEM, pCMB, IBz, DTNB e iodoacetamida. La inhibición fue casi total y esta enzima se presenta como una de las más sensibles a estos inhibidores estudiadas hasta el momento (Cazzulo *et al.*, 1980). La GluDH-NAD es más sensible a la acción de la suramina que la enzima de mamíferos. No se encontraron grandes variaciones de la actividad específica de esta enzima durante el crecimiento o durante la incubación con L-glutamato. Su actividad solo se ve incrementada al final de la fase exponencial del crecimiento, cuando los aminoácidos están siendo consumidos y se produce amoníaco (Cazzulo *et al.*, 1985). Se determinó una doble localización subcelular de esta enzima en la mitocondria y el citoplasma (Duschak and Cazzulo, 1991).

La glutamato dehidrogenasa-NADP dependiente (GluDH-NADP)

La presencia de la enzima glutamato dehidrogenasa-NADP dependiente fue informada por Cazzulo *et al.* (1977) en cultivos de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*.

La enzima es un hexámero de subunidades idénticas y el peso molecular de la forma nativa, estimado por filtración en gel (Sephadex G 200) es de 315 kDa. Por SDS-PAGE cada subunidad presenta un peso molecular de 52 kDa (Juan, 1979).

La GluDH-NADP fue purificada a homogeneidad proteica utilizando un protocolo que consistió en una precipitación del extracto crudo con sulfato de amonio, luego una columna de Sephadex G-200, seguida por una DEAE-celulosa y finalmente una columna de hidroxilapatita. Utilizando este protocolo se logró purificar a la enzima 54 veces con un rendimiento del 8,6%.

La enzima purificada fue específica para NADP, mostrando con NADH una actividad máxima solo del 2% de la actividad con NADPH.

El valor de pH óptimo para la reacción en el sentido de la aminación reductiva fue de 7,1 y en el sentido de la desaminación oxidativa de 8,1. La actividad de la enzima no se ve afectada por AMP, ADP o ATP en concentraciones hasta 1 mM, a diferencia de la enzima inespecífica de mamíferos.

La enzima de *T. cruzi* es estable a 4°C en presencia de amortiguador Tris-ClH o fosfato, en cambio se conoce que la enzima inespecífica de mamíferos se inactiva en presencia de amortiguador Tris-ClH. La curva de efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática, indicó una “temperatura óptima” de 42°C (Juan, 1979).

Al estudiar el efecto de las sales sobre la actividad de la enzima en ambas direcciones de la reacción, se vió que tanto el KCl como el NaCl, en presencia de NH_4Cl a pH 7 provocan una activación del 50% en la actividad a una concentración de 50mM, en cambio concentraciones mayores resultan inhibitorias. El efecto activante solo se aprecia a moderadas concentraciones de NH_4Cl , sugiriendo que este compuesto podría estar actuando como sustrato y como activador (Juan *et al.*, 1978).

En la tabla 4 se detallan los valores de K_m aparentes para los sustratos en ambas direcciones de la reacción en forma comparada con la GluDH-NAD dependiente. Los productos de la reacción actúan como inhibidores en ambas direcciones.

Los estudios acerca de los efectos de los inhibidores de grupos sulfhidrilos, indicaron que la enzima es inhibida por NEM, pCMB, IBz, DTNB, iodoacetato e iodoacetamida. La inhibición en ningún caso es total y además, los inhibidores son muy poco efectivos cuando la enzima es preincubada con los sustratos y coenzimas a 0°C (Juan *et al.*, 1979a). Los experimentos de inhibición secuencial mostraron que las inhibiciones son independientes entre sí, sugiriendo que los grupos tioles involucrados son diferentes.

La ausencia de una inhibición total usando cantidades excesivas de inhibidores indicaría que los grupos sulfhidrilos involucrados no son esenciales para la catálisis aunque la presencia del inhibidor induce cambios conformacionales o interferencia estérica provocando una disminución en la actividad enzimática (Juan *et al.*, 1979a). La enzima de *T. cruzi* es más sensible a los inhibidores que la misma enzima en mamíferos. El nitrato de plata es un fuerte inhibidor de la enzima (Juan *et al.*, 1979b).

Orellano *et al.* (1985) indicaron la presencia de aminoácidos ácidos (L-aspartato ó L-glutamato) y arginina en el sitio activo, por estudios de inactivación realizados con agentes específicos para grupos carboxilo (Reactivo de Woodward) y para arginina (fenilglioxal). La inhibición competitiva por Cibacron Blue indicó que la GluDH-NADP de *T. cruzi* presenta en su sitio activo el dominio de unión a nucleótido característico de otras dehidrogenasas. La droga tripanocida suramina inhibe a la GluDH-NADP bastante menos que a la GluDH-NAD dependiente y a la inespecífica de coenzima de los mamíferos.

La GluDH-NADP de *T. cruzi* incrementa su actividad cuando hay glutamato presente en el medio de cultivo, lo cual sugeriría un rol catabólico para la enzima, aunque también se ha propuesto un rol indirectamente biosintético, a través de la provisión del NADPH para los procesos biosintéticos en aquellas condiciones en que las enzimas como la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa y la 6-fosfogluconato dehidrogenasa se encuentran poco activas

por falta de sustrato. Así, la enzima tendría un papel catabólico en cuanto a los aminoácidos en sí mismos, en la asimilación del nitrógeno del medio y, un papel anabólico en cuanto al metabolismo del parásito como un todo.

La localización intracelular de la GluDH-NADP de *T. cruzi*, fue determinada por Duschak y Cazzulo (1991) tanto en la mitocondria como en el citoplasma e incluso se propuso una tercera localización aún no determinada. La localización citoplasmática coincide con la determinada por Souto-Padrón *et al.* (1990) a través de ensayos de inmuno microscopía electrónica.

Esta enzima es muy similar a la correspondiente de *E. coli* en cuanto a composición de aminoácidos y secuencia del extremo N-terminal. De dicho extremo, 33 aminoácidos presentaron una identidad del 65% con la enzima de *E. coli* (Cazzulo *et al.*, 1988b).

	GluDH-NAD	GluDH-NADP
NADH	0.16 mM	-
NADPH	-	4 μ M
α -oxoglutarato	3.8 mM	1.8 mM
CINH ₄	18 mM	8.7 mM
NAD	1.4 mM	-
NADP	-	22 μ M
L-glutamato	11 mM	1.5 mM

Tabla 4: Km para cada sustrato de las enzimas GluDH-NAD y NADP dependientes de *T. cruzi*. (Cazzulo *et al.*, 1977; 1979).

Objetivos

Objetivos

Para completar la información estructural con la que se cuenta acerca de la glutamato dehidrogenasa NADP dependiente (GluDH-NADP) de *T. cruzi*, hemos realizado una serie de experimentos con los siguientes objetivos:

- Purificación de cantidades sustanciales de enzima (del orden de 20-30 mg) aumentando la escala y purificación de la preparación enzimática en menor número de pasos.

- Tratamiento de la GluDH-NADP purificada por degradación controlada con métodos químicos y/o enzimáticos para el aislamiento, purificación y posterior secuenciación de los péptidos obtenidos.

Un gran número de GluDHs con diferente especificidad para coenzima han sido secuenciadas de los más variados organismos. Los resultados de la comparación de dichas secuencias, mostraron una gran conservación entre las GluDH-NADP dependientes. A pesar de lo expuesto, la única secuencia disponible correspondiente a una enzima de protozoos es la GluDH-NADP del eucarionte primitivo *Giardia intestinalis* que presenta alta homología con la enzima de *E. coli*. Los Trypanosomátidos también son organismos muy primitivos, y a pesar de ello algunas de sus enzimas ya secuenciadas muestran mayor similitud a aquellas correspondientes a plantas o mamíferos.

En este sentido, es interesante agregar la GluDH-NADP de *T. cruzi* a la comparación antes mencionada, debido a que sorprendentemente, datos previos indican una importante homología en la secuencia peptídica de la zona N-terminal de proteína de *T. cruzi* en comparación con la de *E. coli*. Por esta razón se programaron los siguientes experimentos:

- Clonado del gen que codifica para la enzima, a través de un rastreo inmunológico y de la utilización de oligonucleótidos iniciadores sintetizados según las secuencias peptídicas obtenidas. Secuenciación del gen y comparación de su secuencia con la de otros organismos.

-Estudios sobre la organización genómica del gen. Estos resultados junto con los obtenidos del clonado y secuenciación, nos permitirán determinar la posible presencia de genes diferentes, codificando isoformas de la enzima con destinos subcelulares distintos.

-Estudio de la expresión de la proteína y el ARNm en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito, los cuales viven en ambientes nutricionales muy diferentes.

-Expresión de la GluDH-NADP recombinante en la bacteria *E. coli*. Purificación y comparación de las propiedades cinéticas de la enzima natural y la forma recombinante.

-Identificación de posibles isoformas de la GluDH-NADP.

Materiales y Métodos

Medios de cultivo para parásitos.

Los medios de cultivo utilizados para la obtención de los parásitos son los siguientes:

BHT, para *T. cruzi* y *Leishmania mexicana* (por litro: infusión cerebro corazón 33 gr; triptosa 3 gr; Na₂HPO₄ 32 gr; KCl 0,4 gr; glucosa 0,3 gr; hemina 20 mg; pH 7,2-7,4). El pH final del medio es 7,5 y no necesita ser ajustado. Se esteriliza durante 10 minutos a 121°C y se adiciona suero fetal bovino 10% v/v, previamente inactivado a 56°C durante 45 minutos, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml (Cazzulo *et al.*, 1985).

Medio para crecer *Crithidia fasciculata* (por litro): infusión de hígado 5 gr; proteosa-peptona 7,5 gr; infusión cerebro-corazón 7,5 gr; NaCl 5 gr; KCl 2 gr; ácido ascórbico 0,2 gr; NaH₂PO₄ 0,5 gr; MgSO₄.7H₂O 0,5 gr; sacarosa 2,5 gr; MOPS 0,5 gr y hemina 0,02 gr (pH 6,7-7,2) (Bacchi *et al.*, 1974). Se esteriliza durante 20 minutos a 1 atmósfera.

Las células Vero infectadas en monocapa para la obtención de los trypomastigotes y amastigotes son cultivadas en medio MEM (MEM: GIBCO BRL, cat 11935).

Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias y bacteriófagos.

Medio rico (líquido):

LB (Luria-Bertoni): Bacto triptona 10 gr, Extracto de levadura 5 gr y ClNa 10 gr en 1 litro de agua destilada. El pH es ajustado a 7,5 con NaOH 1N.

Medio rico (sólido):

Placas de LB agar: Al medio descrito anteriormente se le agrega 15 gr de agar por cada litro de medio de cultivo.

Los medios de cultivo se esterilizan en autoclave 15 minutos a 1,5 atmósferas.

Aditivos.

Antibióticos:

ampicilina, 100 µg/ml

penicilina, 100 U/ml

estreptomycin 100 µg/ml

Para la selección de bacterias se utiliza ampicilina trihidrato. Se prepara una solución madre de ampicilina de 100 mg/ml en agua destilada, y se esteriliza por filtración a través de una membrana Millipore de 0.44 mm de poro y se conserva a -20°C. Esta solución se agrega a los medios de cultivo en una concentración final de 50-100 µg/ml.

Galactósidos:

X-Gal, 40 µg/ml

IPTG, 0,1mM

Top agar.

LB top agar/litro: triptona 10 gr, extracto de levadura 5 gr, NaCl 5 gr, agar 7 gr.

LB top agarosa/litro: triptona 10 gr, NaCl 8 gr, agarosa 6 gr.

Reactivos y compuestos radiactivos.

Las resinas DEAE-celulosa y Blue-Sepharose son de Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.

Los marcadores de peso molecular y los reactivos: NADH, NADPH, NAD, NADP, DTT, seroalbúmina bovina, son de Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA.

Los reactivos necesarios para la secuenciación de péptidos se obtienen de Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.

L-glutamato es un reactivo de Boehringer Mannheim.

El αKG proviene de The British Drug Houses (Poole, England).

Todos los compuestos radiactivos son adquiridos en New England Nuclear (NEN) Research Products Boston, MA. El [α³²P] dCTP se encuentra en solución acuosa, en una concentración de 10 mCi/ml con una actividad específica de 3000 Ci/mmol. Se utiliza para la preparación de sondas por "Random priming".

El [α³⁵S] dATP es usado en las reacciones de secuenciación de ADN con una actividad específica de 1250 Ci/mmol.

Trypanosomátidos no patógenos.

Los precultivos del parásito *C. fasciculata* (ATCC 11745, cedido por el Dr. S. H. Hutner, Haskins Laboratories of Pace University, New York, Estados Unidos) se desarrollan a 28°C durante 48 horas y son utilizados para inocular frascos Roux conteniendo medio de cultivo para Crithidias, pero sin el agregado de suero y crecidos a la misma temperatura. Se cosechan en fase estacionaria por centrifugación a 7500 rpm y se lavan las células tres veces con una solución de sacarosa 0,25M y KCl 5mM conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 2mM y TLCK 1mM), para luego congelarse a -20°C.

Trypanosomátidos patógenos.

Trypanosoma cruzi cepa Tulahuén (población Tul2), fue cedida por la Dra. Elsa L. Segura, Instituto Fatale Chabén, Buenos Aires, Argentina, proveniente de un aislamiento original a partir de un triatomineo de Chile.

La forma epimastigote se cultiva sin agitación a 28°C en el medio BHT. Se cosechan, lavan y congelan en las mismas condiciones que *Crithidia fasciculata*.

La cepa RA fue cedida por la Dra. Stella Maris González Cappa, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina, aislada en la provincia de La Pampa, Argentina, en 1978, de un paciente con infección aguda.

Los clones Tul10, Sylvio X10/7, HO3/5, CanIII, NIH, YIE9, YIE10, CA-I/72 y CA-I/72hdna fueron cedidos por el Dr. J.A. Dvorak, NIAID, NIH, Bethesda, MD., USA.

Los trypomastigotes metacíclicos son generados por diferenciación espontánea a partir de epimastigotes de la cepa RA y del clon Sylvio X-10/7, crecidos en cultivos axénicos en medio BHT. Para obtenerlos puros es necesario separarlos de las formas de las cuales provienen. Con este fin, los cultivos se centrifugan a 7000 g durante 10 minutos, se resuspenden en un amortiguador fosfato de pH 8 y finalmente son pasados a través de una columna de "Anion exchange cellulose Cellex-D" equilibrada en el mismo amortiguador. Los trypomastigotes metacíclicos son los primeros en eluir luego de aplicar un amortiguador TAU (por litro: NaCl 11,1 gr; KCl 0,93 gr; CaCl₂ 0,22 gr; MgCl₂ 0,19 gr; NaH₂PO₄ 27,8 gr;

Na₂HPO₄.7H₂O 53,65 gr; rojo de fenol 5 mg; pH 6,6). La pureza de los parásitos obtenidos se determina por observación al microscopio óptico con 400 aumentos (De Sousa, 1983; Franke de Cazzulo, comunicación personal).

Las formas trypomastigote y amastigote de la cepa RA se obtienen a partir de monocapas de células Vero infectadas en medio MEM (MEM: GIBCO BRL, cat 11935) suplementado con suero fetal bovino 10% sin inactivar.

Para obtener trypomastigotes puros se centrifuga el material cuidando de evitar la salida de los amastigotes por ruptura de las células Vero (Carvalho and De Sousa, 1983). Luego de ser cosechados, se pueden lograr trypomastigotes esencialmente libres de restos celulares dejándolos salir del precipitado para llegar hasta la superficie del medio de resuspensión incubándolos a 37°C durante una hora.

Para la obtención de amastigotes se sobreinfectan monocapas de células Vero para evitar la diferenciación a trypomastigotes y se cosechan una vez que las células se rompen. Los amastigotes pueden encontrarse contaminados con restos celulares que no interfieren en los ensayos enzimáticos.

La forma epimastigote de *Trypanosoma rangeli* se obtiene de la misma forma que los epimastigotes de la cepa Tul2 de *Trypanosoma cruzi*.

El parásito *L. mexicana* fue cedido por el Dr. R. Zeledón, Universidad Nacional, Campus Omar Dendo, Heredia, Costa Rica.

Los promastigotes se cultivan, cosechan, lavan y congelan en iguales condiciones que *C. fasciculata* y *T. cruzi*.

Recuento de los parásitos.

Se realiza en cámaras de Neubauer en solución fisiológica conteniendo formaldehído al 1%, que provoca la muerte de los parásitos.

Cepas bacterianas.

Las cepas utilizadas corresponden a la familia de *E. coli* K-12 y sus genotipos son los siguientes:

HB-101: F⁻ Δ (gpt-proA)62 leuB6 supE44 ara-14 galK2 lacY1 Δ (mcrC-mrr) rpsL20(Str^r) xyl-5 mtl-1 recA13 (Sambrook *et al.*, 1989; Boyer and Roulland-Dussoix, 1969).

Y1090: F⁻ Δ (lac)U169 lon-100 araD139 rpsL(Str^r) supF mcrA trpC22::Tn10 (pMC9; Tet^rAmp^r) (Huynh *et al.*, 1985; Maurizi *et al.*, 1985).

Nova Blue: endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proA⁺B⁺ lacI^{qZ} Δ M15::Tn10 (tet^R)].

BL21: F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm.

BL21(DE3): F⁻ ompT [lon] hsdS_B (r_B⁻m_B⁻; an *E. coli* B strain) gal (DE3) dcm. Con DE3, un profago de λ llevando el gen de la ARN polimerasa de T7.

BL21(DE3)PLys: F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal (DE3) dcm pLysS, (cam^R).

BL26: F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm lac. Derivado lac Z de las células BL21 (Catálogo de Novagen, Inc. Madison, WI, USA).

Purificación de la glutamato dehidrogenasa NADP dependiente (GluDH-NADP) de *Trypanosoma cruzi*.

La enzima se purifica a partir de epimastigotes de la cepa Tul2 de *T. cruzi* empleando una modificación del método previamente descrito (Cazzulo *et al.*, 1988b).

Obtención del extracto crudo.

Para la preparación del homogenato, los epimastigotes de la cepa Tul2 son previamente sometidos a 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento y resuspendidos en sacarosa 0,25M, KCl 5mM (Cazzulo *et al.*, 1989a). La preparación se centrifuga a 7000 rpm durante 10 minutos, obteniéndose un sobrenadante turbio y un precipitado. Se separa el sobrenadante y se lava el precipitado con la misma solución y se vuelve a centrifugar durante 10 minutos a 14000 rpm recuperándose un nuevo sobrenadante. El extracto crudo se obtiene por centrifugación de ambos sobrenadantes a 43000 g durante 30 minutos.

Fraccionamiento salino.

El extracto crudo se lleva a 50% de saturación con una solución saturada de SO₄(NH₄)₂ en baño de hielo a 0°C. La suspensión se centrifuga a 30000 g durante 30 minutos. El precipitado obtenido, redisolto, no presenta actividad de GluDH-NADP.

El sobrenadante se lleva luego a 75% de saturación con la misma solución de sulfato de amonio y se centrifuga a 12000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido tampoco presenta actividad. El precipitado, que contiene la actividad de GluDH, se redissuelve en K_2HPO_4 10mM, EDTA 1mM pH 7; habitualmente contiene un 90% de la actividad del extracto crudo. Dicho material se dializa exhaustivamente contra el amortiguador mencionado.

Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

El material activo del paso anterior es filtrado a través de una columna de intercambio aniónico en DEAE-celulosa de 15 cm x 1,5 cm equilibrada con un amortiguador K_2HPO_4 10mM, EDTA 1mM pH 7. La columna es armada y corrida en cámara fría a 4°C con una velocidad de flujo de 17,5 ml/hora, recogiendo fracciones de 3,5 ml cada una.

Habitualmente la GluDH-NADP no es retenida por la resina, a diferencia de muchas impurezas. En los casos raros en que fue retenida, se la eluyó con ClK 5-10mM agregado al amortiguador de corrida. Finalmente se reúnen las fracciones con mayor actividad enzimática.

Cromatografía de afinidad en Blue Sepharose CL-6B (Cibacron blue F3G-A).

La propiedad de estas columnas es que tienen la capacidad de unir proteínas, incluyendo kinasas y dehidrogenasas, tanto que usen NAD o NADP como cofactor.

Las fracciones con mayor actividad provenientes del paso anterior son dializadas durante la noche contra el amortiguador Tris-ClH 50mM pH 7,6, conteniendo ClNa 50mM e incubadas antes de sembrarlas en la columna con β -mercaptoetanol 1mM durante 30 minutos a temperatura ambiente para mantener la actividad.

El material se aplica en una columna de Blue Sepharose (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) de 15 cm x 1,5 cm equilibrada con el amortiguador antes mencionado, recogándose fracciones de 1 ml. Se miden actividad y proteínas en todas las fracciones desde el momento de la siembra. Luego de lavarla exhaustivamente, se realiza la elución con el mismo amortiguador conteniendo NADP 2mM. Se deja durante 30 minutos la columna cerrada con el eluyente para favorecer la interacción y el despegado de la enzima. Una vez finalizados cada uno de los pasos de purificación, las fracciones activas son controladas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Determinación de la actividad enzimática de la GluDH-NADP.

Las medidas de actividad se realizan en un espectrofotómetro Beckman Model 26 (USA) con registrador automático, a temperatura ambiente, en un volumen final de 1 ml.

La actividad de GluDH-NADP y de GluDH-NAD dependientes se determina por la oxidación de NADPH y NADH respectivamente, seguida por la disminución de la absorbancia a 340 nm.

La mezcla de reacción, en el sentido de la aminación reductiva, contiene: Tris-acetato 50mM pH 6,7; CINH_4 90mM; NADPH 0,15mM; αKG 2,5mM y en el sentido de la desaminación contiene: Tris-ClH 50mM pH 7,6; L-glutamato 10mM; NADP 0,25mM.

Para determinar la actividad de la GluDH-NAD dependiente, la mezcla de reacción contiene: Tris-acetato 50mM pH 8; NADH 0,125mM; CINH_4 90mM; αKG 2,5mM.

Todas las reacciones se inician con el agregado de la enzima.

Podemos definir una unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de coenzima por minuto a 25°C (Juan *et al.*, 1978).

Determinación de los valores de K_m .

Con la enzima recombinante purificada, se determinan los valores de K_m para poder compararlos con los de la enzima natural.

Se hacen diluciones de la enzima recombinante para elegir la condición óptima de trabajo. Usando concentraciones saturantes de todos los sustratos menos uno (sustrato en concentraciones variables) y con 30 μl de una dilución 1:100 de la enzima recombinante, se calcula la velocidad inicial de la reacción. Las condiciones de medida de las reacciones son semejantes a las detalladas para la enzima nativa. Las constantes cinéticas aparentes fueron determinadas usando un programa de computadora, ajustando los datos a una hipérbola aplicando el algoritmo de Gauss-Newton (Fraser and Suzuki, 1973).

Determinación de la concentración de proteínas.

El dosaje de proteínas se realiza colorimétricamente por el método de Lowry *et al.* (1951) o el método de Bradford (1976), durante el protocolo de purificación. Los perfiles de elución proteicos de las columnas fueron seguidos por medición de la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro Beckman Model 26 (USA), excepto en la cromatografía de afinidad luego de la adición de NADP.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Se utilizan geles al 10% según la técnica desarrollada por Laemmli (1970), en minigeles de 8 cm x 7 cm x 0,5 mm. El amortiguador de corrida (5X) contiene Tris base 0,125M, glicina 0,96M y SDS 5% pH 8,3 y el amortiguador de siembra (5X) está compuesto por glicerol 50%, SDS 10%, DTT 0,1M, Tris-ClH 0,4M pH 6,8 y azul de bromofenol.

La corrida electroforética en este sistema se lleva a cabo a 100 V en el amortiguador previamente mencionado (1X), a temperatura ambiente y se da por terminada cuando el indicador llega al borde inferior del gel.

En caso de ser necesario, el material se concentra con polietilenglicol (PEG 6000) previo a la corrida electroforética.

Electroforesis en geles de poliacrilamida sin SDS.

El protocolo a realizar es básicamente el mismo, en ausencia de SDS durante el armado del gel y en los amortiguadores de siembra y corrida.

Tinción de proteínas en el gel.

Tinción con Coomassie Brilliant Blue.

Los minigeles son teñidos con Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2 %, metanol 50%, ácido acético 7%), durante 30 minutos a temperatura ambiente ó por 45 minutos a 50°C, con agitación. Se destiñen por difusión en una solución acuosa conteniendo metanol 20% y ácido acético 10%, a temperatura ambiente. El límite de detección del método es del orden de los microgramos.

Tinción con nitrato de plata.

Este método de tinción es más sensible que el tratamiento con Coomassie Blue ya que permite detectar nanogramos de proteína.

Para ello, los minigeles se sumergen en una solución de metanol 50%, ácido acético 10% durante 15 minutos con agitación y luego en una solución de metanol 7%, ácido acético 5%, por el mismo lapso de tiempo. Se lavan en agua destilada durante 5 minutos y se fijan en glutaraldehído 10% por 20 minutos. Luego se lavan exhaustivamente con agua destilada en lavados sucesivos durante aproximadamente 1 hora y se sumergen en una solución de nitrato de plata (1,9 ml NaOH 1N, 1,4 ml NH₃, 17,7 ml agua destilada, 4 ml NO₃Ag 20%

y agua destilada hasta completar 100 ml, colocando los reactivos en ese orden) durante 10 minutos. Se vuelven a lavar y se revelan con una solución que contiene 100 µl de ácido cítrico 50 mg/ml y 50 µl de formaldehído al 38% en un volumen final de 100 ml. Para detener el revelado se lavan varias veces con agua destilada para eliminar los restos del revelador y finalmente se fijan con el agregado de 10 µl de ácido acético puro. Todos los pasos requieren agitación (Oakley *et al.*, 1980).

Western blot e inmunodetección.

Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.

Finalizada la electroforesis (SDS-PAGE), los minigeles se sumergen, para equilibrarlos, en un amortiguador Tris base 25mM, glicina 192mM, metanol 20% durante 10 minutos. La electrotransferencia de las proteínas del gel a membranas de nitrocelulosa se realiza durante 2 horas a 150 mA usando el mismo amortiguador. Al finalizar dicho proceso se retiran los filtros y se dejan secar al aire (Burnette, 1981).

Revelado de filtros conteniendo extractos y proteínas purificadas, con sueros y fosfatasa alcalina.

Las membranas de nitrocelulosa conteniendo las proteínas electrotransferidas se lavan por 5 minutos con TBS (Tris-ClH 50mM pH 7,6, NaCl 150mM). Luego se sumergen en una solución bloqueante que contiene TBS, leche en polvo descremada 3% y glicina 2%, durante 30 minutos. Pasado ese tiempo se incuban por 90 minutos con el suero anti-GluDH obtenido en conejo y diluido 1/1500 en TBS leche. Se hacen varios lavados de 15 minutos con TBS, y luego uno de 10 minutos con TBS conteniendo Nonidet P-40 0,05% y finalmente varios lavados de 10 minutos con TBS.

Se incuba durante 1 hora con un suero comercial anti-IgG de conejo obtenido en cabra (diluido 1:5000-7000 en TBS con leche descremada y glicina), conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. Se hacen varios lavados con TBS, uno con TBS conteniendo Nonidet P-40 0,1% y varios lavados con TBS. Luego, los filtros son equilibrados en un amortiguador para fosfatasa alcalina que contiene Tris ClH 0,1M pH 9,5; NaCl 0,1M y MgCl₂ 0,05M.

Para el revelado, se sumergen en el mismo amortiguador que además lleva los sustratos de la fosfatasa alcalina: 100 µl BCIP (15 mg en 1 ml de dimetilformamida) y 100 µl de NBT (30 mg en 1 ml de formamida 70%). La reacción se detiene sumergiendo los filtros en agua destilada y luego se dejan secar sobre papel de filtro. (Mc Gadey, 1970).

Sueros.

El antisuero contra la GluDH-NADP dependiente se obtiene en conejo a través de la inyección intramuscular de 50 µg de proteína purificada resuspendida en 1 ml de PBS (amortiguador fosfato salino), emulsionada 1:1 v/v con adyuvante completo de Freund (GIBCO). Se aplican luego 3 dosis en forma subcutánea, pero emulsionadas con adyuvante incompleto de Freund (GIBCO), con intervalos de 30 días. Se verifica la especificidad del antisuero policlonal monoespecífico preparado, a través del método de Outcherlony, resultando una banda única al enfrentarlo con un extracto libre de células de *T. cruzi* (Campetella *et al.*, 1990).

Secuenciación de la proteína.

Reducción y piridiletilación de la GluDH-NADP.

La GluDH-NADP dependiente purificada fue sometida a degradación controlada por métodos químicos y/o enzimáticos para el aislamiento, purificación y secuenciación de los péptidos obtenidos.

Se parte de aproximadamente 1,4 mg de la proteína purificada a homogeneidad y completamente desecada. Se resuspende en un volumen de 180 µl de Guanidina-HCl 6M; Tris-ClH 0,25M pH 8,5; EDTA 1mM, se agregan 20 µl de DTT 5mg/ml (preparado en el momento) y se incuba 1 hora a 45°C. Luego se le agrega 4-vinilpiridina y se incuba durante 1 hora a la misma temperatura (Renlund *et al.*, 1990). Finalmente la muestra se desala por HPLC en una columna Vydac C₄ de 250 x 4,6 mm, corrida con un gradiente de acetonitrilo 0-80% (v/v), TFA 0,12%, a una velocidad de flujo de 1ml/min (Matsudaira, 1989).

Clivaje en residuos metionina con BrCN.

Se parte de 200 µg de la proteína reducida y piridiletilada en 200 µl de ácido fórmico al 70% (v/v). Se le agrega el BrCN en un exceso molar de 50 veces (100 µg) también disuelto en ácido fórmico 70% (v/v). Se incuba en oscuridad a temperatura ambiente durante 24 horas. Finalmente se diluye la muestra con agua destilada y se seca por centrifugación en un desecador con rotación Speed VacTM (Savant Instruments). Se repite la misma operación varias veces.

Los fragmentos obtenidos se separan a través de un gel de poliacrilamida con SDS al 15% o por un SDS-PAGE High Density-20% corrido en el Phast System™ Gel (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), transfiriéndolos luego a membranas de PVDF (Immobilon) para secuenciación de los péptidos (Matsudaira, 1989).

Para la transferencia la membrana se activa sumergiéndola en metanol por varios segundos. Se remueve el gel de la electroforesis SDS-PAGE 15% y se sumerge en el amortiguador de la electrotransferencia (CAPS 1X: 10mM pH 11 en metanol 10%) por 5 minutos. La transferencia se realiza a 150 mA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se saca la membrana y se lava con agua deionizada.

Para identificar las bandas proteicas se satura la membrana con metanol 100% durante unos pocos segundos y se realiza la tinción con Coomassie Blue R-250 0,1% preparado en metanol 40%, ácido acético 1%. Las bandas proteicas aparecen aproximadamente al minuto de la tinción. Se destiñe con metanol 50%. Finalmente se lava exhaustivamente con agua deionizada y se deja secar para luego cortar la/las bandas de interés para secuenciar (Matsudaira, 1989).

Digestión triptica.

Se dializan aproximadamente 100 µg de la proteína reducida y piridiletilada contra bicarbonato de amonio 0,1M durante toda la noche a 4°C. La digestión con tripsina se realiza en el mismo amortiguador en presencia de urea 2M, en una relación 1:25 (tripsina: GluDH-NADP). Se incuba por 48 horas a 37°C. Se centrifuga a 10000 rpm por 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf y se acidifica el sobrenadante con TFA. Los péptidos son separados por HPLC en una columna Vydac C₁₈ de 250 x 4,6 mm, corrida con un gradiente de acetonitrilo 0-70% (v/v), TFA 0,1%, a una velocidad de flujo de 0,8ml/min.

Digestión con las endopeptidasas Lys-C y Arg-C.

Para los tratamientos enzimáticos se elige la proteinasa de *Achromobacter sp* (especificidad por Lys-X-) y la arginilendopeptidasa Arg-C (especificidad por Arg-X-).

El protocolo para ambos tratamientos es similar: se resuspenden 100 µg de la proteína reducida y piridiletilada en 150 µl de Urea 2M; NH₄HCO₃ 0,1M y se incuba con Lys-C durante 24 horas a 37°C ó con Arg-C durante 6 a 8 horas a 37°C, en una relación 1:100 (proteínasa: GluDH-NADP).

Los péptidos obtenidos en dichas hidrólisis fueron separados y purificados por HPLC en fase reversa (columnas C₄ a C₁₈ eluidas con un gradiente de acetonitrilo y ácido trifluoroacético 0,1%) (Matsudaira, 1989).

Secuenciación.

Los péptidos seleccionados de la digestión con BrCN y transferidos a membranas de PVDF, como así también los obtenidos de las digestiones con Arg-C y Lys-C son secuenciados en un secuenciador automático en fase gaseosa Applied Biosystems Model 477 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) corrido de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo en el LANAIS-Pro, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA/CONICET.

En cambio, los péptidos obtenidos de la digestión con tripsina fueron secuenciados por el Dr. Ulf Hellman, en el Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala Branch, Uppsala, Suecia, utilizando un equipo similar.

Clonado del gen de la GluDH-NADP de *Trypanosoma cruzi*.

Preparación de bacterias *E. coli* Y1090 para la infección con fagos.

Se inoculan 50 ml de medio de cultivo LB-ampicilina (50 µg/ml), suplementado con maltosa 0,2% con una colonia de bacterias *E. coli* Y1090. El cultivo se crece durante toda la noche con agitación a 37°C.

Al día siguiente las células son centrifugadas a 3000-4000 rpm durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Luego de descartar el sobrenadante, las bacterias se colocan en hielo y se resuspenden en 20 ml de SO₄Mg 10mM estéril y frío. Este material sirve como stock de células durante dos semanas mantenidas a 4°C (Sambrook *et al.*, 1989).

Titulación de una biblioteca genómica.

Se preparan cajas de Petri de 85 mm de diámetro, conteniendo aproximadamente 30 ml de medio LB-agar 1.5% y ampicilina 100 µg/ml. Por otro lado se prepara el top agarosa (LB agarosa 0.7% suplementado con SO₄Mg 10mM) que debe permanecer líquido a baño maría a 50°C hasta su uso.

Se toman en condiciones estériles 3 ml de top agarosa y se le agregan 150 µl de bacterias Y1090, se mezcla y se vuelcan rápidamente sobre las placas conteniendo LB-agar sólido. Cuando el top está firme, se invierten las placas y se dejan secar a 37°C durante 30 minutos.

Se preparan diluciones seriadas de la mezcla de los fagos de la biblioteca en medio SM (NaCl 100mM; SO₄Mg.7H₂O 8,1mM; Tris HCl 50mM pH 7,5 y gelatina 0,01%). Se siembran 5 µl de cada dilución sobre el top agarosa, bien separadas y comenzando desde la dilución más grande. Se incuban las placas invertidas toda la noche a 42°C.

Las placas de lisis comienzan a aparecer luego de 8 horas y pueden ser contadas ó picadas luego de 12 a 16 horas de incubación (Sambrook *et al.*, 1989).

Cálculo del título:
$$\frac{N \times f}{5\mu\text{l (vol sembrado de cada dilución)}}$$

N= N° de placas de lisis

f= factor de dilución en el que se contaron las placas de lisis.

El valor obtenido se multiplica por 10^3 para referirlo en ufp/ml.

Rastreo inmunológico de una biblioteca genómica de *Trypanosoma cruzi* en λ gt11.

Para clonar el gen de la GluDH-NADP de *Trypanosoma cruzi* se parte de una biblioteca genómica en λ gt11 conteniendo ADN genómico de la cepa Miranda 76 de *T. cruzi* (Ibáñez *et al.*, 1987). El fago λ gt11 es un vector que permite construir bibliotecas genómicas o de ADNc y luego dirigir la expresión de los fragmentos clonados. Dado que el genoma de *T. cruzi* no presenta intrones se pueden expresar genes a partir del ADN genómico.

Al expresar la proteína o un dominio de la misma como un polipéptido estable, pueden ser detectados por medio de un anticuerpo policlonal monoespecífico anti-GluDH-NADP (Huynh *et al.*, 1985).

Expresión de proteínas recombinantes en el fago λ gt11.

Se utilizan entre 10 y 12 placas de 300 mm de diámetro conteniendo LB-agar con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$. A 1 ml de bacterias *E. coli* Y1090 se le agregan 100 μl de fagos recombinantes de la biblioteca, conservados a 4°C y sin diluir en SM. Dado que el título de la biblioteca es de 10^6 ufp/ml se sembraron 10^5 fagos/placa de manera de rastrear 10^6 fagos totales, teniendo en cuenta que solo el 60-70% son recombinantes.

Para permitir la adsorción a las células, se incuban las bacterias y los fagos durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agrega la mezcla a 25 ml de top agarosa mantenido a 50°C y se vuelca el contenido en la caja de Petri de LB agar. Se incuban a 42°C hasta la aparición de las placas de lisis.

Como la expresión de las proteínas de fusión se encuentra bajo regulación del promotor del operón *lac*, se procede a la inducción embebiendo filtros de nitrocelulosa con IPTG 10mM en agua. Se dejan secar sobre un papel de filtro al aire y luego se apoyan sobre las placas de lisis. Se incuban 3-4 horas a 37°C y se guardan hasta su procesamiento con el suero correspondiente (Sambrook *et al.*, 1989).

Revelado del rastreo inmunológico.

Todos los pasos se realizan a temperatura ambiente y con agitación evitando que el filtro se seque. Durante el protocolo, se procede de la misma forma que para el revelado de un Western blot, utilizando como primer anticuerpo un policlonal anti GluDH-NADP preparado en conejo en una dilución 1/3000 y como segundo anticuerpo un suero comercial anti-Ig de conejo conjugado con fosfatasa alcalina.

Rastreo por hibridización de una biblioteca genómica de *Trypanosoma cruzi* en λ gt11.

Se utiliza la misma biblioteca de expresión genómica de la cepa Miranda 76 de *Trypanosoma cruzi* en el fago λ gt11 (Ibáñez *et al.*, 1987). El ADN de las partículas virales es transferido a un filtro de nitrocelulosa y aquellas que llevan el gen de la GluDH-NADP son identificadas por hibridización usando una sonda específica marcada radioactivamente.

Para el rastreo se utilizan 12 placas de Petri de 150 mm de diámetro conteniendo LB-agar con ampicilina 100 μ g/ml. Se mezclan 400 μ l de bacterias *E. coli* Y1090 con 17 μ l de fagos recombinantes de la biblioteca que contienen 10^5 fagos y se permite la adsorción por 20 minutos a temperatura ambiente. Se agrega a la mezcla 10 ml de top agarosa y se vuelca sobre la caja con LB-agar y se incuban a 42°C entre 10-12 horas. Luego se llevan a 4°C.

Los filtros de nylon se apoyan sobre la superficie del top agarosa para permitir el contacto directo con las placas de lisis. Luego de 30-60 segundos se retiran los filtros y con el ADN hacia arriba se sumergen en una solución de desnaturalización (NaCl 1,5M, NaOH 0,5M) por 5 minutos. Luego se transfieren a una solución de neutralización (NaCl 1,5M, Tris-HCl 0,5M pH 8) por 5 minutos y finalmente a una solución de SSC 2X (SSC 20X por litro: NaCl 175,3 gr, citrato de sodio 88,2 gr) por 5 minutos y se dejan secar.

Se fija el ADN por horneado a 80°C durante 2 horas. Se prehibridiza y finalmente, se hibridiza el ADN de los filtros al enfrentarlo con una sonda específica marcada con 32 P.

Luego de la autorradiografía, los fagos positivos detectados por una señal nítida son aislados y resuspendidos en SM con cloroformo.

Dicho procedimiento se repite varias veces hasta confirmar y aislar completamente los fagos que contienen el gen o una parte del mismo. En el segundo y tercer rastreo se plaquean 2000 fagos/placa y 200 fagos/placa respectivamente (Sambrook *et al.*, 1989).

Identificación, aislamiento y mantenimiento de los fagos positivos.

Teniendo en cuenta la orientación de los filtros, se identifican los fagos positivos por superposición.

Se coloca en un tubo eppendorf 1 ml de SM y una gota de cloroformo. Con la ayuda de una espátula esterilizada se corta con cuidado el top agarosa alrededor del fago positivo. En el caso de un rastreo primario, por la cercanía de los fagos, se secciona un grupo de 10-20 ufp. Se coloca dentro del eppendorf y se mantiene por 1-2 horas a temperatura ambiente para permitir que las partículas difundan de la agarosa. Se calcula el título en cada caso y se mantienen a 4°C en SM con cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989).

Aislamiento y purificación del ADN del fago λ .

Se pica una placa de lisis bien aislada de las demás en 1 ml de medio SM, con una gota de cloroformo. Se deja a 4°C por varias horas y luego, se mezclan 40 μ l de la suspensión de fagos (titulados) con 100 μ l de bacterias. Se incuban 20 minutos a 37°C y se les agrega 2,5 ml de top agarosa y se vuelca sobre una caja conteniendo LB agarosa-ampicilina. Se siembra una cantidad de fagos tal que puedan crecer a confluencia toda la noche a 37°C. Al día siguiente se les agrega 3 ml de medio SM para eluir los fagos a temperatura ambiente con agitación constante durante toda la noche. Se repite la operación con otros 3 ml. Luego, se transfiere el medio SM conteniendo los fagos a un tubo que se centrifuga a 8250 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante recuperado se trata con ARNasa y ADNasa 1 μ g/ml concentración final, incubando por 30 minutos a 37°C. Luego se le agrega un volumen de una solución de PEG 20% p/v y NaCl 2M en medio SM, incubando 1 hora en hielo y se centrifuga a 12000 rpm 1 hora a 4°C. Se remueve el sobrenadante por aspiración y se deja secar el precipitado, que contiene las partículas virales, por inversión del tubo. Se resuspenden las partículas en 500 μ l de SM con vortex y se les agrega 5 μ l de EDTA 0,5M pH 8 y 5 μ l de SDS 10%. Se incuba a 68°C durante 15 minutos. Luego se extrae el ADN una vez con fenol y luego con una mezcla de fenol:cloroformo en partes iguales y

finalmente con cloroformo:alcohol isoamílico. La fase acuosa final se precipita con un volumen de isopropanol y se lleva durante 20 minutos a -70°C. Se centrifuga a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el precipitado se lava con etanol 70%. Se deja secar y se resuspende en 50 µl de TE pH 8. Se determina la cantidad de ADN obtenido y se analiza por digestión con enzimas de restricción (Sambrook *et al.*, 1989).

Preparación y análisis de ADN.

Aislamiento y purificación de ADN de parásitos.

Los cultivos de los distintos parásitos se cosechan por centrifugación a 3000 g, durante 10 minutos a 4°C y se lavan tres veces con NaCl 0,154 M. El precipitado es resuspendido en una solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM pH 7,6; NaCl 100 mM y EDTA 100 mM. La suspensión obtenida se lisa por el agregado de SDS a una concentración final del 1% mezclando suavemente. Luego se incuba con Proteinasa K, 50 µg/ml durante 2 horas a 37°C agitando suavemente a intervalos de 15 minutos. Se agrega un volumen de fenol y se agita por inversión del tubo. Luego de centrifugar a 10000g por 5 minutos se extrae cuidadosamente el sobrenadante con pipeta Pasteur sin aspirar la interfase. Luego se extrae con un volumen de fenol:cloroformo en partes iguales y finalmente con cloroformo solo. El ADN nuclear se precipita por el agregado de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto ó 0,7 volúmenes de isopropanol. Se deja toda la noche a -20°C para favorecer la precipitación y luego se centrifuga a 12000 g, durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se descarta y el precipitado blancuzco se lava con etanol 70% y se seca. Puede conservarse así o resuspenderse en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 0,1 mM) (Sambrook *et al.*, 1989).

Minipreparación de ADN plasmídico.

Se transforman células competentes con el objeto de purificar el ADN plasmídico. Se toma con un ansa estéril una colonia aislada y se inoculan 3 ml de medio LB líquido conteniendo 3 µl de ampicilina (100 mg/ml). Se deja 9 a 15 horas a 37 °C con agitación. Posteriormente el cultivo se transfiere y centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos y el precipitado obtenido se resuspende en 0,3 ml de una solución P₁ (Tris-ClH 50mM pH 7,9; EDTA 10mM pH 8; ARNasa A 10 µg/ml libre de ADNasa).

Luego se le agregan 0,3 ml de la solución P₂ (NaOH 200mM; SDS 1%) se mezcla suavemente y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se adicionan 0,3 ml de la solución P₃ (acetato de potasio 2,55M pH 4,8) agitando inmediatamente por inversión del tubo. Al centrifugar a 15000 g durante 30 minutos a 4°C, se logra la separación del plásmido en el sobrenadante, que es precipitado con 0,7 volúmenes de isopropanol previamente equilibrado a temperatura ambiente. Se centrifuga a 15000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lava el ADN precipitado con etanol 70%. Finalmente se resuspende en agua o amortiguador TE y se mantiene a -20°C (Sambrook *et al.*, 1989; Birnboim and Doly, 1979).

Cuantificación de ADN.

Se diluyen 5 µl del ADN purificado en 1 ml de agua destilada. Se mide la absorbancia a 260 nm y se calcula la concentración sabiendo que 1 UDO corresponde aproximadamente a 33 µg/ml. Multiplicando el valor obtenido por el factor de dilución se obtiene el valor final (Sambrook *et al.*, 1989).

Electroforesis en geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN genómico o plasmídico se separan, identifican y purifican por electroforesis a través de geles de agarosa horizontales de distintos porcentajes, de acuerdo al tamaño de los fragmentos a separar y a la conformación de los mismos.

Los geles de agarosa se preparan y corren en TBE 1X (5X: Tris Base 5,4%; ácido bórico 2,75%; EDTA 2mM pH 8). Antes de armar el gel se le agrega bromuro de etidio en una concentración final de 0,5 µg/ml al igual que al amortiguador de corrida. Las muestras se mezclan con un amortiguador de siembra que contiene: glicerol 5-10%, sacarosa 7% y azul de bromofenol o xylene cyanol FF 0,25%. La electroforesis se realiza a 10 V/cm (Sambrook *et al.*, 1989).

La localización del ADN dentro del gel puede determinarse directamente por la fluorescencia inducida por la luz ultravioleta en el bromuro de etidio intercalado en las bases del ADN. Los geles son fotografiados por transiluminación con luz ultravioleta.

El ADN del fago ΦX174 digerido por la endonucleasa de restricción HaeIII (Sigma D-0672) y el ADN del fago λ digerido por HindIII (Sigma D-9780) son utilizados como marcadores de peso molecular cuyos tamaños en pares de bases son: ΦX174 HaeIII (490 µg/ml): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72.

λHindIII (286 µg/ml): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125.

También se utilizó una escalera conteniendo repeticiones de 100 pb (GIBCO-BRL) desde 100 hasta 1500 pb con un fragmento adicional de 2072 pb. La banda de 600 pb es dos o tres veces más intensa que las restantes de la escalera.

Electroforesis en campo pulsado (PFGE).

Las moléculas de ADN cuyos tamaños son mayores de 25 kpb no pueden resolverse en geles de agarosa convencionales, en cambio pueden separarse usando técnicas que cambian la dirección del campo eléctrico en el gel.

El ADN de las distintas formas y tipos de parásitos contenido en los bloques de agarosa es preparado como se indica en la bibliografía (Henriksson *et al.*, 1990). Los ensayos de PFGE y Southern blot se realizaron con los siguientes clones: Tul10, Sylvio X10/7, HO3/5, CanIII, NIH, YIE9, YIE10, CA-I/72 y CA-I/72hdna y los parásitos *T. rangeli*, *C. fasciculata* y *L. mexicana*. La electroforesis se realiza en un aparato BioRad CHEF Mapper (Henriksson *et al.*, 1995). Luego de la corrida el ADN es tratado con HCl, transferido a filtros de nylon e hibridizado con sondas marcadas radioactivamente en ensayos de Southern blot.

Obtención de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa ultrapura de bajo punto de fusión.

Debido a que la agarosa puede estar contaminada con sustancias que son potentes inhibidores de algunas enzimas (enzimas de restricción, ligasas, kinasas, polimerasas) que comunmente se usan durante el clonado, se utiliza agarosa ultrapura y de bajo punto de fusión. Esta agarosa gelifica a 30°C y se derrite a 65°C.

Con el objeto de recuperar y purificar solamente el ó los fragmentos de ADN de interés de forma simple, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa. El gel es armado en las condiciones ya mencionadas pero con agarosa de bajo punto de fusión y corrido en el mismo amortiguador a 4°C para evitar recalentamiento y fusión del gel durante la corrida. Finalizada la misma y una vez identificado el fragmento de interés, se corta la agarosa alrededor de la banda con un bisturí. Se coloca en un tubo eppendorf que contiene 5 volúmenes de amortiguador TE (Tris-ClH 10mM pH 7,5, EDTA 0,1mM) y se incuba a 65°C durante 15 minutos para fundir la agarosa. Luego se extrae el ADN con 1 volumen de fenol a temperatura ambiente y luego con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en partes iguales a la misma temperatura. Se precipita, lava y resuspende de la forma ya descripta.

Resolución y recuperación de pequeños fragmentos de ADN en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.

A través de una electroforesis en geles de poliacrilamida pueden separarse fragmentos pequeños de ADN (<1000 pb). Se preparan geles 8% en TBE 1X y se corren en el mismo amortiguador a un voltaje de 1-8 V/cm.

Se siembran marcadores de peso molecular y dos calles de muestra, una analítica que se tiñe 10-30 minutos con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y otra preparativa para recuperar la/s banda/s con el ADN de interés.

Por comparación con la muestra teñida se identifica la zona que la contiene, se corta el gel en piezas finas y se colocan en tubos eppendorf conteniendo por lo menos 2 volúmenes de agua bidestilada estéril. Se disgrega bien el gel y se incuba durante toda la noche a 37°C con agitación. Los fragmentos pequeños (<250 pb) eluyen dentro de las 2-3 horas mientras que los mayores de 750 pb requieren toda la noche. Luego se centrifuga a 10000g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante puede usarse directamente o precipitarse antes con etanol, evitando tomar restos pequeños de poliacrilamida. Si es necesario se filtra el sobrenadante a través de lana de vidrio. Para precipitar el ADN, se procede de la forma convencional previamente descrita y luego se calcula la masa recuperada.

Electroforesis de ADN y transferencia pasiva a filtros de nitrocelulosa.

Para poder identificar los fragmentos de ADN por hibridización, el gel corrido y fotografiado se somete a un tratamiento alcalino durante 1 hora con NaOH 0,5M y NaCl 1,5M que provoca la desnaturalización del ADN. Posteriormente se neutraliza con una solución que contiene Tris-HCl 1M pH 8 y NaCl 1,5M a temperatura ambiente durante 1 hora. Para la transferencia pasiva del ADN se coloca la membrana de nitrocelulosa (previamente embebida en SSC 6X) sobre el gel. El amortiguador de transferencia es SSC 20X (NaCl 0,3M, citrato de Na 0,3M pH 7). Finalmente se coloca papel Whatman 3MM y papel absorbente en forma de capas y sobre éstos un peso de 0,5 kg. Se deja toda la noche a temperatura ambiente, luego se lava la membrana y se hornea durante 2 horas a 80°C (Sambrook *et al.*, 1989).

Ensayo de Southern blot.

Los fragmentos de ADN obtenidos fueron fraccionados en un gel de agarosa 0,8-1 % en una cuba de 36 cm de largo, corridos toda la noche a 0,5 Volts/cm. El tamaño de cada uno se determinó por comparación con marcadores de peso molecular adecuados. Luego de la transferencia y horneado, se coloca el filtro dentro de una bolsa con 6-10 ml de la solución de prehibridización que contiene: SSC 6X, Solución Denhardt 5X (50X Ficoll 5 gr, polivinilpirrolidona 5 gr, BSA 5 gr en 500 ml de agua), ADN de esperma de salmón 100 µg/ml y SDS 0,5%. Los filtros se prehibridizan toda la noche a 65°C. Se reemplaza dicha solución por la de hibridización que contiene además la sonda marcada por "random

priming" previamente hervida 5 minutos a 100°C y se deja toda la noche con agitación a 65°C. Se saca la sonda y se lavan los filtros con SSC 0,1X y SDS 0,1% a 65°C. Se exponen con películas Kodak X-OMAT-S utilizando pantallas intensificadoras a -70°C por distintos periodos de tiempo (Sambrook *et al.*, 1989).

Purificación de oligonucleótidos sintéticos.

En caso de ser necesario, los oligonucleótidos son purificados a través de las columnas NAPTM10 de Sephadex G-25, siguiendo las indicaciones sugeridas por Pharmacia Biotech. Las columnas son lavadas varias veces con agua destilada antes de sembrar el oligonucleótido en un volumen máximo de 1 ml. Se deja escurrir la columna y finalmente se eluye con 1,5 ml de agua destilada. El material eluido se seca totalmente en una centrifuga con vacío y se resuspende en 500 µl de agua destilada. Para cuantificar, se diluyen 5 µl del oligonucleótido purificado en 1 ml de agua destilada. Se mide la absorbancia a 260 nm y se calcula la concentración sabiendo que 1 UDO corresponde aproximadamente a 33 µg/ml. Multiplicando el valor obtenido por el factor de dilución se obtiene el valor final (Sambrook *et al.*, 1989).

Secuenciación de ADN.

La secuenciación del ADN se realiza siguiendo el método de los dideoxinucleótidos descrito por Sanger y Coulson en 1975. Consiste en la síntesis de una cadena de ADN por medio de la enzima ADN polimerasa usando un templado simple cadena. Como fuente de reactivos y de enzima se usa la versión 2.0 del "ADN Sequencing Kit: SEQUENASE" de United States Biochemical (USB).

Se preparan geles 6-8% que contienen una mezcla de acrilamida-bisacrilamida, amortiguador TBE 1X, urea 7,5M, 48 λ de TEMED 0,03% v/v y 480 λ de persulfato de amonio 0,06% para 80 ml de mezcla (Sambrook *et al.*, 1989). La polimerización ocurre a temperatura ambiente. Los geles son precorridos a 65 W durante 40 minutos en TBE 1X antes de la siembra de las muestras. Finalmente la corrida se realiza a 65 W (1600-1900 V). Al terminar la corrida, el gel se seca en un Gel Dryer model 583 de Bio Rad, y se expone a temperatura ambiente con una placa radiográfica Kodak X-OMAT-AR.

Para la preparación de templados para la secuenciación se desnaturalizan entre 3 y 5 µg de ADN plasmídico con una solución de NaOH 200mM y EDTA 0,2mM a 37°C durante 30 minutos. Se agrega acetato de sodio 0,3M final y se precipita con 2,5 volúmenes de etanol. Se lleva a -70°C por 20 minutos, se centrifuga y se lava el precipitado con etanol 70 %.

Tratamiento enzimático de ADN.

Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.

La reacción de digestión se realiza con el ADN, la enzima de restricción elegida, el amortiguador adecuado para ella y agua destilada para llevar a volumen. En general, el tiempo mínimo de incubación es de 2 horas a 37°C, utilizando 5 U/μg de ADN. En estas condiciones las digestiones son totales, tanto para el caso de ADN genómico, ADN plasmídico o un producto de PCR. Para las digestiones de ADN genómico se utilizan entre 5 y 10 μg de ADN.

Para hacer digestiones parciales es necesario utilizar más cantidad de ADN que para el caso de un Southern blot convencional. También es importante tener en cuenta la cantidad de enzima y los tiempos elegidos. Sabiendo que 1 unidad de enzima digiere 1 μg de ADN en una hora, se prepara la siguiente mezcla de reacción: 50 μl de ADN (conteniendo 100 μg de ADN), 50 μl del amortiguador adecuado, 5 μl de enzima (10 U/μl), ARNasa y agua destilada hasta completar el volumen de 500 μl.

Se precalienta dicha mezcla antes del agregado de la enzima para que esta actúe desde el principio, sobre todo en los tiempos cortos. Se sacan 50 μl de la incubación por cada tiempo elegido y se detiene la reacción sumergiéndola bruscamente en fenol para inactivar la enzima. Se elige un rango amplio de tiempos. Luego se trata al ADN con fenol:cloroformo en partes iguales y con cloroformo:alcohol isoamílico. Se centrifuga y el ADN en la fase acuosa se obtiene por precipitación de la manera descripta y se resuspende finalmente en 20 μl de TE. Este material se siembra en un gel de agarosa mediano y se corre a 3 V/cm toda la noche (Campetella *et al.*, 1992).

Cuando se realizan digestiones dobles cuyos amortiguadores son diferentes, se comienza con aquella que requiere menor concentración salina y luego de la incubación, al agregar la segunda enzima se suplementa con la cantidad adecuada de MgCl₂.

Marcación radioactiva de sondas específicas de ADN por "Random Priming".

Las sondas utilizadas se marcan radiactivamente con dNTPs $\alpha^{32}\text{P}$, *in vitro* usando como iniciadores hexámeros sintetizados al azar, con todos los nucleótidos fríos y dCTP marcado con ^{32}P . Luego de la marcación la sonda se separa de los nucleótidos libres, pasando la mezcla de reacción a través de una columna de Sephadex G-50 (fine), equilibrada con amortiguador TE y saturada previamente con ADN de esperma de salmón. La sonda se calienta durante 5 minutos a 90°C antes de ser utilizada, para separar las cadenas de ADN.

La mezcla para “random priming” contiene. ADN doble cadena desnaturalizado 100-200 ng, Hepes 200mM pH 6,6, dNTPs (Tris-ClH 250mM pH 8, MgCl₂ 25mM, β-mercaptoetanol 50mM, dA-dG-dT 100mM), hexámeros al azar 37 ng, ³²P-dCTP 50 μCi y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, 5 unidades. Mantener durante 4 horas a 37°C ó toda la noche a temperatura ambiente (Sambrook *et al.*, 1989).

Ligación de moléculas de ADN.

La ligación se realiza en relaciones adecuadas de plásmido e inserto según el tamaño de ambos y es catalizada por la enzima ADN T4 ligasa. La reacción se realiza a 0°C y como mínimo por 3 horas, aunque usualmente se liga durante toda la noche a 0°C ó a 16°C. Además del fragmento de ADN a clonar, el vector y la enzima T4 ligasa, se necesita ATP y el amortiguador adecuado para la enzima. La reacción se lleva a volumen con agua bidestilada (Sambrook *et al.*, 1989).

Los fragmentos de ADN se clonan en distintos vectores según el objetivo: plásmido pUC19, pBluescript KS⁺ ó pGEX y peT para la expresión de proteínas recombinantes.

Cuando se trata de ligar productos de PCR (contienen una adenina agregada por la Taq ADN polimerasa en el extremo 3') se utiliza el vector T que tiene timinas en los extremos, lo que permite la ligación cohesiva a los fragmentos de PCR. Para estos casos, se usan el vector T de Novagen (T-vector Kit Protocols Novagen pT7Blue T-vector Kit. Cat. No. 69820-1) y el de Promega (pGEM-T easy Vector Systems Cat. No. A 3600).

Finalmente se verifica la efectividad de la ligación transformando bacterias.

Transformación de células competentes.

Los distintos tipos de bacterias competentes a transformar son mantenidas luego de su preparación a -70°C. Se retiran de esa temperatura y se dejan descongelando en hielo 10 minutos. Son preparadas según el protocolo de Sambrook *et al.* (1989).

Se utilizan entre 2 y 5 μl de la ligación para transformar 50 μl de bacterias. La mezcla se deja en hielo 30 minutos y luego se realiza el shock térmico a 42°C durante 30 segundos. Se dejan en hielo otros 2 minutos, se les agrega 200 μl de medio LB y se dejan 1 hora a 37°C con agitación para la recuperación de las células.

Con 100 μl de la mezcla se siembran cajas de Petri con LB-agar 1,5 % y ampicilina 100 μg/ml. Se incuban a 37°C durante la noche.

Si el objetivo es la selección e identificación de las bacterias que contienen el inserto de interés, a las placas se les agrega X-Gal 40 μg/ml (concentración final) e IPTG 0,1mM (concentración final) en el medio, en el momento del armado o con rastrillo sobre la

superficie (Sambrook *et al.*, 1989). Las bacterias positivas son blancas y las que no llevan inserto son azules (T-vector Kit Protocols. Novagen pT7Blue T-vector Kit. Cat. No. 69820-1; pGEM-T easy Vector Systems Cat. No A 3600).

Preparación y análisis de ARN.

Extracción de ARN de parásitos.

Con el método de extracción con TRIzol se puede obtener el ARN total de células que no pueden ser fácilmente fraccionadas en citoplasma y núcleo, en forma simple y rápida, en gran cantidad y manteniendo su integridad (Chomczynski and Sacchi, 1987; Siebert and Chenchik, 1993).

Se parte de 100 millones de parásitos cosechados y lavados con una solución de sacarosa 0,25M, ClK 5mM. Los parásitos son resuspendidos en 1 ml de TRIzol Reagent LS (GIBCO BRL) y son lisados por pipeteo reiterado. Se incuban las muestras homogeneizadas 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregan 200 µl de cloroformo y se agita vigorosamente durante 15 segundos y se incuba 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12000 g 15 minutos a 4°C y la fase acuosa incolora obtenida, contiene el ARN.

Aproximadamente 600 µl de dicha fase se transfieren a un tubo limpio y el ARN se precipita por el agregado de 500 µl de isopropanol, incubando la mezcla 10 minutos a temperatura ambiente. Se vuelve a centrifugar a 12000 g 10 minutos a 4°C y el precipitado blanco que corresponde al ARN total, es lavado con etanol 75% (en agua con DEPC). El precipitado limpio se seca al aire por 5 a 10 minutos (no completamente) y se resuspende en agua con DEPC. Se conserva a -70°C.

Cuantificación de ARN.

Se procede de la misma forma que para la cuantificación de oligonucleótidos. En este caso, se mide la absorbancia a 260 nm y 280 nm, se calcula la relación entre A_{260}/A_{280} cuyo valor debe oscilar entre 1,7 y 2. Este dato nos permite saber si la preparación está contaminada con proteínas, en cuyo caso deberá tratarse con fenol-cloroformo.

También se mide la relación de absorbancias A_{260}/A_{230} que debería ser mayor que 2 y nos permite verificar si el material está contaminado con isotiocianato de guanidina (componente del TRIzol). Con el valor de A_{260} se puede calcular la concentración de ARN en la preparación, sabiendo que 1 UDO corresponde aproximadamente a 40 µg/ml de ARN (Sambrook *et al.*, 1989).

Electroforesis de ARN y transferencia a nitrocelulosa.

Se prepara un gel de agarosa 1,2% y se le agrega el amortiguador de corrida MOPS 10X (MOPS 0,4M pH 7; acetato de sodio 0,1M y EDTA 1mM pH 8) y formaldehído 37%, para llegar a una concentración final de MOPS 1X y formaldehído 2,2M (Ausubel *et al.*, 1987). Todas las soluciones se preparan en agua con DEPC. Se arma el gel y se corre en amortiguador de corrida 1X.

Las muestras a sembrar conteniendo 30 µg de ARN se agregan a una mezcla que contiene 5 µl de amortiguador de corrida MOPS 10X, 8,75 µl de formaldehído 37% y 25 µl de formamida. Se mezclan e incuban durante 15 minutos a 55°C. Se les agrega 10 µl de amortiguador de siembra que contiene EDTA 1mM pH 8, azul de bromofenol 0,25% (p/v), xylene cyanol FF 0,25% (p/v) y glicerol al 50% (v/v).

Se corre el gel a 5 V/cm durante 3 a 4 horas. Finalizada la corrida, se lava el gel con agua deionizada para remover el formaldehído. Se corta la parte a transferir y el resto, conteniendo los marcadores de peso molecular y un duplicado de la muestra se separa para teñir. Para la tinción, el gel se lava con acetato de amonio 0,5M durante 20 minutos y luego se reemplaza por bromuro de etidio 0,5 µg/ml en acetato de amonio 0,5M durante 40 minutos. Se destiñe con acetato de amonio 0,5M por 45 minutos. Se lava varias veces con agua. La parte del gel a transferir se sumerge en una solución de SSC 10X durante 45 minutos y se transfiere a nitrocelulosa en SSC 20X toda la noche. Luego el filtro se hornea a 80°C por 2 horas (Ausubel *et al.*, 1987).

Ensayo de Northern blot.

Se coloca el filtro dentro de una bolsa con 6-10 ml de la solución de prehibridización (K_2HPO_4 25mM pH 7,4; SSC 5X; Solución Denhard't 5X; ADN de espermatozoos de salmón 50 µg/ml y formamida 50%). Se prehibridiza toda la noche a 42°C.

Se prepara la sonda de ADN por "random priming", se hierve 5 minutos a 100°C y se agrega a la solución de hibridización que tiene semejante composición que la solución de prehibridización pero además dextrán sulfato 10%. Se hibridiza toda la noche a 42°C. Se lavan los filtros con SSC 0,1X y SDS 0,1% a 37°C. Se expone con un film Kodak X-OMAT-S y se revela por autorradiografía.

Reacción de PCR.

Para la amplificación de los fragmentos de interés se requiere: ADN en poca cantidad (500 ng), 300 ng de los oligonucleótidos, amortiguador 1X (Tris HCl 100mM pH 7,9; KCl 500mM; MgCl₂ 15mM); dNTPs 2mM; 2,5 unidades de enzima Taq polimerasa, y agua bidestilada estéril hasta completar el volumen final de 50 ó 100 µl según el caso.

Según el objetivo de cada experimento cambian las temperaturas y tiempos de desnaturalización, unión de los oligonucleótidos al templado y tiempo de elongación, como así también el número de ciclos de la reacción (Saiki, 1985), según se indica en cada caso.

PCR sobre colonias.

Se toma una colonia bacteriana en condiciones de esterilidad y se la coloca en un tubo eppendorf que contiene 50 µl de agua estéril. Luego se hierve durante 5 minutos y se lleva inmediatamente a hielo. Se centrifuga a 12000 g por 2 minutos y 10 µl del sobrenadante resultante se utilizan como fuente de ADN para la reacción de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa semianidada acoplada a transcripción reversa (RT-PCR).

Consiste en la síntesis de una cadena de ADNc (copia) por medio de la enzima transcriptasa reversa y utilizando como templado una molécula de ARN.

Para el ensayo, se prepara ARN total de epimastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi*. El ADNc se obtiene utilizando la enzima SuperScript RT Plus™ (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) Cat No.8248SA, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta es una enzima M-MLV RT modificada (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), sin actividad ARNasa H, permitiendo la obtención de cadenas de ADNc de mayor longitud y por otro lado es más termoestable.

Se toman entre 2 y 5 µg de ARN total y se les agrega el amortiguador adecuado para la enzima 1X (5X: Tris-HCl 250 mM pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM), dNTPs 0,5mM en solución acuosa e inhibidor de la ARNasa (rRNasin® Promega) 20 unidades. Se añaden 200 ng del oligonucleótido iniciador, que puede ser: 1 µl de oligo(dT) ó 2 µl de GDH₃ según el tamaño y tipo de producto deseado. La transcripción reversa con el oligo(dT) permite obtener todos los mensajeros que lleven la cola de poliA, en cambio el oligo GDH₃ selecciona únicamente los mensajeros de la GluDH ya que su secuencia es homóloga a dicha enzima a una distancia de 219 pb del codón ATG de iniciación. Se lleva a volumen con agua y se mezcla bien, se incuba a 65°C durante 10 minutos y se coloca en hielo.

Finalmente se agrega 1 μ l de la enzima SuperScript RT PlusTM y se incuba a 42°C por 45 minutos. Terminada la reacción se incuba a 95°C por 5 minutos para desnaturalizar el híbrido ARN-ADNc e inactivar la transcriptasa reversa y se transfiere a hielo.

Puede determinarse el tamaño del ADNc por medio de un gel de agarosa desnaturalizante y estimarse el rendimiento por incorporación de nucleótidos radioactivos. Para la reacción de PCR se utilizan 1 a 2 μ l del producto obtenido.

La reacción de PCR semianidada consiste de dos reacciones de PCR sucesivas. Para la primera, se utiliza un oligonucleótido iniciador que puede ser: oligo(dT) ó GDH₃ (dependiendo del elegido para la obtención del ADNc) combinado con el miniexón (McCarthy-Burke *et al.*, 1989). En la segunda reacción el ADN es amplificado usando un segundo iniciador derivado de la secuencia de ADN conocida, desplazado hacia el ATG de la molécula (GDH₁) combinado nuevamente con el miniexón (PCR semianidada).

La mezcla para la primera reacción de PCR contiene: ADNc 1 μ l, amortiguador para la Taq polimerasa 1X, dNTP 0,2mM de cada uno, Cl₂Mg 1,5mM, oligo miniexón 200 ng. Del segundo oligo elegido se usan también 200 ng. Al final se agregan 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa.

Para la segunda reacción de PCR se usa 1 μ l de ADN de la PCR anterior y se agregan los mismos reactivos en el orden indicado, salvo el segundo oligonucleótido que se reemplaza por GDH₁ 200 ng.

Expresión de proteínas recombinantes.

Inducción de bacterias *Escherichia coli* HB101 conteniendo el vector de expresión pGEX.

Realizada la transformación de bacterias competentes *E. coli* HB101 con el plásmido pGEX recombinante, se toma una colonia y se la crece durante toda la noche en medio LB con ampicilina 100 μ g/ml, a 37°C y con agitación. A la mañana siguiente, el cultivo se diluye 1/20 hasta un volumen final de 100 ml. Se sigue el cultivo por medición de la densidad óptica a 600 nm y se crece hasta que sale de la fase lag, lo cual ocurre aproximadamente 45 minutos después de realizada la dilución. En ese momento se separan 5 ml (control no inducido) y al volumen restante se lo induce con IPTG 0,1 mM.

El crecimiento del cultivo se sigue por medición de la densidad óptica y, a las 4 horas de comenzada la inducción, el cultivo fue centrifugado durante 5 minutos a 7000g y luego resuspendido en una solución conteniendo NaCl 100mM, EDTA 1mM, Tris 50mM pH 8, 10% (v/v). Se centrifuga nuevamente y se descarta el sobrenadante.

El pellet obtenido se resuspende en el mismo amortiguador y las bacterias se lisan por sonicación a intervalos de 30 segundos durante 5 minutos. Se observa al microscopio antes y después de la sonicación para ver la efectividad de dicho paso que debe resultar en la destrucción total de las células y la liberación de los cuerpos de inclusión. Luego, se realiza un tratamiento con lisozima (1mg/ml) durante 20 minutos a temperatura ambiente, y finalmente deoxicolato de sodio 0,1% por 10 minutos a la misma temperatura. Se centrifuga 10 minutos a 10000 g y el precipitado se lava con agua destilada 2 veces y luego se resuspende en la solución de siembra de los geles a 100°C, evitando así la posible degradación de la/las proteínas inducidas por proteasas bacterianas. Se centrifuga durante 10 minutos a 10000 g a temperatura ambiente y se guarda el sobrenadante, que se utiliza para una electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (Sambrook *et al.*, 1989).

Miniinducción de bacterias *E. coli* BL26 (DE3) y BL26 (DE3)PLys S conteniendo el vector pET-22b(+).

Una vez realizada la transformación, se selecciona una colonia recombinante y se la crece durante la noche en 10 ml de medio LB conteniendo ampicilina 100 µg/ml a 37°C y con agitación. A la mañana siguiente el cultivo se diluye 1/10, se mide la densidad óptica a 600 nm y se continúa la incubación durante 45 minutos a 37°C (se realizan mediciones cada 10 minutos para detectar el momento en que el cultivo sale de la fase lag). Entonces se separa 1 ml (control no inducido) y a los 9 ml restantes se los induce con IPTG 0,1mM, y se continúa el crecimiento a 28°C por 3 horas. Se sigue registrando la densidad óptica hasta que el cultivo llega a la fase estacionaria.

Tratamientos para la obtención de la fracción sobrenadante que contiene la proteína recombinante.

Se centrifuga el cultivo inducido, a 7000 g durante 5 minutos y el precipitado se resuspende en un amortiguador de lisis que contiene: Tris-ClH 50mM pH 7,9; NaCl 100mM; EDTA 1mM. De allí, se separan 10 µl para sembrar en un gel como la fracción correspondiente a las proteínas totales inducidas. El resto de la preparación se sonica durante 5 minutos con intervalos de 30 segundos y se centrifuga a velocidad máxima por 10 minutos. El precipitado contiene las proteínas insolubles formando cuerpos de inclusión y el sobrenadante contiene las proteínas solubles. También se separa una fracción de proteínas totales de un cultivo no inducido y se realiza el mismo procedimiento para el material proveniente de bacterias no transformadas con el plásmido recombinante.

Todas las fracciones se siembran en un gel SDS-PAGE, corrido en condiciones normales y teñido con Coomassie Blue.

Purificación de la glutamato dehidrogenasa NADP-dependiente recombinante por cromatografía de afinidad en Blue Sepharose CL-6B.

Para la purificación de cantidades sustanciales de la enzima recombinante, se inducen 100 ml de cultivo a 28°C con IPTG 0,1 mM. El cultivo se cosecha cuando la absorbancia a 600 nm es cercana a 4. El pellet bacteriano se resuspende en TBS (Tris-ClH 50mM pH 7,6; ClNa 150mM) conteniendo PMSF 1mM, lisozima 100 µg/ml y Tritón X100 1% y se incuba a temperatura ambiente por 20 minutos. Luego de la lisis, se adiciona MgCl₂ 10 mM y DNasa 20 µg/ml y se incuba de la misma forma durante 15 minutos. Finalmente se centrifuga a 20000 g a 4°C por 15 minutos. Tanto en la fracción sobrenadante (proteína soluble) como en el precipitado (cuerpos de inclusión) puede detectarse GluDH-NADP. Se toman 5 ml de la fracción sobrenadante, conteniendo 7,2 mg de proteína total y se dializan exhaustivamente contra el amortiguador Tris-ClH 50mM, ClNa 50mM pH 7,6. Se determina la actividad y se aplica en una columna de Blue Sepharose. Se procede de la misma forma que para la purificación de la proteína nativa.

Resultados

Purificación de la GluDH-NADP de *T. cruzi*.

La GluDH-NADP dependiente de *T. cruzi* fue purificada hasta homogeneidad proteica a partir de epimastigotes de la cepa Tulahuén 2 (Tul2) en 1978 (Juan *et al.*, 1978), siendo la primera enzima purificada hasta ese grado a partir del parásito.

El método utilizado fue modificado posteriormente (Cazzulo *et al.*, 1988b). El nuevo protocolo de purificación consistía en la ruptura de los epimastigotes por congelación y descongelación repetida; extracción; fraccionamiento con sulfato de amonio (50-75% de saturación); diálisis; cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa y filtración por gel en columna de Sephadex G-200.

Con el objetivo de mejorar la actividad específica de la preparación enzimática, eliminando enzima desnaturalizada, se introdujo un paso de cromatografía de afinidad, empleando una columna de Cibacron Blue F3G-A (Blue Sepharose CL-6B) en lugar de la filtración por gel en una columna de Sephadex G200. Esto permitió aumentar el grado de purificación a 60 veces y el rendimiento al 58%, resultando una proteína con mayor actividad específica (330 unidades. mg^{-1} , comparadas con las 189 unidades. mg^{-1} obtenidas previamente (Cazzulo *et al.*, 1988b)).

En la tabla 1 se muestran los resultados de una purificación típica de la enzima a partir de cultivos de epimastigotes de la cepa Tulahuén 2.

Pasos	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Enzima total (unidades)	Actividad específica (u.mg ⁻¹)	Purificación (-veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	106	1,160	6,540	5.6	1	100
Sulfato de amonio (50-75%)	25	250	5,840	23.3	4.2	89
DEAE-celulosa	28	29	5,040	174	31	77
Blue Sepharose	2.3	11.5	3,800	330	59	58

Tabla 1: Purificación de la glutamato dehidrogenasa NADP-dependiente (GluDH-NADP) de *T. cruzi*.

La enzima fue purificada a partir de 21 gr. de epimastigotes (peso húmedo) como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

(u.mg⁻¹): unidades por miligramo de proteína.

En la figura 1(a) se muestra el perfil de elución a través de la columna de afinidad antes mencionada. La enzima se obtiene en forma de un pico agudo luego de agregar el eluyente NADP 2mM. En la figura 1(b) se observa comparativamente el patrón electroforético de proteínas obtenido en cada paso de purificación revelado con el reactivo de plata. Puede notarse que el eluido de la columna de Blue Sepharose (calle 4) presenta solo trazas de otras proteínas, de menor peso molecular, además de la subunidad de 47 kDa correspondiente a la GluDH-NADP dependiente.

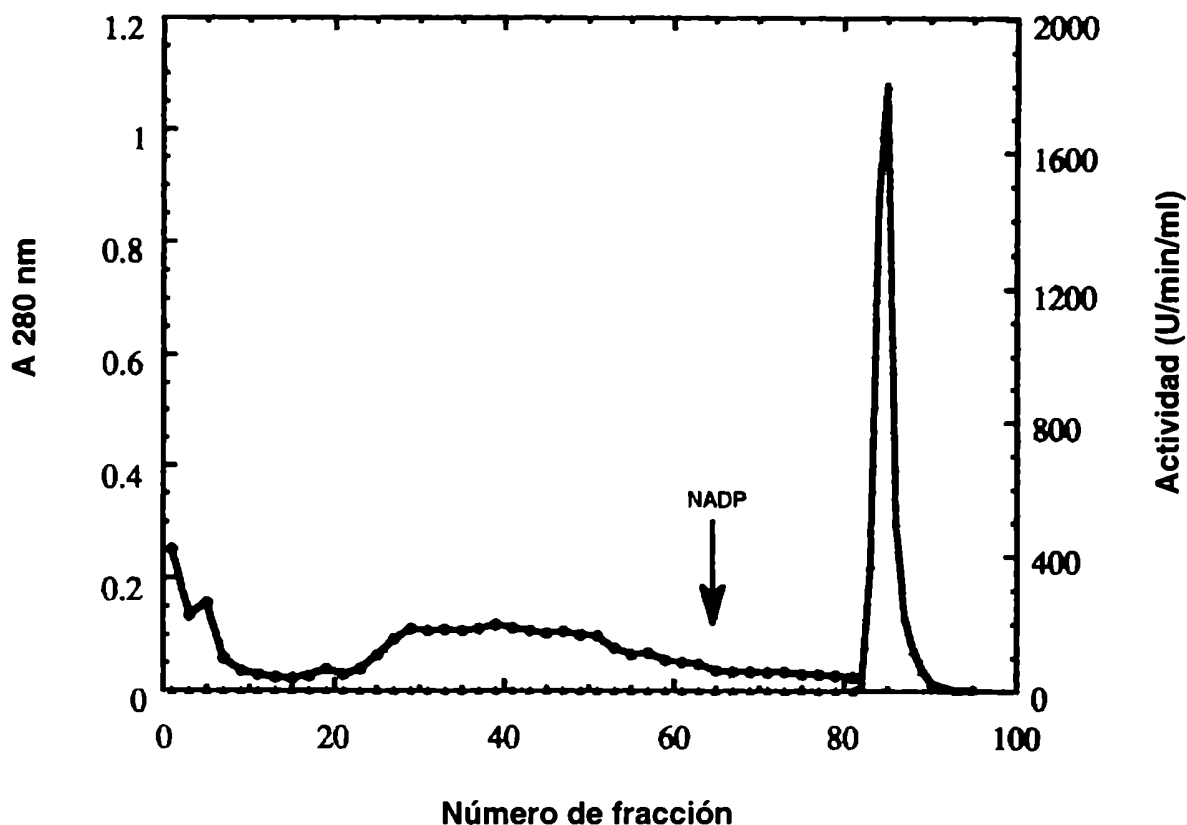


Figura 1: Purificación de la GluDH-NADP dependiente de *T. cruzi* por cromatografía de afinidad en Blue Sepharose.

(a) Perfil de elución de la GluDH-NADP en la columna de afinidad Blue Sepharose como se describe en Materiales y Métodos. (•) Las proteínas fueron determinadas por absorbancia a 280 nm antes del agregado del amortiguador conteniendo NADP (indicado por una flecha) y por el método de Lowry *et al.* (1951) luego de la adición del NADP.

(Δ) Medida de la actividad enzimática en U/min/ml.

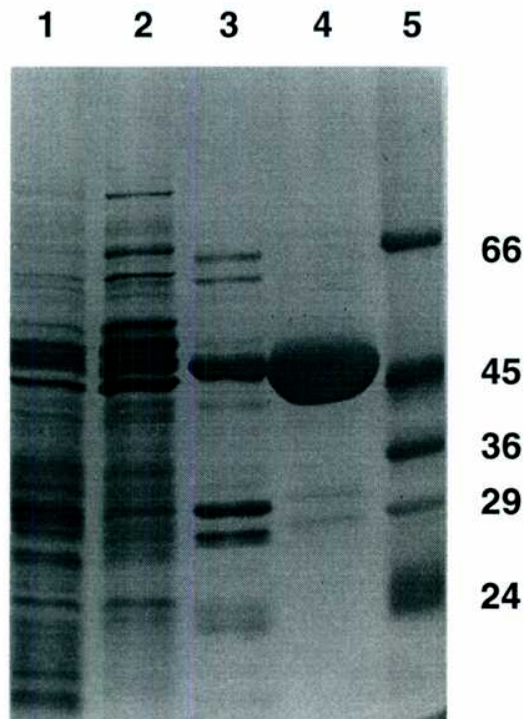


Figura 1: Purificación de la GluDH-NADP dependiente de *T. cruzi* por cromatografía de afinidad en Blue Sepharose.

(b) SDS-PAGE 10% de los pasos del protocolo de purificación. Calle 1: Extracto crudo; calle 2: fraccionamiento salino con sulfato de amonio 50-75%; calle 3: fracciones activas de la columna de DEAE-celulosa; calle 4: fracciones activas de la columna de afinidad Blue Sepharose; calle 5: marcadores de peso molecular. El gel fue revelado con el reactivo de plata. Los pesos moleculares se indican en kiloDaltones.

Dichas trazas solo pueden visualizarse luego de la tinción con el reactivo de plata y copurifican con la enzima en una filtración por gel a través de una Superosa 6 en un sistema de FPLC.

Luego de permanecer mucho tiempo a -20°C , algunas preparaciones de la proteína purificada presentan pequeñas cantidades de proteínas de alto peso molecular que son reveladas en ensayos de Western Blot con el anticuerpo específico anti-GluDH-NADP purificada, probablemente debido a la formación de agregados moleculares de la enzima. La proteína finalmente obtenida, en gran cantidad y altamente pura, fue utilizada para obtener datos acerca de su secuencia de aminoácidos y para intentar su cristalización y estudio estructural por difracción de rayos X. Este último trabajo se encuentra aún en estado de experimentación, en colaboración con el grupo de la Dra. Linda Britton en la Universidad de Sheffield, UK.

Obtención de secuencias peptídicas de la GluDH-NADP.

La GluDH-NADP purificada, reducida y piridiletilada, fue sometida a degradación controlada por métodos químicos y enzimáticos para el aislamiento, purificación, determinación de la composición de aminoácidos y secuenciación de péptidos.

En primer lugar, se ensayó el clivaje químico en los residuos metionina (Met) por tratamiento con BrCN. Los péptidos obtenidos de mayor tamaño fueron separados a través de un gel SDS-PAGE 15% o por SDS-PAGE en el Phast System gel High Density y teñidos con Coomassie Blue. Los frag-

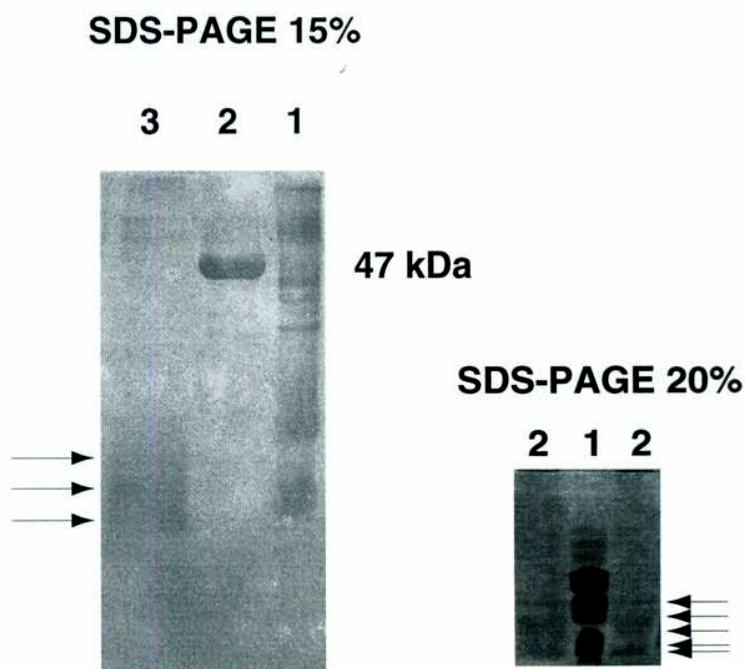


Figura 2: Electroforesis en geles de poliacrilamida de los fragmentos proteicos obtenidos por digestión con BrCN.

Aproximadamente 4 mg de GluDH-NADP reducida, piridiletilada y tratada durante 20 horas con BrCN fueron sembrados en: (a) SDS-PAGE 15% revelado con Coomassie Blue. Calle 1: marcadores de peso molecular; calle 2: GluDH-NADP de *T. cruzi* purificada; calle 3: GluDH-NADP tratada con BrCN. (b) SDS-PAGE 20% (Gel High density) revelado con Coomassie Blue. Calle 1: marcadores de peso molecular; calle 2: GluDH-NADP de *T. cruzi* tratada con BrCN. Los pesos moleculares se indican en kiloDaltones.

mentos resultantes de ambos geles fueron transferidos a membranas de Immobilon y teñidas con el mismo colorante. Como se observa en las figuras 2(a) y 2(b), tres bandas nítidas fueron identificadas en el gel al 15% y cinco bandas en el gel de alta densidad, que fueron utilizadas para secuencia. Por otro lado, se intentaron separar, sin éxito, los péptidos de menor tamaño a través de una columna de Sephadex G-25 y purificación por HPLC en fase reversa.

Posteriormente, se realizaron tratamientos enzimáticos de la GluDH-NADP con tripsina, endoproteinasa Lys-C de *Achromobacter sp* y endoproteinasa Arg-C. Los péptidos obtenidos en dichas hidrólisis fueron separados y purificados por HPLC en fase reversa en columnas C₁₈ eluidas con un gradiente de acetonitrilo en 0.1% ácido trifluoroacético, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El perfil de las columnas para los tratamientos con Lys-C y Arg-C se detalla en la figura 3 (a y b), en la cual se indican los péptidos seleccionados para secuenciar.

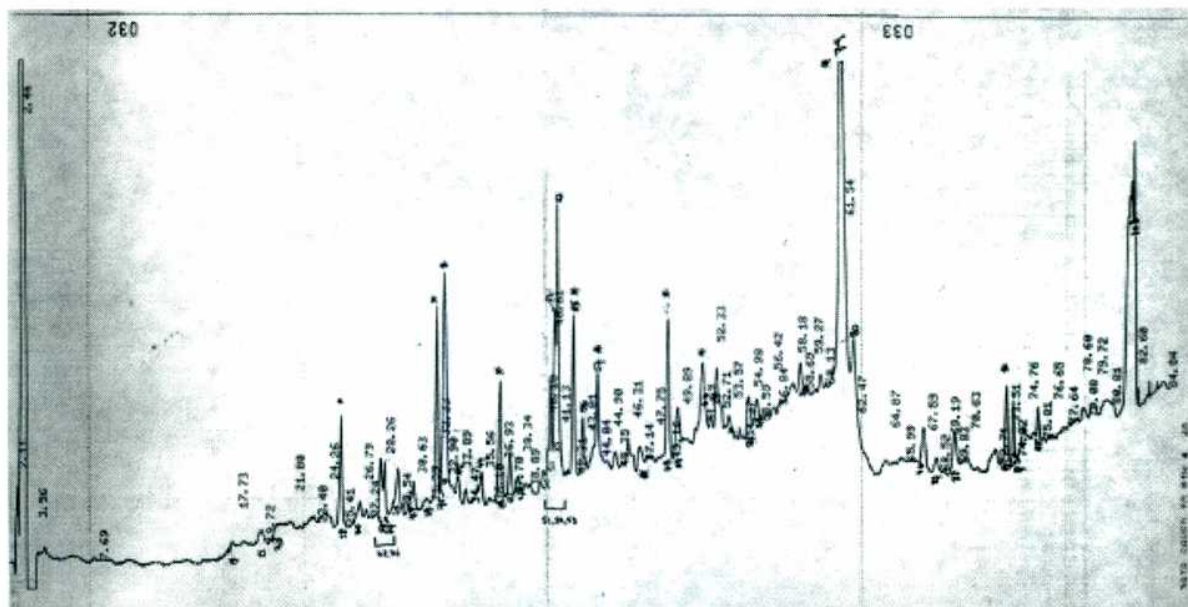


Figura 3a: Perfil de elución de los péptidos obtenidos luego del tratamiento con la endopeptidasa Lys-C, en HPLC en fase reversa.

Aproximadamente 100 μ g de GluDH-NADP reducida y piridiletada fueron utilizados en el tratamiento. Luego de 24 horas el material fue aplicado a una columna C₁₈ eluida con un gradiente de acetonitrilo en 0.1% ácido trifluoroacético. Cada pico obtenido fue recolectado por separado y aquellos identificados por un asterisco (*) fueron seleccionados para secuenciación y determinación de la composición de aminoácidos.

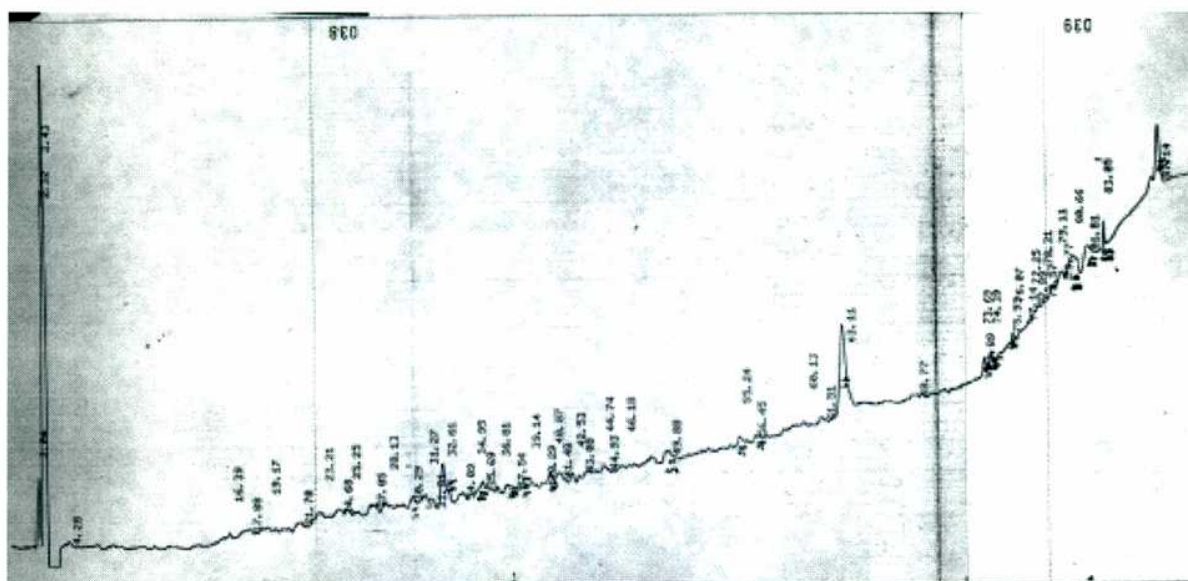


Figura 3b: Perfil de elución de los péptidos obtenidos luego del tratamiento con la endopeptidasa Arg-C, en HPLC en fase reversa.

Aproximadamente 100 µg de GluDH-NADP reducida y piridiletalada fueron utilizados en el tratamiento. Luego de 24 horas el material fue aplicado a una columna C_{18} eluída con un gradiente de acetonitrilo en 0.1% ácido trifluoroacético. Cada pico obtenido fue recolectado por separado y aquellos identificados por un asterisco (*) fueron seleccionados para secuenciación y determinación de la composición de aminoácidos.

Los péptidos purificados, en solución, así como los obtenidos por fragmentación con BrCN, tomados directamente de la membrana de Immobilon, fueron secuenciados en un secuenciador automático en fase gaseosa Applied Biosystems, en el LANAIS de Proteínas dirigido por el Dr. José A. Santomé. En cambio, los péptidos obtenidos de la digestión con tripsina fueron secuenciados por el Dr. Ulf Hellman, en el Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala Branch, Uppsala, Suecia.

Las secuencias peptídicas obtenidas fueron las siguientes:

Tripsina: FTGK
CLQLGAK
TNYV

Lys-C: KNSLTTLPMGGGK
KHGTVVEEYAK
KYGTEGGK
KVAEAMK

BrCN: MRPEATGYGLVYFLDALLKKHNQELKG
MDIKNVKHGTVEEYAKGLG
MSQNAARL

La información proveniente de dichos péptidos junto con la secuencia de los primeros 34 aminoácidos del extremo N-terminal obtenida por Cazzulo *et al.* (1988b) permitieron concluir que hasta ese momento se encontraba secuenciada aproximadamente una tercera parte de la proteína total, con un grado de homología del 74% con la enzima similar de *E. coli*.

E. coli MDQTYSLLESFLNH-VQKRDPNQTEPAQAQAVREVMTTLWPPFLEQNPKYRQMSLL
 T. cruzi MKYT-SVDDFINK CVKKRDPNOPEFVQAVHEVMTSLWPF
 E. coli ERLVEPERVVIQFRVVWVDDRNQIQVNRARVRVQPFSSAIGPYKGGMRFPSPVNL
 T. cruzi
 E. coli. SILKFLGLGFEQTFKNAALTTLPFMGGGK*GGSDFDPKVVGKSEGEVMRFCQALMTEL
 T. cruzi KNSLTTLPFMGGGK
 E. coli YRHLGADTDVPAAGDIGVGGREVGFMAGHMKKLSNNTACVFTGKGLSPGGSLI
 T. cruzi RHLGADTD FTGK
 E. coli RPEATGYGLVYFTEAMLKRHGMGFEGMRVSVSGSGNVAQYAIEKAMEFGARK
 T. cruzi RPEATGYGLVYFLDALKKKHNQELKG CLOLGAK
 E. coli ITASDSSSGTVVDES GFTKEKLARLIEIKASRDGRVADYAKEFGLVYLEGQQP
 T. cruzi DIKNVKKHGTVEEYAKGLG
 E. coli WSLPVDIALPCATQNELDVDAAHQLIANGVKAVAEGANMPTTIEATELFOQA
 T. cruzi
 E. coli GVLFPAGKAAANAGGVATSGLEMAQNAAARLGWKA EKVDARLHHIMLDIHHACV
 T. cruzi SONAARL
 E. coli EHGGEQEQTNVYVQGANIAGFVKVADAMLAQGGVI
 T. cruzi KYGTEGGKTNYV KVAEAMK

Sobre la secuencia completa de la enzima de *E. coli* se ubican los péptidos obtenidos de la GluDH de *T. cruzi*. Las zonas subrayadas corresponden a las secuencias obtenidas por secuenciación de los péptidos provenientes de los tratamientos con tripsina, BrCN, Lys-C y Arg-C. La secuencia del extremo N-terminal fue determinada por Cazzulo *et al.* (1988b) por secuenciación directa. Las barras verticales indican identidad (I) y los puntos (•) sustituciones conservadas. El asterisco (*) indica la localización del residuo Lys del sitio activo.

Clonado del gen que codifica para la GluDH-NADP.

Rastreo inmunológico de una biblioteca de expresión genómica de *T. cruzi* en el fago λ gt11.

Los primeros intentos para clonar el gen que codifica para la GluDH-NADP fueron realizados en nuestro laboratorio por el Dr. Oscar Campetella a partir de una biblioteca de expresión genómica de *T. cruzi* Miranda 76 (M76) en el vector λ gt11. Los bacteriófagos de dicha biblioteca contienen insertos de hasta 5 kpb clonados en el sitio EcoRI. Como *T. cruzi* no tiene intrones, se pudo utilizar una biblioteca genómica de expresión, induciendo una proteína recombinante fácilmente detectable. Para la identificación de los clones positivos se utilizó un suero policlonal monoespecífico preparado contra la proteína purificada (Campetella *et al.*, 1990). Los ensayos permitieron el aislamiento de un único fago positivo cuya proteína de expresión, inducida con el agregado de IPTG, presentó una fuerte reacción con el antisuero antes mencionado.

Obtención de clones conteniendo parte del gen de la GluDH-NADP de *T. cruzi*.

El tratamiento del bacteriófago positivo con la endonucleasa EcoRI, permitió la liberación e identificación de un único fragmento de 4.4 kpb que fue clonado en el mismo sitio del plásmido pUC19.

Con el objeto de determinar si el inserto contenía el gen completo o un fragmento del mismo, el producto de 4.4 kpb fue subclonado en fase en el sitio EcoRI del vector de expresión pGEX-1. La inducción de este sistema permite la expresión del fragmento carboxilo terminal de la enzima Glutathione-S-transferasa (GST) de 26 kDa fusionado a la proteína de interés, un fragmento de la GluDH-NADP en este caso.

Las proteínas obtenidas en bacterias HB101 transformadas con el plásmido, inducidas o no inducidas con IPTG, fueron enfrentadas en ensayos de Western Blot con el antisuero anti-GluDH-NADP.

En la figura 5(a) se analizan por SDS-PAGE 10% las fracciones obtenidas. Pueden observarse varias bandas proteicas nuevas en la calle correspondiente a la fracción del precipitado de células inducidas con IPTG. El análisis de la misma fracción en ensayos de Western blot (figura 5(b)) muestra una proteína de fusión mayoritaria con un peso molecular aparente de entre 35-40 kDa que reacciona fuertemente con el antisuero anti-GluDH-NADP, acompañada por bandas de menor peso molecular que podrían ser productos de

degradación de aquella ya que también son reconocidas por el anticuerpo. De esta manera, podemos deducir que el inserto de 4.4 kpb contiene información del 20-25% de la proteína o sea aproximadamente 100 aminoácidos de la GluDH-NADP.

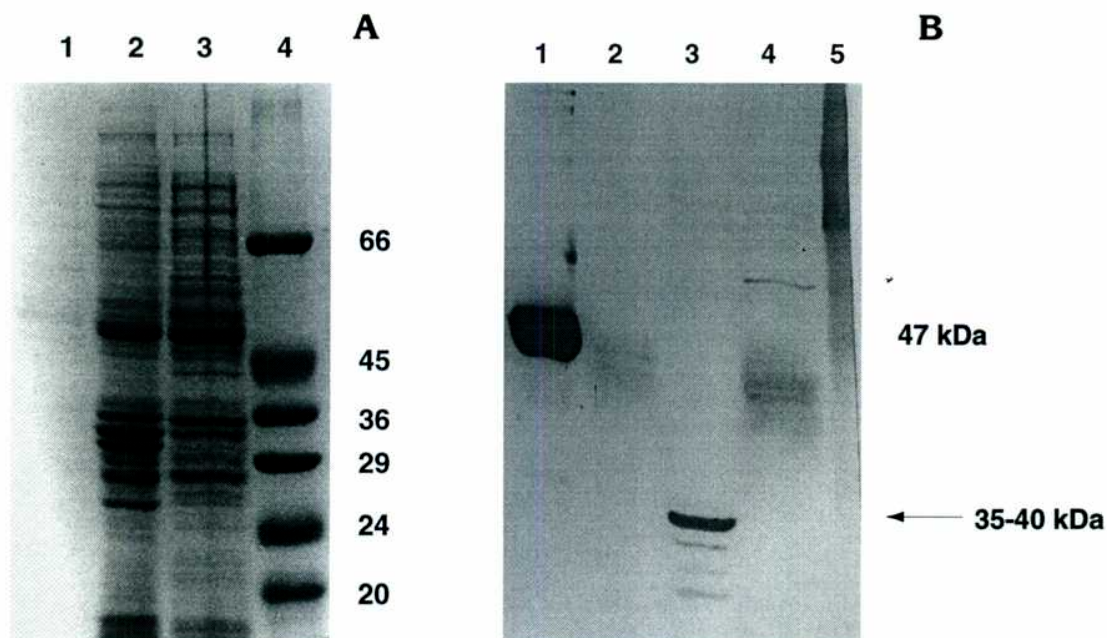


Figura 5: Inducción de la proteína recombinante GST-GluDH-NADP.

(a) SDS-PAGE 10% de la proteína de fusión Glutathion-S-transferasa-GluDH. El fragmento de la GluDH-NADP contenido en el clon positivo corresponde aproximadamente a 100 aminoácidos de dicha proteína. Calle 1: sobrenadante de bacterias inducidas; calle 2: precipitado de bacterias inducidas; calle 3: bacterias no inducidas; calle 4: marcadores de peso molecular. El gel fue teñido con Coomassie Blue.

(b) Western blot revelado con un antisuero anti-GluDH-NADP (dil. 1/1500). Calle 1: GluDH-pura; calle 2: sobrenadante de bacterias inducidas; calle 3: precipitado de bacterias inducidas; calle 4: bacterias no inducidas y calle 5: marcadores de peso molecular. Los pesos moleculares se indican en kiloDaltones.

Una vez confirmada la presencia de una parte del gen de la GluDH-NADP dentro del inserto, se construyó un mapa de restricción utilizando las endonucleasas EcoRI, BglII, BamHI e HindIII para determinar su orientación en el plásmido y luego se procedió a su secuenciación por el método de los dideoxinucleótidos usando el oligonucleótido iniciador reverse (Rev) del plásmido y posteriormente otro iniciador carboxilo (COO^-) construido a partir de la secuencia obtenida. En la figura 6 se detallan esquemáticamente, la orientación y el tamaño del fragmento clonado, como así también los sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas.

Iniciador Rev de pUC19: 5' GCGGATAACAATTTACACAGGA 3'

Tm: 60°C

Iniciador Carboxilo: 5' TCTAAGCTGGACAGCCGAGG 3'

Tm: 64°C

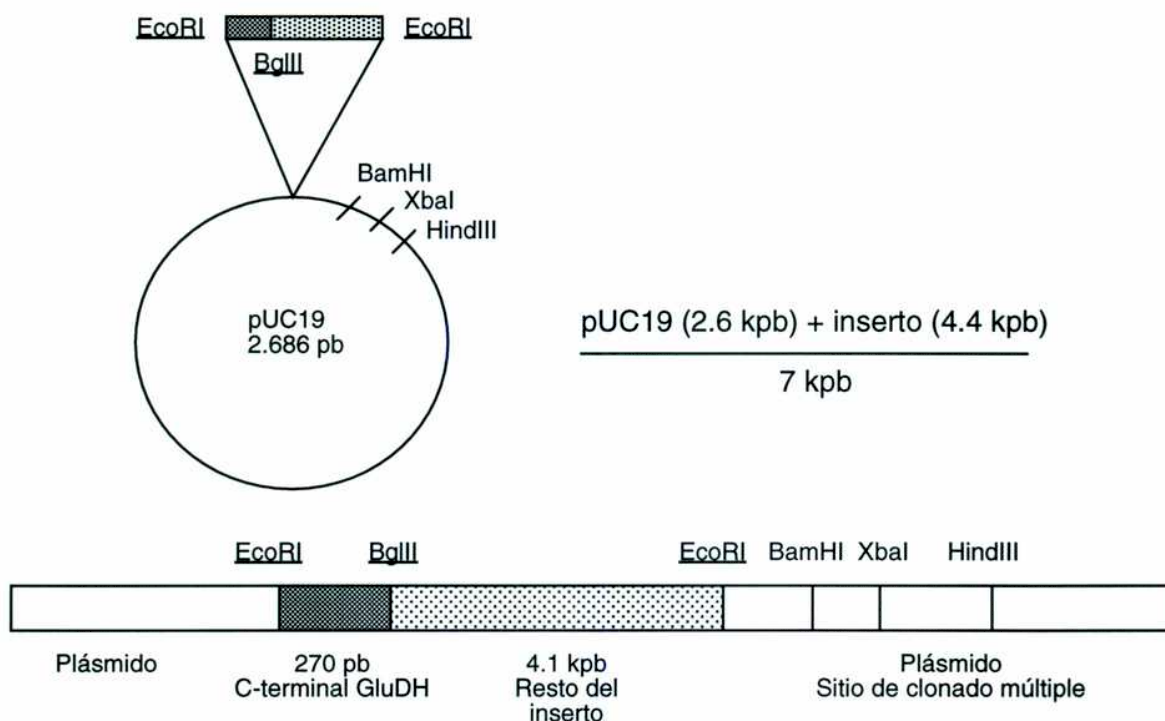


Figura 6: Esquema del plásmido pUC19-GluDH-NADP.

El tratamiento del clon recombinante con las enzimas de restricción EcoRI, BglII, BamHI e HindIII permitió determinar la orientación del inserto y ubicar los sitios de corte para dichas enzimas de restricción.

Los resultados obtenidos de la secuencia nucleotídica nos permitieron concluir que en realidad el inserto de 4.4 kpb contiene sólo 270 pb del gen de interés, (correspondientes a 90 aminoácidos) e identificadas como parte de su extremo C-terminal, al realizar la comparación con las GluDH-NADP conocidas del banco de datos. En el extremo 5' del inserto, correspondiente a la enzima, se encuentra el sitio de restricción EcoRI (tiene por lo menos un sitio de corte dentro del gen) y 270 pb río abajo se localiza el codón de terminación, en el que se ubica un sitio BglII. La secuencia nucleotídica adicional en el extremo 3' corresponde a la zona intergénica.

La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica completa de dicho fragmento mostró muy alta homología (superior al 70%) con la zona correspondiente a la misma enzima de *E. coli* (figura 7).

```

E. coli  MDQ TYSLESFLNH - VQKRDPNQTEFAQAVREVHTTLWPFLEQNPKYRQMSLL
E. coli  ERLVEPERV IQFRVWVDDRNQIQVNRAHRVQFSSAIGPYKGGHRPHPSVNL
E. coli.  SILKFLGF EQTFKNALTTLP MGGGKGGSDFDPKVGKSEGEVMRFCQALMTEL
E. coli  YRHLGADTDVPAGDIGVGGREVGFMAGNMKKLSNNTACVFTGKGLSFGGSLI
E. coli  RPEATGYGLVYFTEAMHLKRHGMGFEGMRVSVSGSGNVAQYAIEKAMEFGARK
E. coli  ITASDSSGT VVDES GFTKEKLARLIEIKASRDGRVADYAKEFGLVYLEGQQP
E. coli  WSLPVDIALPCATQNELDVDAAHQLIANGVKAVAEGANHPTTIEATELFPQQA
T. cruzi                                     EFINA
E. coli  GVLFA PGKAA NAGGVATSGLEMAQNAARLGWKA EKVDARLHHIMLDIMHACV
T. cruzi GVLFA PGKAA NARGVAISGLEH SQNAAXLSWTAEEVEQKLR EIHNSIHDACV

E. coli  EHGGEGEQTNYVQG ANIAGFVKVADAMLAQGV I
T. cruzi KYGTVGGKTNYVNG ANIAGFVKVAEAMKGLGVV

```

Figura 7: Comparación de la secuencia del extremo C-terminal de la GluDH-NADP de *T. cruzi* y *E. coli*. Sobre la secuencia proteica completa de la enzima de *E. coli* se ubica la zona correspondiente al extremo C-terminal de la GluDH-NADP de *T. cruzi*. Las barras verticales indican identidad (I) y los puntos (•) sustituciones conservadas.

Obtención del fragmento C-terminal de la enzima.

Estrategia para la construcción de una sonda.

Utilizando el fragmento de 270 pb correspondiente al extremo C-terminal del gen, se construyó una sonda para intentar, en un nuevo rastreo, la obtención de un clon conteniendo el gen completo.

La digestión combinada con las enzimas BglII y BamHI del plásmido pUC19-GluDH de 7 kpb permitió eliminar gran parte del inserto y del sitio de clonado múltiple (polylinker), dejando solamente el fragmento C-terminal de la GluDH unido al resto del plásmido (figura 8). Las enzimas mencionadas fueron elegidas por diferentes razones: BglII presenta solo un sitio de restricción a la derecha del codón de terminación del gen y no tiene sitio de corte en el plásmido. En cambio, BamHI digiere en el sitio de clonado múltiple a una

distancia aproximada de 4.1 kpb a la derecha de BglII y no tiene sitio de corte en el fragmento del gen (puede también presentar algún sitio desconocido dentro del inserto más allá de BglII).

Con el plásmido religado resultante se transformaron bacterias *E. coli* competentes. Se identificaron las portadoras del plásmido de interés mediante una reacción de PCR sobre cada colonia ("colony PCR") utilizando los oligonucleótidos Rev (reverse) y Fwd (forward) del plásmido.

Para esta amplificación se realizó un ciclo de desnaturalización de 4 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Cuando el producto de la reacción fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa 1.5%, se obtuvo un único fragmento de aproximadamente 600 pb. Sobre el mismo material se realizó una segunda reacción de PCR en idénticas condiciones con el objeto de enriquecer la muestra. El producto obtenido fue secuenciado, coincidiendo completamente con el extremo C-terminal descripto de la GluDH-NADP.

Finalmente, el fragmento de 600 pb fue sometido a la digestión combinada con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI para eliminar los extremos correspondientes a las secuencias de los iniciadores y a restos del sitio de clonado múltiple. El material digerido se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, del cual se eluyó el fragmento de 270 pb para usarlo como sustrato en la preparación de la sonda por el método de "random priming".

Iniciador Rev de pUC19: 5' AGCGGATAACAATTTACACAGGA 3'

Tm: 60°C

Iniciador Fwd de pUC19: 5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'

Tm: 68°C

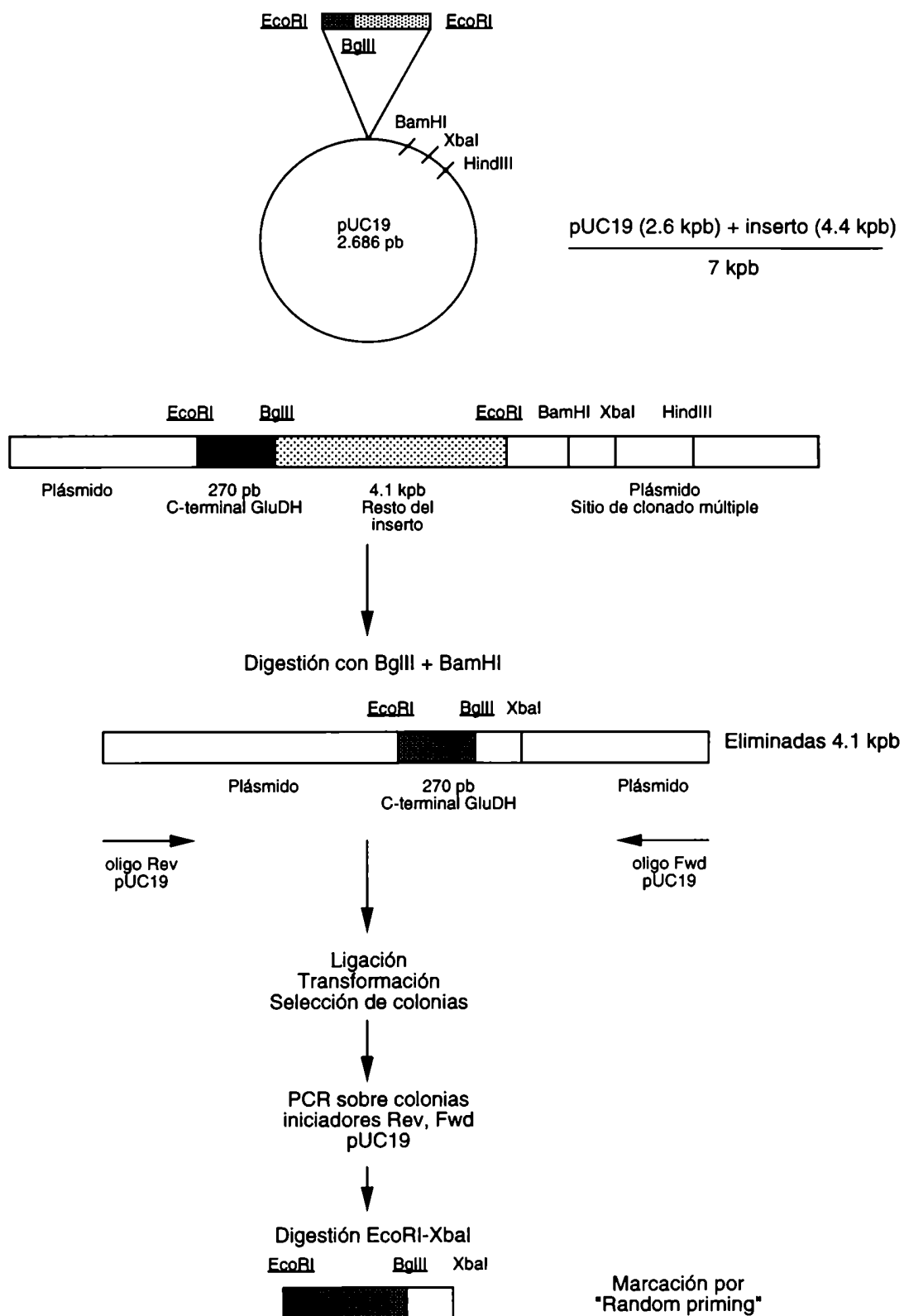


Figura 8: Esquema de la estrategia empleada para la construcción de la sonda.

Rastreo de una biblioteca de expresión genómica de *T. cruzi* en el fago λ gt11 usando una sonda marcada radioactivamente.

Con el objeto de clonar el gen completo y sabiendo que el tamaño del genoma diploide del parásito es de 2×10^8 pb, se rastrearon aproximadamente 1.2×10^5 bacteriófagos de la misma biblioteca de *T. cruzi* M76 en λ gt11, usando la sonda antes mencionada.

Como resultado del rastreo primario se obtuvieron 13 fagos positivos con diferente tipo e intensidad de señal. Solo 5 de ellos fueron confirmados y seguidos en los sucesivos rastreos: λ 2(1), λ 2(2), λ 2(3), λ 6(1), λ 11(1).

Para estimar el tamaño total del inserto contenido en cada uno de ellos, se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos iniciadores Rev y Fwd del fago λ , utilizando como sustrato de la reacción el bacteriófago completo. Además, en forma paralela, se realizó otra reacción de PCR combinando los iniciadores de λ con un oligo TGA, diseñado en base a la secuencia de ADN del extremo C-terminal cuya ubicación se observa en la figura 12 (reconoce parte de la secuencia intergénica, inmediatamente después del codón de terminación del gen). Este último ensayo se realizó para confirmar si los fagos contenían por lo menos la zona C-terminal del gen.

Iniciador TGA: 5' TTTCAATGCTTCCCAACAGAGAT 3'

Tm: 60°C

Iniciador Rev de λ : 5' CAGACCAACTGGTAATGGTAGCG 3'

Tm: 65°C

Iniciador Fwd de λ : 5' ATTGGTGGCGACGACTCCTGGAG 3'

Tm: 68°C

Para ambas amplificaciones se realizó un ciclo de desnaturalización de 4 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Solo se obtuvo un producto de amplificación de un tamaño entre 1500 y 2000 pb al utilizar el fago λ 11(1) como sustrato, combinando los iniciadores Rev de λ con el oligo TGA (figura 9(b)), sugiriendo la posible presencia de una copia del gen cuyo tamaño rondaría los 1400 pb.

La causa probable de la ausencia de productos de amplificación en las restantes reacciones podría ser que los fagos contuvieran insertos demasiado grandes, de difícil amplificación por parte de la enzima Taq polimerasa o simplemente que carecieran de ellos.

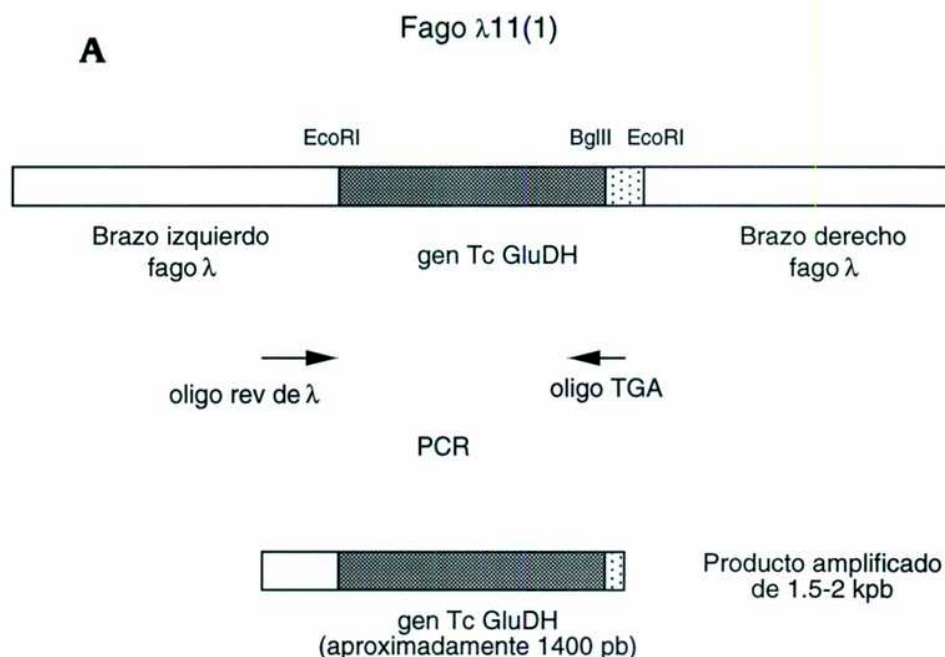


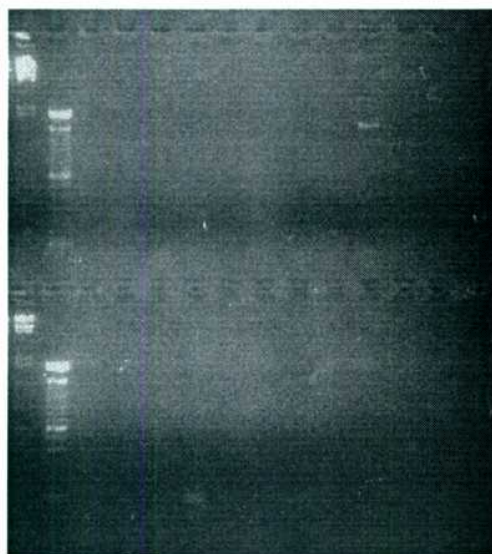
Figura 9: Reacción de PCR sobre los fagos positivos usando los iniciadores rev y fwd (del fago λ) combinados con el oligo TGA.

(A) Esquema de la reacción de PCR sobre el fago λ 11(1).

(B) Gel de agarosa 1% de cada reacción de PCR sobre los fagos positivos. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 30 λ de los cuales solo 5 λ fueron sembrados en un gel de agarosa 1% teñido con BrEt. En las calles pares se sembraron las reacciones que combinan los iniciadores fwd-TGA y en las impares los iniciadores rev-TGA. Fago λ 2(3) calles 1 y 2; fago λ 2(1) calles 3 y 4; fago λ 6(1) calles 5 y 6; fago λ 2(2) calles 7 y 8; fago λ 11(1) calles 9 y 10. Todos los controles realizados dieron los resultados negativos esperados. λ HindIII y la escalera de 100 pb son utilizados como marcadores de peso molecular.

B

λ HindIII
escalera 100 pb
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



2072 pb
1500 pb

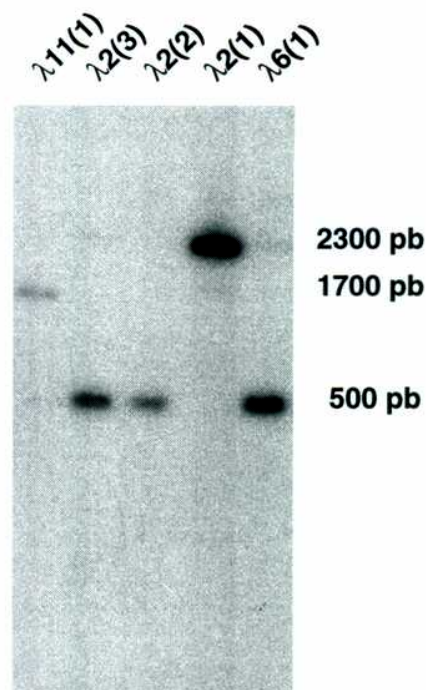
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

Para determinar de manera concreta la presencia del gen (en forma parcial o total) en los fagos positivos, se preparó ADN de cada uno de ellos y se lo sometió al tratamiento con endonucleasas de restricción y posterior análisis por Southern blot usando como sonda el fragmento C-terminal. Los resultados obtenidos se detallan en las figuras 10 y 11.

El tratamiento de los fagos $\lambda 2(2)$, $\lambda 2(3)$ y $\lambda 6(1)$ con EcoRI, permite revelar solo una banda de aproximadamente 500 pb, mientras que en el caso del fago $\lambda 2(1)$ la banda observada es superior a los 2 kpb (figura 10). El fago $\lambda 11(1)$ revela una banda de aproximadamente 1700 pb (entre el marcador de 1353 y el de 2000 pb) cuyo tamaño es similar al obtenido por PCR (figuras 9 y 10).

Figura 10: Southern blot del tratamiento de los fagos positivos con EcoRI.

ADN total de los fagos $\lambda 2(1)$, $\lambda 2(2)$, $\lambda 2(3)$, $\lambda 6(1)$ y $\lambda 11(1)$ fue digerido con la enzima EcoRI en un volumen final de 30 μ l. La digestión completa fue sembrada en un gel de agarosa 1%. Luego de la transferencia se realizó un ensayo de Southern blot utilizando como sonda el fragmento C-terminal del gen.

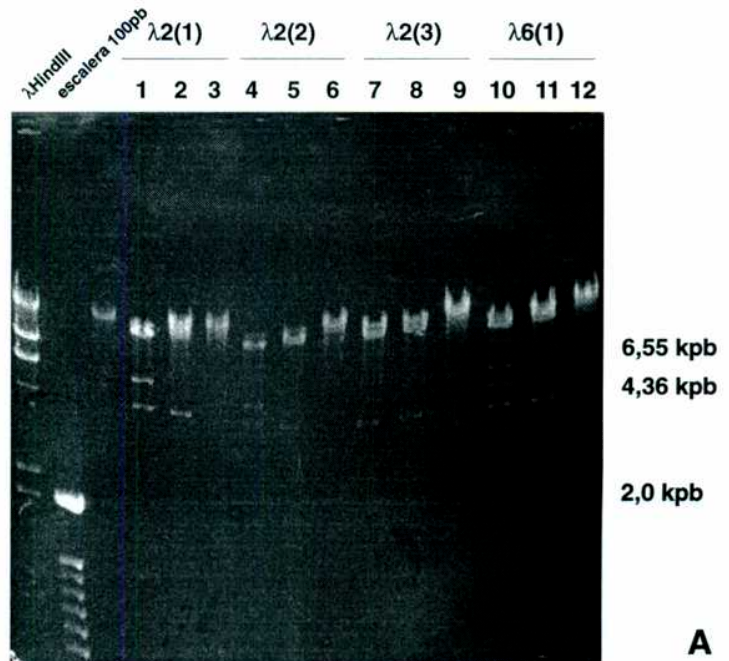


El inconveniente que se presenta al tratar el ADN de los fagos con la enzima EcoRI (para poder liberar los insertos de los brazos del fago λ) es que como el gen contiene un sitio interno para esta enzima en la zona C-terminal, se fracciona en por lo menos dos partes. Solo una de ellas podría ser identificada por la sonda, mientras que la/s otra/s que llevan el resto del gen no podrían detectarse. En el caso de los fagos $\lambda 2(1)$ y $\lambda 11(1)$ no se puede asegurar la presencia de un sitio EcoRI interno.

El análisis de restricción se completó con el tratamiento con las enzimas *SacI* y *KpnI* que permiten la liberación del inserto junto con 2 kpb correspondientes a los brazos del fago λ . Un ensayo de Southern blot nos permitió concluir que los fagos $\lambda 2(1)$ y $\lambda 2(2)$ serían diferentes entre sí y que los fagos $\lambda 2(3)$ y $\lambda 6(1)$ podrían ser iguales. Todos contendrían el gen de la GluDH-NADP (figura 11). El fago $\lambda 11(1)$ parece ser también diferente al resto según los resultados observados en la figura 10.

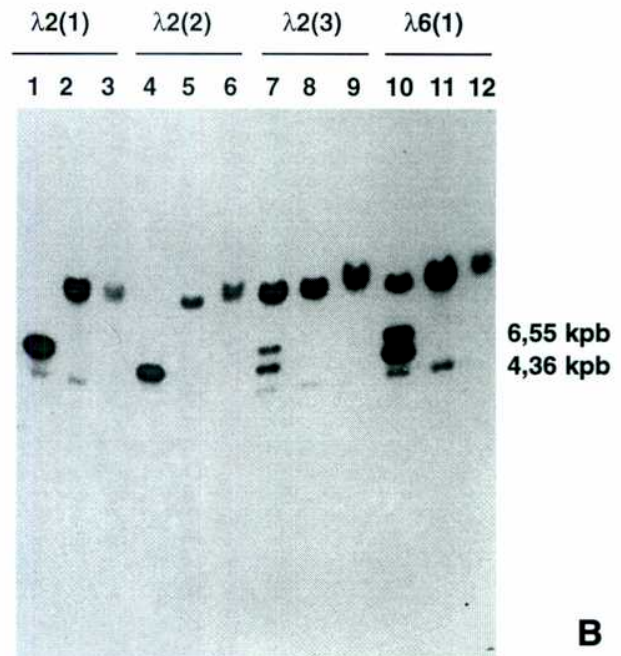
Figura 11: Southern blot del tratamiento de los fagos positivos con *SacI*, *KpnI*.

(a) Gel de agarosa 1%. ADN total de los fagos $\lambda 2(1)$, $\lambda 2(2)$, $\lambda 2(3)$ y $\lambda 6(1)$ fue digerido con las enzimas *SacI* y *KpnI* en un volumen final de 30 μ l. La digestión completa fue sembrada en un gel de agarosa 1% teñido con BrEt. λ HindIII y la escalera de 100 pb son utilizados como marcadores de peso molecular.



A

(b) Ensayo de Southern blot. Luego de la transferencia se realizó un ensayo de Southern blot utilizando como sonda el fragmento C-terminal del gen. *Fago $\lambda 2(1)$* -calle 1: *SacI*-*KpnI*; calle 2: *SacI*; calle 3: *KpnI*. *Fago $\lambda 2(2)$* -calle 4: *SacI*-*KpnI*; calle 5: *SacI*; calle 6: *KpnI*. *Fago $\lambda 2(3)$* -calle 7: *SacI*-*KpnI*; calle 8: *SacI*; calle 9: *KpnI*. *Fago $\lambda 6(1)$* -calle 10: *SacI*-*KpnI*; calle 11: *SacI*; calle 12: *KpnI*.



B

Finalmente, se intentó la amplificación del gen completo a partir de los 5 fagos seleccionados combinando los iniciadores TGA (para reconocer el extremo C-terminal) con un oligonucleótido degenerado (para reconocer la zona N-terminal) diseñado en base a la secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la proteína purificada (Cazzulo *et al.*, 1988b). Las reacciones se realizaron con el fago completo y con su ADN purificado. Se procedió de la misma forma pero utilizando además ADN genómico total de la cepa Tul2 de *T. cruzi* como sustrato.

Nter-1: 5' TATCATATGAARTAYACIAGYGTIGAYGAYTTYATHAA 3'

Tm: 50°C (Secuencia peptídica) MKYTSVDDFIN

Nter-3: 5' AARTGYGTIAARAARCGIGAYCCIAAYCA 3'

Tm: 52°C (Secuencia peptídica) KCVKKRDPNQ

R: A, G

Y: C, T

I: inosina

H: T, C, A

Iniciador TGA: 5' TTTCATGCTTCCCAACAGAGAT 3'

Tm: 60°C

En la figura 12 se muestra la ubicación de los iniciadores utilizados en la reacción. En la zona N-terminal, Nter-1 se une río abajo del codón de iniciación, incluyéndolo, mientras que el Nter-3 lo hace 34 pb río abajo del Nter-1. El iniciador TGA se localiza inmediatamente después del codón de terminación del gen.



El producto de amplificación de la reacción de PCR dió en todos los casos una banda única cuyo tamaño coincide con el marcador de ϕ X174 HaeIII de 1353 pb (figura 13(a) y (b)). Las bandas presentan mayor intensidad al usar como sustrato el ADN purificado de cada fago en comparación con los resultados obtenidos al utilizar el fago completo.

Los fragmentos amplificados provenientes de la reacción con ADN genómico y de los fagos $\lambda 6(1)$ y $\lambda 2(3)$, usando los iniciadores Nter-1 y TGA, fueron purificados y ligados en el pT7 Blue Vector.

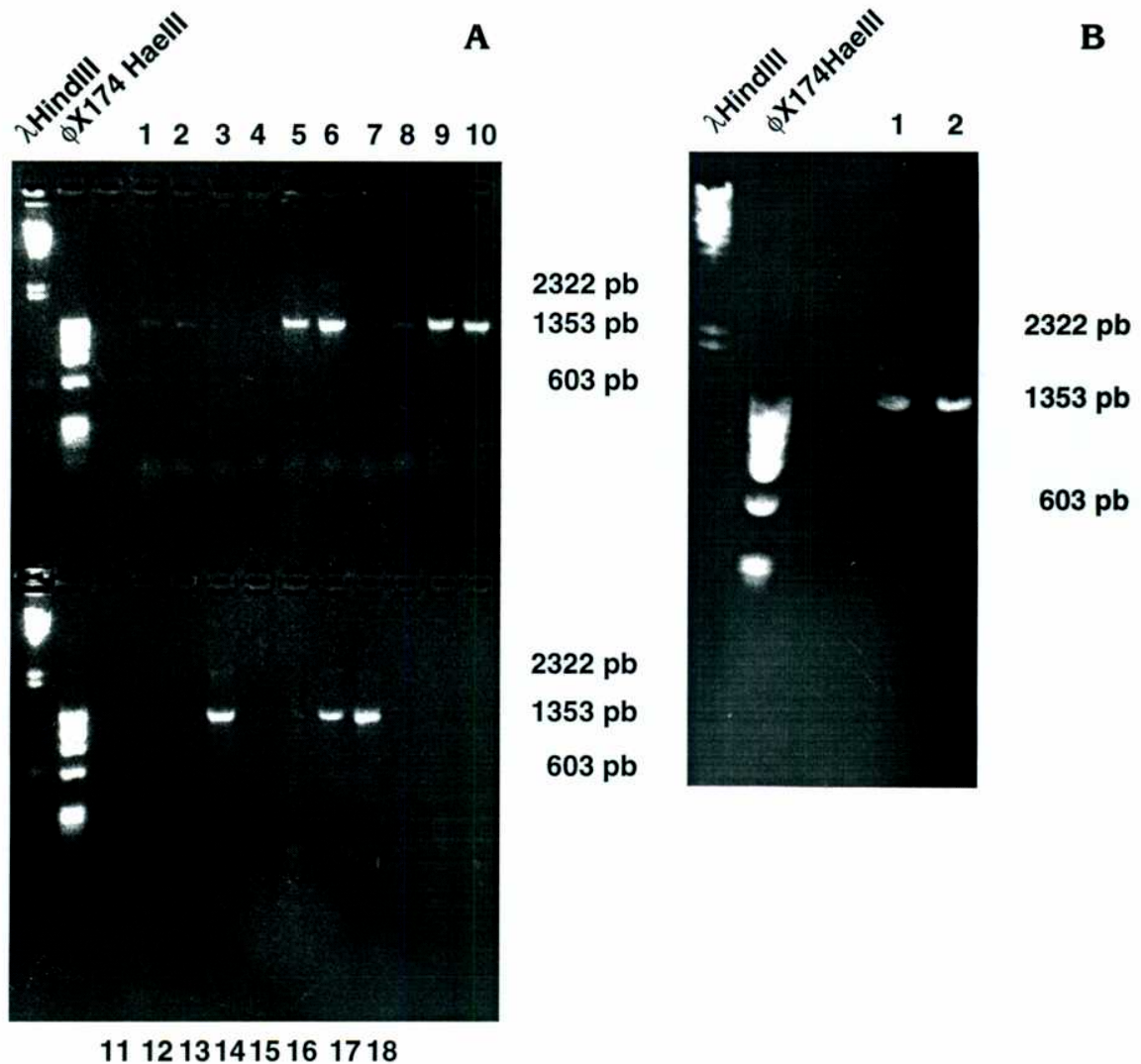


Figura 13: Reacciones de PCR combinando los oligonucleótidos Nter-1 o Nter-3 con TGA.

(a) Gel de agarosa 1% teñido con BrEt de la reacción de PCR realizada sobre los fagos positivos. En las calles impares se sembraron las reacciones realizadas con los iniciadores Nter-1, TGA y en las pares los iniciadores Nter-3, TGA. Calle 1 y 2: fago λ 11(1) completo; calle 3 y 4: fago λ 6(1) completo; calle 5 y 6: ADN del fago λ 6(1); calle 7 y 8: fago λ 2(3) completo; calle 9 y 10: ADN del fago λ 2(3); calle 11 y 12: fago λ 2(2) completo; calle 13 y 14: ADN del fago λ 2(2); calle 15 y 16: fago λ 2(1) completo; calle 17 y 18: ADN del fago λ 2(1).

(b) Gel de agarosa 1% teñido con BrEt de la reacción de PCR realizada utilizando 500 ng de ADN genómico de la cepa Tul2. Calle 1: Nter-1, TGA; calle 2: Nter-3, TGA.

λ HindIII y ϕ X174HaeIII son utilizados como marcadores de peso molecular.

Luego de transformar bacterias *E. coli* competentes (Novablu), se seleccionaron 25 colonias blancas. El ADN de dichas colonias fue corroborado por análisis de restricción con las enzimas NdeI-BamHI (el sitio de clonado EcoRV del pT7 Blue Vector se pierde). Solo 5 colonias contenían el inserto del tamaño esperado y se llamaron: 9(4B), 9(7B) a partir de la reacción de PCR sobre el fago λ 2(3); 5(1S) a partir del fago λ 6(1) y 23(2B), 23(4B) y 24(3S) a partir de la reacción de PCR sobre ADN genómico. Usando los iniciadores Rev y Fwd del plásmido se comenzó la secuenciación del gen. Los 5 clones fueron secuenciados simultáneamente, algunos en forma parcial y otros en forma completa, resultando muy similares entre sí.

Otros oligonucleótidos utilizados para completar la secuenciación del gen.

Int₁: 5' ATGGAYATHAARAAYGTIAARCA 3'

(Secuencia peptídica) MDIKNVKH

Int₂: 5' TGYTTIACRTTYTTDATRTCCAT 3'

(Secuencia peptídica) MDIKNVKH

GDH₁ Sec: 5' ATGGGCGGTGGCGGCAAG 3'

(Secuencia peptídica) MGGGKG

GDH₂ Sec: 5' TCAGACTCCAGCGGG 3'

(Secuencia peptídica) SDSSG

C-ter: 5' CGTTGGCAGCCTTTC 3'

Nter-4: 5' TTTGAGCAGGCGGTTCA 3'

R: A, G

Y: C, T

I: inosina

H: T, C, A

D: T, G, A

De esta forma se obtuvo la secuencia llamada *TcGluDH₁* que corresponde al clon 5(1S) proveniente de la cepa Miranda 76 y la secuencia *TcGluDH₂* correspondiente al clon 23(4B) de la cepa Tulahuén 2 (GenBank Accession Numbers AF009364 y AF009365 respectivamente). Ambos genes, clonados y secuenciados completamente, contienen cada uno 1341 nucleótidos (447 codones incluyendo el codón de terminación TGA), codificando para una proteína de 446 aminoácidos. En la figura 14(a) se observan las secuencias nucleotídicas de ambos genes como también la secuencia de aminoácidos deducida de ellos. Las secuencias proteicas de *TcGluDH₁* y *TcGluDH₂* presentan una identidad del 96% (figura 14(b)).

En la región GGGKGG de la secuencia proteica se encuentra conservado el residuo Lys 128 del sitio activo, marcado con un asterisco en la figura 14(b), deducido por homología con otras GluDHs descriptas en la bibliografía.

Figura 14: Secuencia de los genes *TcGluDH1* y *TcGluDH2* (dos páginas siguientes).

(a) Secuencia nucleotídica de los genes *TcGluDH1* y *TcGluDH2* acompañada de la secuencia de aminoácidos deducida de ellos.

***T. cruzi* GluDH₁: 1 a 1341.**

```

1  ATG AAG TAC ACG AGC GTG GAT GAC TTT ATC AAC AAG TGC GTG AAG AAG CGC GAC CCC AAT
   M  K  Y  T  S  V  D  D  F  I  N  K  C  V  K  K  R  D  P  N>

61  CAA CCC GAA TTT GAG CAG GCG GTT CAT GAA GTA ATG ACC TCG CTT TGG CCT TTT CTG GAA
   Q  P  E  F  E  Q  A  V  H  E  V  M  T  S  L  W  P  F  L  E>

121 AAG CAT CCA GAG TAC TGC CAG GAT TCT CTT CTG GAG CGC CTG GTG GAG CCC GAA CGT GTC
   K  H  P  E  Y  C  Q  D  S  L  L  E  R  L  V  E  P  E  R  V>

181 GTT CAG TTC CGC GTG TCA TGG GTG GAT GAC AAG GGT GAA GTG CAG GTG AAC CGG GCG TGG
   V  Q  F  R  V  S  W  V  D  D  K  G  E  V  Q  V  N  R  A  W>

241 CGT GTT CAT TTC AAC TCC AGC ATT GGC CCA TAC AAG GGC GGC ATG CGG TTC CAC CCC TCA
   R  V  H  F  N  S  S  I  G  P  Y  K  G  G  M  R  F  H  P  S>

301 GTG AAC CTG TCT ATT CTC AAG TTT CTT GGC TTT GAG CAG ACA TTC AAG AAC TCC TTG ACA
   V  N  L  S  I  L  K  F  L  G  F  E  Q  T  F  K  N  S  L  T>

361 ACA CTT CCA ATG GGC GGT GGC AAG GGT GGC TCA GAC TTT GAC CCA AAA GGG AAG AGC GAC
   T  L  P  M  G  G  G  K  G  G  S  D  F  D  P  K  G  K  S  D>

421 GGN GAA GTG ATG CGT TTT TTT CAG GCG CTG ATG ACT GAA CTG TAT CGC CAC CTG GGC GCG
   G  E  V  M  R  F  F  Q  A  L  M  T  E  L  Y  R  H  L  G  A>

481 GAT ACC GAC GTT CCG GCA GGT GAT ATC GGG GTT GGT GGT CGT GAA GTT GGC TAC ATG GCA
   D  T  D  V  P  A  G  D  I  G  V  G  G  R  E  V  G  Y  M  A>

541 GGC ATG ACT CAG AAA CTG ACA AAC AAC AAG GCC TGC AGA TTT ACA GGC AAG GGC ATT TCG
   G  M  T  Q  K  L  T  N  N  K  A  C  R  F  T  G  K  G  I  S>

601 TTT CAA GGG AGT CAG ATG CGC CCC GAG GCT ACG GGC TAC GGT GTT GTC TAC TTT TTG GAT
   F  Q  G  S  Q  M  R  P  E  A  T  G  Y  G  V  V  Y  F  L  D>

661 GCC TTG CTG AAG AAG CAT AAC CAG GAA CTG AAG GGC ATG ACN GTT GTT GTG TCG GGG TCT
   A  L  L  K  K  H  N  Q  E  L  K  G  M  T  V  V  V  S  G  S>

721 GGC AAC GTT GCG CAA TAC GCT GTT AAG AAA TGC CTC CAA CTG GGN GAG AAG GTG CTC AGT
   G  N  V  A  Q  Y  A  V  K  K  C  L  Q  L  G  E  K  V  L  S>

781 GTC TCA GAC TCC AGC GGG ACN GTT GTG GAT GAA AGC GGA TTC ACG AAA GAG AAA CTG AAG
   V  S  D  S  S  G  T  V  V  D  E  S  G  F  T  K  E  K  L  K>

841 GTC TTG ATG GAC ATC AAG AAC GTG AAG CAC GGC ACT GTG GAG GAG TAC GCN AAA GGG TTG
   V  L  M  D  I  K  N  V  K  H  G  T  V  E  E  Y  A  K  G  L>

901 GGG CTT CAG TAC CTA CGC GGG GAA ACC CCA TGG CAC ATC AAG GCG GAT ATT GCT CTT CCG
   G  L  Q  Y  L  R  G  E  T  P  W  H  I  K  A  D  I  A  L  P>

961 TGC GCG ACG CAG AAC GAA CTG GAG CTT GAA GAT GCG AAG GCA CTG ATA AAG AAT GGT GTC
   C  A  T  Q  N  E  L  E  L  E  D  A  K  A  L  I  K  N  G  V>

1021 ACG GTT GTT GCT GAG GGT GCA AAC ATG CCG ACA ACG ACG GAT GCG ACC ATG GAA TTC ATC
   T  V  V  A  E  G  A  N  M  P  T  T  T  D  A  T  M  E  F  I>

1081 AAT GCC GGT GTC TTA TTT GCC CCC GGA AAG GCT GCC AAC GCC AGG GGG GTC GCC ATC TCT
   N  A  G  V  L  F  A  P  G  K  A  A  N  A  R  G  V  A  I  S>

1141 GGT TTG GAG ATG TCG CAG AAC GCA GCG CTA AGC TGG ACA GCC GAG GAG GTG GAG CAA AAA
   G  L  E  M  S  Q  N  A  A  L  S  W  T  A  E  E  V  E  Q  K>

1201 CTC CGC GAG ATC ATG AAC TCC ATC CAC GAC GCG TGC GTG AAA TAT GGC ACA GTG GGT GGC
   L  R  E  I  M  N  S  I  H  D  A  C  V  K  Y  G  T  V  G  G>

1261 AAG ACG AAT TAC GTG AAT GGG GCC AAC ATT GCC GGC TTT GTC AAG GTC GCG GAG GCC ATG
   K  T  N  Y  V  N  G  A  N  I  A  G  F  V  K  V  A  E  A  M>

1321 AAG GGT CTT GGC GTA GTT TGA
      K  G  L  G  V  V  W>

```

***T. cruzi* GluDH₂: 1 a 1341.**

```

1  ATG AAA TAC ACG AGC GTG GAT GAT TTC ATC AAC AAA TGC GTG AAG AAG CGC GAC CCC AAT
    M  K  Y  T  S  V  D  D  F  I  N  K  C  V  K  K  R  D  P  N>

61  CAA CCC GAA TTT GTG CAG GCG GTT CAT GAA GTA ATG ACC TCG CTT TGG CCT TTT CTG GAA
    Q  P  E  F  V  Q  A  V  H  E  V  M  T  S  L  W  P  F  L  E>

121 AAG CAT CCA GAG TAC TGC CAG GAT TCT CTT CTG GAG CGA CTG GTG GAG CCC GAA CGT GTC
    K  H  P  E  Y  C  Q  D  S  L  L  E  R  L  V  E  P  E  R  V>

181 GTT CAG TTC CGC GTG TCA TGG GTG GAT GAC AAG GGT GAA GTG CAG GTG AAC CGG GCG TGG
    V  Q  F  R  V  S  W  V  D  D  K  G  E  V  Q  V  N  R  A  W>

241 CGT GTT CAT TTC AAC TCC AGC ATT GGC CCA TAC AAG GGC GGC ATG CGG TTC CAC CCC TCA
    R  V  H  F  N  S  S  I  G  P  Y  K  G  G  M  R  F  H  P  S>

301 GTG AAC CTG TCT ATT CTC AAG TTT CTT GGC TTT GAG CAG ACA TTC AAG AAC TCC TTG ACA
    V  N  L  S  I  L  K  F  L  G  F  E  Q  T  F  K  N  S  L  T>

361 ACA CTT CCA ATG GGC GGC GGC AAA GGT GGG TCA GAC TTT GAC CCA AAA GGG AAG AGC GAC
    T  L  P  M  G  G  G  K  G  G  S  D  F  D  P  K  G  K  S  D>

421 CGT GAA GTG ATG CGT TTT TGT CAG GCT CTG GTG ACG GAG CTG TAC CGC CAC ATC GGT CCC
    R  E  V  M  R  F  C  Q  A  L  V  T  E  L  Y  R  H  I  G  P>

481 GAT ACG GAT GTT CCA GCT GGT GAC ATC GGC GTT GGC GGT CGC GAG GTT GGC TAC ATG GCA
    D  T  D  V  P  A  G  D  I  G  V  G  G  R  E  V  G  Y  M  A>

541 GGC ATG ACT CAG AAA CTG ACA AAC AAC AAG GCC TGC AGA TTT ACA GGC AAG GGC ATT TCG
    G  M  T  Q  K  L  T  N  N  K  A  C  R  F  T  G  K  G  I  S>

601 TTT CAA GGG AGT CAG ATG CGC CCC GAG GCT ACG GGC TAC GGT GTT GTC TAC TTT TTG GAT
    F  Q  G  S  Q  M  R  P  E  A  T  G  Y  G  V  V  Y  F  L  D>

661 GCC TTG CTG AAG AAG CAT AAC CAG GAA CTG AAG GGG ATG ACA GTT GTT GTG TCG GGG TCT
    A  L  L  K  K  H  N  Q  E  L  K  G  M  T  V  V  V  S  G  S>

721 GGC AAC GTT GCG CAA TAC CCT GTT GAG AAA TGC CTC CAA CTG GGC GCG AAG GTG CTC AGT
    G  N  V  A  Q  Y  P  V  E  K  C  L  Q  L  G  A  K  V  L  S>

781 GTC TCA GAC TCA CGG GGT TGT GTG CAT GAC GTT GAG GGC TTC ACC CCT GAA AAA CTG AAG
    V  S  D  S  R  G  C  V  H  D  V  E  G  F  T  P  E  K  L  K>

841 GTC TTG ATG GAC ATC AAG AAC GTG AAG CAC GGC ACT GTG GAG GAA TAC ACA AAA GGG TTG
    V  L  M  D  I  K  N  V  K  H  G  T  V  E  E  Y  T  K  G  L>

901 GGG CTT CAG TAC CTA CGC GGG GAA ACC CCA TGG CAC ATC AAG GCG GAT ATT GCT CTT CCG
    G  L  Q  Y  L  R  G  E  T  P  W  H  I  K  A  D  I  A  L  P>

961 TGC GCG ACG CAG AAC GAA CTG GAG CTT GAA GAT GCG AAG GCA CTG ATA AAG AAT GGT GTC
    C  A  T  Q  N  E  L  E  L  E  D  A  K  A  L  I  K  N  G  V>

1021 ACG GTT GTT GCT GAG GGT GCA AAC ATG CCG ACA ACG ACG GAT GCG ACC ATG GAA TTC ATC
    T  V  V  A  E  G  A  N  M  P  T  T  T  D  A  T  M  E  F  I>

1081 AAT GCC GGT GTC TTA TTT GCC CCC GGA AAG GCT GCC AAC GCC AGG GGG GTC GCC ATC TCT
    N  A  G  V  L  F  A  P  G  K  A  A  N  A  R  G  V  A  I  S>

1141 GGT TTG GAG ATG TCG CAG AAC GCA GCG CTA AGC TGG ACA GCC GAG GAG GTG GAG CAA AAA
    G  L  E  M  S  Q  N  A  A  L  S  W  T  A  E  E  V  E  Q  K>

1201 CTC CGC GAG ATC ATG AAC TCC ATC CAC GAC GCG TGC GTG AAA TAT GGC ACA GTG GGT GGC
    L  R  E  I  M  N  S  I  H  D  A  C  V  K  Y  G  T  V  G  G>

1261 AAG ACG AAT TAC GTG AAT GGG GCC AAC ATT GCC GGC TTT GTC AAG GTC GCG GAG GCC ATG
    K  T  N  Y  V  N  G  A  N  I  A  G  F  V  K  V  A  E  A  M>

1321 AAG GGT CTT GGC GTA GTT TGA
    K  G  L  G  V  V  *>

```


(a) Comparación de la secuencia de aminoácidos entre *TcGluDH*₁, *TcGluDH*₂ y las GluDHs de *E. coli* (Valle *et al.*, 1983), *S. thyphimurium* (Bansal *et al.*, 1989), *H. influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), *G. intestinalis* (Yee and Dennis, 1992), *C. sorokiniana* (Cock *et al.*, 1991), *N. crassa* (Kinnard and Fincham 1983) y *S. cerevisiae* (Nagasu and Hall, 1985). Para dicha comparación se utilizó el programa de alineamiento Múltiple de Secuencia, Megalign, de Lasergene (DNA STAR, Inc, Madison, WI, USA) que emplea el algoritmo de Jotun Hein (Hein, 1990). Los residuos marcados indican identidad con respecto a la secuencia *TcGluDH*₁.

Figure 6

Sequence alignment of GluDH from various organisms. The alignment shows conserved regions across different species, with some residues highlighted in black boxes indicating specific amino acid positions or mutations.

The sequences shown are:

- Tc GluDH 1
- Tc GluDH 2
- Escherichia coli
- Salmonella typhimurium
- Haemophilus influenzae
- Giardia intestinalis
- Chlorella sorokiniana
- Neurospora crassa
- Saccharomyces cerevisiae

The alignment includes residue numbers on the left and right sides, corresponding to the sequence positions. Conserved regions are indicated by black boxes, highlighting specific amino acid positions or mutations across the different GluDH proteins.

122 Tc GluDH 1
 122 Tc GluDH 2
 122 Escherichia coli
 122 Salmonella typhimurium
 122 Haemophilus influenzae
 119 Giardia intestinalis
 196 Chlorella sorokiniana
 108 Neurospora crassa
 105 Saccharomyces cerevisiae

162 Tc GluDH 1
 162 Tc GluDH 2
 162 Escherichia coli
 162 Salmonella typhimurium
 162 Haemophilus influenzae
 159 Giardia intestinalis
 236 Q Chlorella sorokiniana
 148 Neurospora crassa
 145 Saccharomyces cerevisiae

202 Tc GluDH 1
 202 Tc GluDH 2
 202 G Escherichia coli
 202 G Salmonella typhimurium
 202 G Haemophilus influenzae
 199 G Giardia intestinalis
 276 G Chlorella sorokiniana
 188 G Neurospora crassa
 185 G Saccharomyces cerevisiae

239 Tc GluDH 1
 239 Tc GluDH 2
 239 Escherichia coli
 239 Salmonella typhimurium
 239 Haemophilus influenzae
 236 Giardia intestinalis
 313 Chlorella sorokiniana
 226 Neurospora crassa
 225 Saccharomyces cerevisiae

277 Tc GluDH 1
 277 Tc GluDH 2
 277 Escherichia coli
 277 Salmonella typhimurium
 277 Haemophilus influenzae
 274 Giardia intestinalis
 351 Chlorella sorokiniana
 266 Neurospora crassa
 263 Saccharomyces cerevisiae

```

306 - - - - - Tc GluDH 1
306 - - - - - Tc GluDH 2
306 E - Q Q S - L - - P V - - - - - D V D A A H Q - - A - - K Escherichia coli
306 E - Q Q S - V - - P V - - - - - D V D A A R V - - A - - K Salmonella typhimurium
306 E - K R E - V - - Q V - - - - - S A Q R - - - - - K Haemophilus influenzae
304 E - K K E C F E G Q M C I M - - - - - V S G D A T R - - V G L - - L K Giardia intestinalis
380 G D R R K E - L D C Q V F - - - - - I D E H A E L - - H - - C Q Chlorella sorokiniana
294 E - A R L - H V G - V - - - - - V S K - E E G - L A A - - C K Neurospora crassa
297 A - A R T - H V S N V - - - - - V S G D E - - - - - V A S - - - K Saccharomyces cerevisiae

```

```

342 - - - - - Tc GluDH 1
342 - - - - - Tc GluDH 2
342 A - - - - - I E - - E L - - Q Q - - - - - A - - - - - K Escherichia coli
342 A - - - - - I E - - D L - - L E - - - - - A - - - - - K Salmonella typhimurium
342 L - - - - - I E - - E A L L A - - D - - - - - G - - - - - K Haemophilus influenzae
343 F - - - - - S A E - - V H V Y H A K - - M - - - - - Y G P A K A S Giardia intestinalis
419 Y - - - - - S N E - - I H K Y N K - - I I - - - - - Y C P G K A A Chlorella sorokiniana
332 F - - - - - S G C - - L E - - I E V - - E - - N R K E K K G - - E A V W Y A P G K A A Neurospora crassa
335 F - - - - - G S P E - - I S V - - E T - - R S T A T N A K D A V W - - G P P A A Saccharomyces cerevisiae

```

```

373 - - - - - Tc GluDH 1
373 - - - - - Tc GluDH 2
373 G - - - - - T A - - - - - R G - - K A E K - - D A R - - H H - - L D - - H H A Escherichia coli
373 G - - - - - T A - - - - - R K A E K - - D A R - - H H - - L D - - H H A Salmonella typhimurium
373 G - - - - - T A - - - - - S S Q R Y - - A - - - - - D A Q - - H R - - L D - - H A N Haemophilus influenzae
374 G - - - - - S V - - - - - S V R - - Q - - A - - - - - D - - - - - G - - - - - R G - - F V A Giardia intestinalis
450 G - - - - - V T - - - - - R M S - - N - - - - - R - - - - - E - - - - - R - - - - - K D I Y E S Chlorella sorokiniana
370 C G - - - - - V A - - - - - S Q R - - N - - T Q A - - - - - D E - - - - - K D - - - - - M K N A F F N Neurospora crassa
375 L G - - - - - V A - - - - - S Q K V T - - - - - A E R - - - - - D - - - - - E - - - - - K K - - - - - M I N C F N D Saccharomyces cerevisiae

```

```

412 - - - - - Tc GluDH 1
412 - - - - - Tc GluDH 2
413 E - - - - - H G E - - Q - - - - - - - - - - - Q - - - - - A N I A G F V K V Escherichia coli
413 E - - - - - G D N K - H - - - - - - - - - - - Q - - - - - A N I A G F V K V Salmonella typhimurium
413 K - - - - - Y G T I E - - - - - Q E - N - - I - - - - - - V - - - - - A N V A G F V K V Haemophilus influenzae
414 R D - - - - - T A - - - - - K K Y G H P K - - - - - - - - - - - Q M - - - - - A N I A G F L F V Giardia intestinalis
490 A M G - - - - - P S - - - - - R E Y N - - V - - - - - - D L A A - - - - - A N I A G F T K V Chlorella sorokiniana
410 G L N - - - - - T A - - - - - K T Y - - - - - V E A A E G E L P S L - - A - - - - - S N I A G F V K V Neurospora crassa
415 I Q - - - - - A A - - - - - Q E Y S - - - - - E K N T N T L P S L - - K - - - - - A N I A S F V M V Saccharomyces cerevisiae

```

```

437 - - - - - Tc GluDH 1
437 - - - - - Tc GluDH 2
438 D - - - - - L A Q - - - - - I - - - - - Escherichia coli
438 D - - - - - L A Q - - - - - I - - - - - Salmonella typhimurium
440 D - - - - - L A Q - - - - - Y - - - - - Haemophilus influenzae
440 D S - - - - - I E Q - - - - - C - - - - - Giardia intestinalis
514 D - - - - - V A Q - - - - - A - - - - - Chlorella sorokiniana
441 Q - - - - - H D Q - - - - - D W W S K - - N - - - - - Neurospora crassa
447 D - - - - - L D Q - - - - - D - - - - - - - - - - F - - - - - Saccharomyces cerevisiae

```

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid bright cobalt) residues that match Tc GluDH 1 exactly.

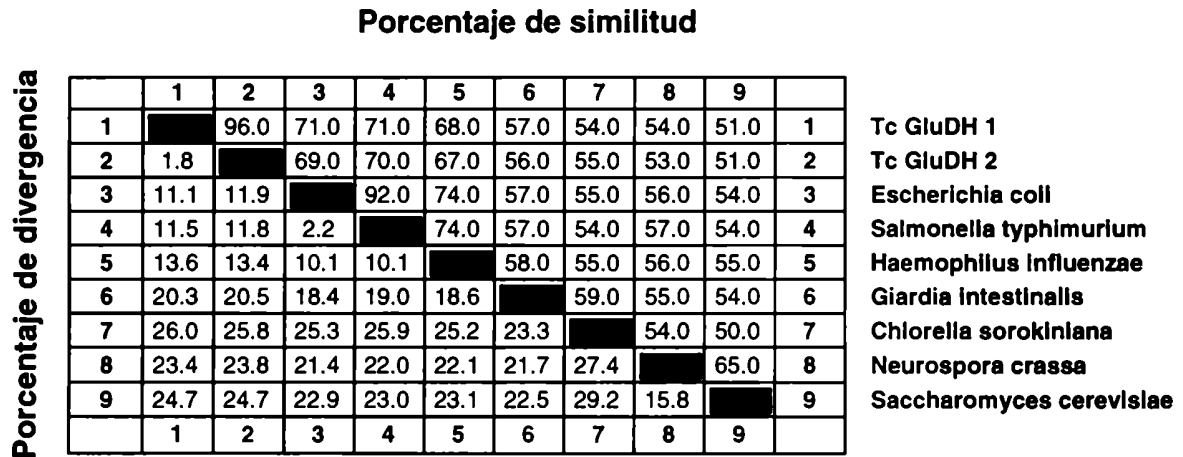


Figura 15: Comparación de la GluDH-NADP de *T. cruzi* con las GluDHs del banco de datos.

(a) Tabla indicando el grado de homología entre las secuencias de las enzimas mencionadas.

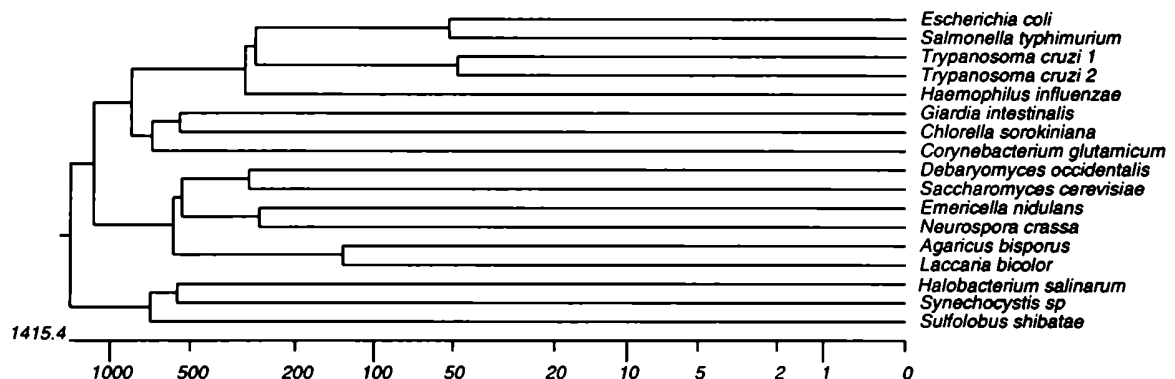


Figura 15: Comparación de la GluDH-NADP de *T. cruzi* con las GluDHs del banco de datos.

(b) Arbol filogenético de todas las GluDH-NADP dependientes conocidas del banco de datos. La secuencia de TcGluDH₁ fue comparada con la de TcGluDH₂ y con las GluDHs de *E. coli* (Valle et al., 1983), *S. typhimurium* (Bansal et al., 1989), *H. influenzae* (Fleischmann et al., 1995), *G. intestinalis* (Yee and Dennis, 1992), *C. sorokiniana* (Cock et al., 1991), *Corynebacterium glutamicum* (Börmann et al., 1992), *Debaryomyces occidentalis* (De Zoysa et al., 1991), *S. cerevisiae* (Nagasu and Hall, 1985), *Emericella nidulans* (Hawkins et al., 1989), *N. crassa* (Kinnard and Fincham, 1983), *Agaricus bisporus* (Schaap et al., 1996), *Laccaria bicolor* (Swiss-Prot Accession Number P54388), *H. salinarum* (Benachenhau and Baldacci, 1991), *Synechocystis sp* (Chávez et al., 1995) y *S. shibatae* (Benachenhau-Lahfa et al., 1994). Para dicha comparación se utilizó el programa de alineamiento Múltiple de Secuencia, Megalign, de Lasergene (DNA STAR, Inc, Madison, WI, USA) que emplea el algoritmo de Jotun Hein (Hein, 1990).

El análisis de la preferencia en el uso de codones de la GluDH-NADP de *T. cruzi* (figura 16 (a y b)) mostró que para el aminoácido leucina (L) rara vez se utiliza el codón UUA, lo mismo que para la valina (V) el codón GUA, al igual que en *E. coli*. Sin embargo el codón preferido para (V) en *T. cruzi* es GUG y en *E. coli* es GUU. Además se detectaron diferencias entre ambos organismos en las preferencias para los aminoácidos prolina (P), CCC en *T. cruzi* sobre CCG en *E. coli*, treonina (T), ACA o ACG en *T. cruzi* sobre ACC en *E. coli*. Para alanina (A), en *T. cruzi* rara vez se utiliza el codón GCA lo mismo que para Tirosina (Y) el codón UAU. Para asparagina (N), lisina (K) y arginina (R) se prefiere AAC, AAG y CGC respectivamente en la GluDH-NADP de *T. cruzi*. Para la glicina (G) el codón usado con mayor frecuencia en ambos genes es GGC.

<i>E. coli</i> GluDH-NADP											
453 CODONES											
MW: 48933 DALTON											
TTT	PHE	F	11	TCT	SER	S	4	TAT	TYR	Y	5
TTC	PHE	F	11	TCC	SER	S	5	TAC	TYR	Y	5
TTA	LEU	L	1	TCA	SER	S	5	TAA	OCH	Z	1
TTG	LEU	L	1	TCG	SER	S	1	TAG	AMB	Z	0
CTT	LEU	L	6	CCT	PRO	P	2	CAT	HIS	H	6
CTC	LEU	L	6	CCC	PRO	P	0	CAC	HIS	H	4
CTA	LEU	L	3	CCA	PRO	P	1	CAA	GLN	Q	8
CTG	LEU	L	18	CCG	PRO	P	12	CAG	GLN	Q	15
ATT	ILE	I	4	ACT	THR	T	6	AAT	ASN	N	9
ATC	ILE	I	12	ACC	THR	T	11	AAC	ASN	N	9
ATA	ILE	I	1	ACA	THR	T	4	AAA	LYS	K	18
ATG	MET	M	18	ACG	THR	T	1	AAG	LYS	K	4
GTT	VAL	V	17	GCT	ALA	A	8	GAT	ASP	D	14
GTC	VAL	V	8	GCC	ALA	A	17	GAC	ASP	D	5
GTA	VAL	V	5	GCA	ALA	A	10	GAA	GLU	E	23
GTG	VAL	V	9	GCG	ALA	A	13	GAG	GLU	E	8
TGT	CYS	C	1	CGT	ARG	R	9	GGT	GLY	G	21
TGC	CYS	C	3	CGC	ARG	R	12	GGC	GLY	G	22
TGA	OPA	Z	1	CGA	ARG	R	1	GGA	GLY	G	2
TGG	TRP	W	5	CGG	ARG	R	0	GGG	GLY	G	4

Figura 16(a): Preferencia en el uso de codones de la GluDH-NADP de *E. coli*.

T. cruzi GluDH2
447 CODONES
MW: 48776 DALTON

TTT PHE F 11	TCT SER S 4	TAT TYR Y 1	TGT CYS C 2
TTC PHE F 7	TCC SER S 3	TAC TYR Y 11	TGC CYS C 6
TTA LEU L 1	TCA SER S 5	TAA OCH Z -	TGA OPA Z 1
TTG LEU L 6	TCG SER S 4	TAG AMB Z -	TGG TRP W 5
CTT LEU L 8	CCT PRO P 3	CAT HIS H 5	CGT ARG R 4
CTC LEU L 4	CCC PRO P 7	CAC HIS H 5	CGC ARG R 7
CTA LEU L 2	CCA PRO P 6	CAA GLN Q 5	CGA ARG R 1
CTG LEU L 13	CCG PRO P 2	CAG GLN Q 12	CGG ARG R 3
ATT ILE I 5	ACT THR T 2	AAT ASN N 5	AGT SER S 2
ATC ILE I 9	ACC THR T 4	AAC ASN N 16	AGC SER S 4
ATA ILE I 1	ACA THR T 10	AAA LYS K 10	AGA ARG R 1
ATG MET M 15	ACG THR T 9	AAG LYS K 24	AGG ARG R 1
GTT VAL V 15	GCT ALA A 6	GAT ASP D 10	GGT GLY G 13
GTC VAL V 9	GCC ALA A 11	GAC ASP D 10	GGC GLY G 22
GTA VAL V 2	GCA ALA A 4	GAA GLU E 13	GGA GLY G 1
GTG VAL V 20	GCG ALA A 11	GAG GLU E 18	GGG GLY G 10

Figura 16(b): Preferencia en el uso de codones de la GluDH-NADP de *T. cruzi*.

El gen completo *TcGluDH1* fue utilizado como sonda para determinar el número de genes y para detectar su ubicación cromosomal en distintas cepas y clones del parásito. Por otro lado, se estudió la expresión del ARNm correspondiente y se buscaron genes homólogos en otros Trypanosomátidos.

Estudios estructurales del gen.

Southern blot sobre ADN genómico.

El ADN genómico de las cepas Tul2 y RA y del clon CA-1/72 de *Trypanosoma cruzi*, y el ADN de *C. fasciculata*, *L. mexicana* y *T. rangeli* fue digerido con las siguientes endonucleasas de restricción: EcoRI, HindIII, PstI, BglII, SspI y DraI. Los fragmentos de ADN obtenidos luego de ser fraccionados en un gel de agarosa 1%, fueron transferidos a un filtro de nitrocelulosa. Dicho filtro fue procesado como se detalla en Materiales y Métodos, prehibridizado y finalmente enfrentado, según el caso, con una sonda correspondiente al extremo C-terminal (figura 17 (a)) o con una sonda conteniendo el gen completo *TcGluDH1* (figura 17 (b)).

El patrón de bandas resultante de las digestiones del ADN genómico de la cepa Tul2, revelado con cualquiera de las dos sondas, sugiere la presencia de más de un gen por genoma haploide. Al digerir el ADN con la enzima BglII, la sonda reconoce un fragmento de aproximadamente 2300-2500 pb que contendría por lo menos una copia del gen completo más un adicional de 1000 pb.

La cepa RA presenta un patrón de restricción bastante semejante al de Tul2 en las condiciones previamente descritas, salvo algunas bandas en el caso del tratamiento con las enzimas HindIII y PstI.

En cambio, el Southern blot realizado con el clon CA-1/72 reveló solo bandas únicas en todos los tratamientos. Sin embargo la banda obtenida por digestión con BglII coincide con el tamaño de 2500 pb presente en las cepas Tul2 y RA.

Las señales más nítidas se detectaron en las cepas y clones de *T. cruzi* y en *T. rangeli*, sobretudo al utilizar la sonda correspondiente al gen completo y en condiciones muy estrictas. A pesar de la claridad de las señales, el patrón de bandas observado en *T. rangeli* resultó ser muy diferente al de Tul2.

En cambio, en los Southern blots de *C. fasciculata* y *L. mexicana* no se observaron señales, ni siquiera en condiciones de lavado menos estrictas. Estos resultados sugieren por un lado la presencia de por lo menos dos genes para la GluDH-NADP en los primeros organismos mencionados y genes diferentes, posiblemente poco homólogos en *C. fasciculata* y *L. mexicana* (figura 17 (b)).

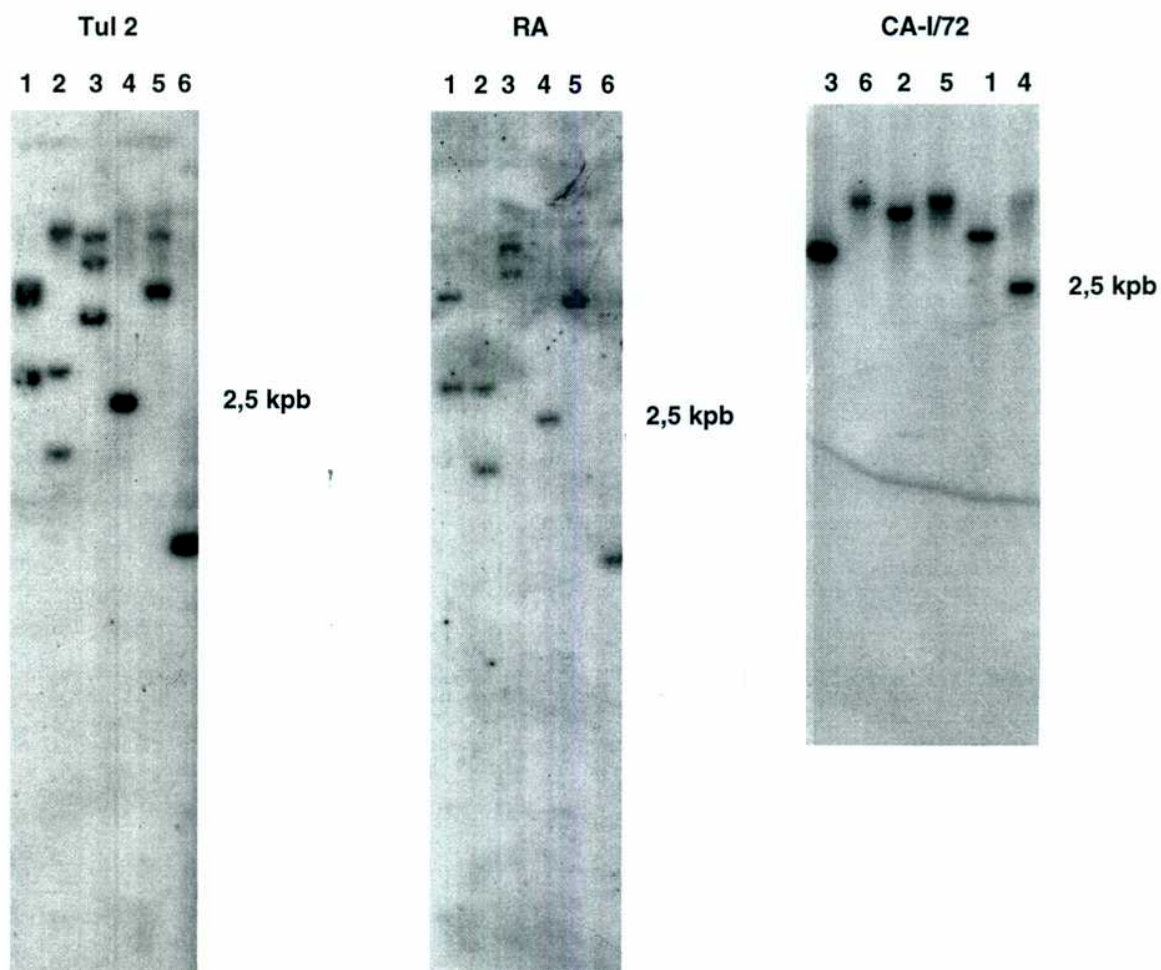


Figura 17: Ensayo de Southern blot sobre ADN genómico de distintos parásitos, cepas y clones.
(a) Entre 5 y 10 μ g de ADN total de las cepas Tul2, RA y del clon CA-I/72 fueron digeridos con las siguientes enzimas de restricción: calle 1: EcoRI; calle 2: HindIII; calle 3: PstI; calle 4: BglII; calle 5: SspI; calle 6: DraI. Los fragmentos obtenidos fueron enfrentados, en ensayos de Southern blot, con la sonda de 270 pb correspondientes al extremo C-terminal de la enzima.

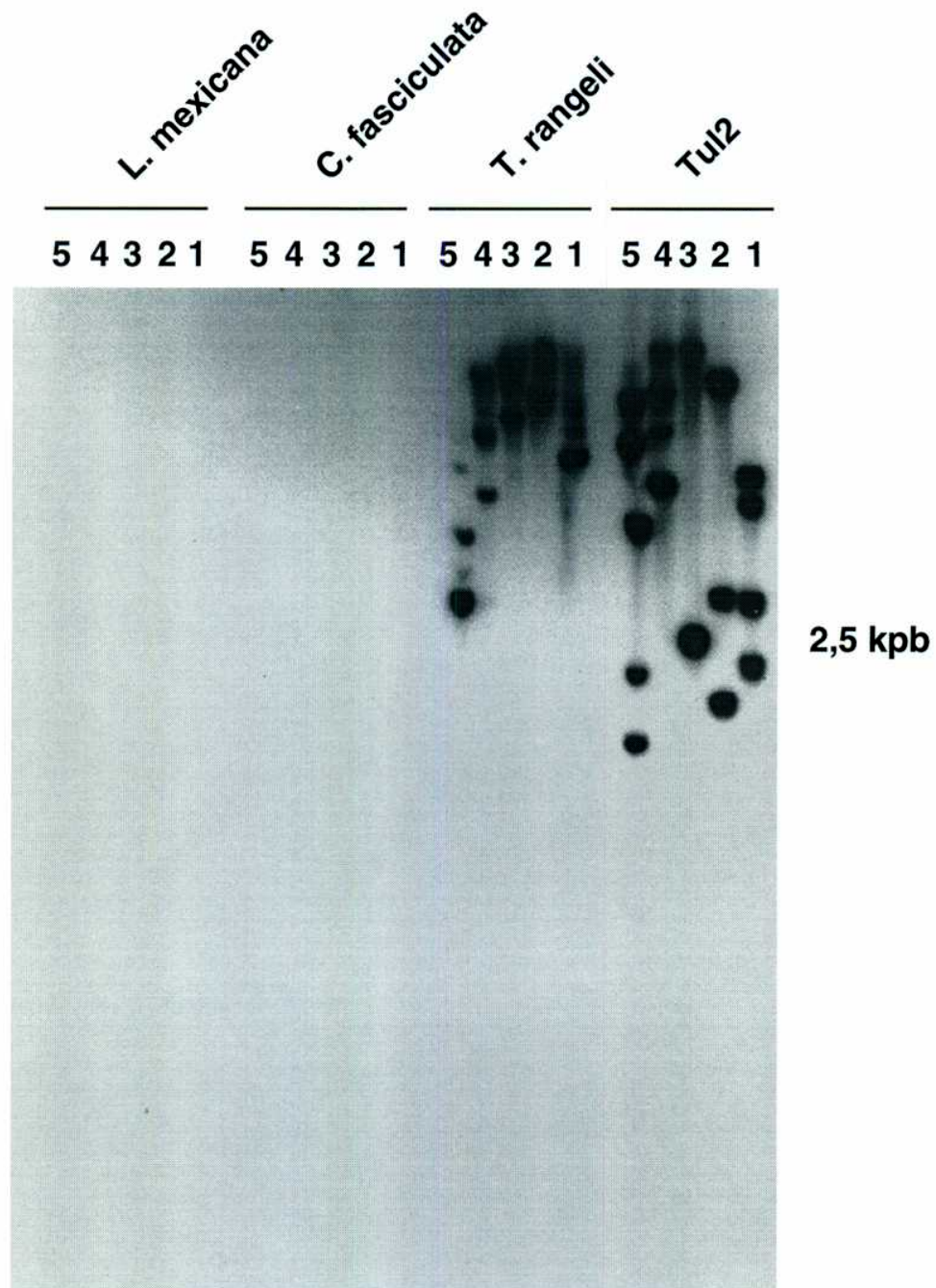


Figura 17: Ensayo de Southern blot sobre ADN genómico de distintos parásitos, cepas y clones.
 (b) Entre 5 y 10 μ g de ADN total de las cepas Tul2 de *T. cruzi*, *T. rangeli* LDG stock, *C. fasciculata* y *L. mexicana* fueron digeridos con las siguientes enzimas de restricción: calle 1: EcoRI; calle 2: HindIII; calle 3: BglII; calle 4: SspI; calle 5: PstI. Los fragmentos obtenidos fueron enfrentados, en ensayos de Southern blot, con una sonda correspondiente al gen completo *TcGluDH₁*.

Detección de polimorfismos con enzimas de restricción.

Con el objeto de determinar posibles polimorfismos en el gen de estudio, se realizó un mapa de restricción del producto de 1350 pb correspondiente al gen completo, obtenido de la reacción de PCR de los fagos positivos y de ADN genómico. Conociendo la secuencia nucleotídica del gen se eligieron las enzimas de restricción EcoRI, BglII, BamHI, HindIII y KpnI. Las enzimas BamHI, HindIII y KpnI no presentan sitios de corte dentro del gen, mientras que EcoRI corta cerca del extremo C-terminal y BglII después del codón de terminación.

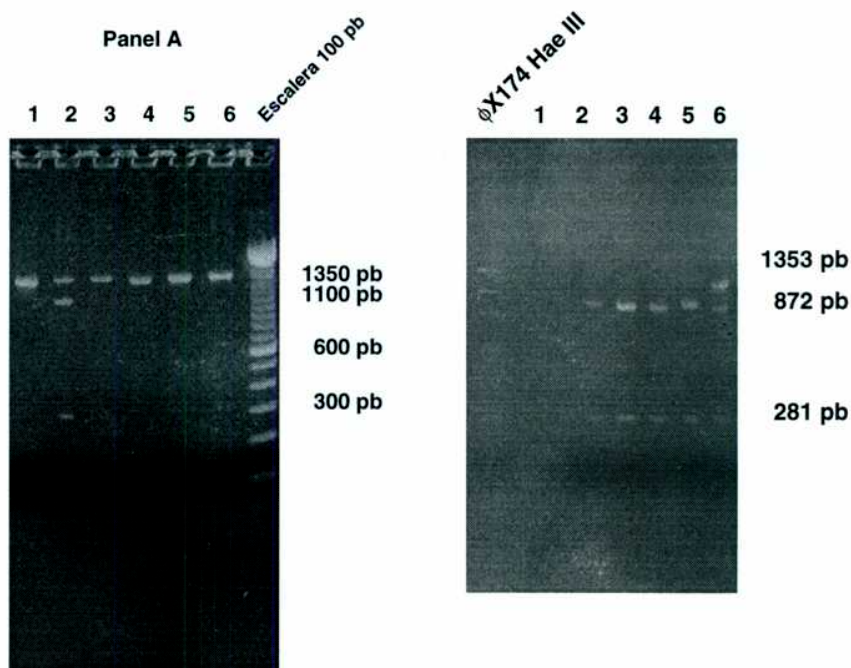
Como puede observarse en la figura 18, el patrón de restricción generado sobre el material proveniente del ADN genómico evidencia un polimorfismo en el sitio EcoRI a diferencia del obtenido sobre los distintos fagos positivos. Esta enzima permitió distinguir 2 clases de genes que codifican para la GluDH-NADP. Con el resto de las endonucleasas utilizadas no se detectaron diferencias.

Figura 18: Polimorfismo en el sitio EcoRI.

El ADN proveniente de las reacciones de PCR fue digerido por varias horas con endonucleasas de restricción. Panel A: digestiones del ADN de la reacción de PCR sobre ADN genómico. La digestión completa fue sembrada en un gel de agarosa 1,5% teñido con BrEt. Calle 1: ADN sin digerir; calle 2: EcoRI; calle 3: HindIII; calle 4: BglII; calle 5: BamHI; calle 6: KpnI. La escalera de 100 pb fue utilizada como marcador de peso molecular.

Panel B: Digestión con EcoRI del producto de PCR

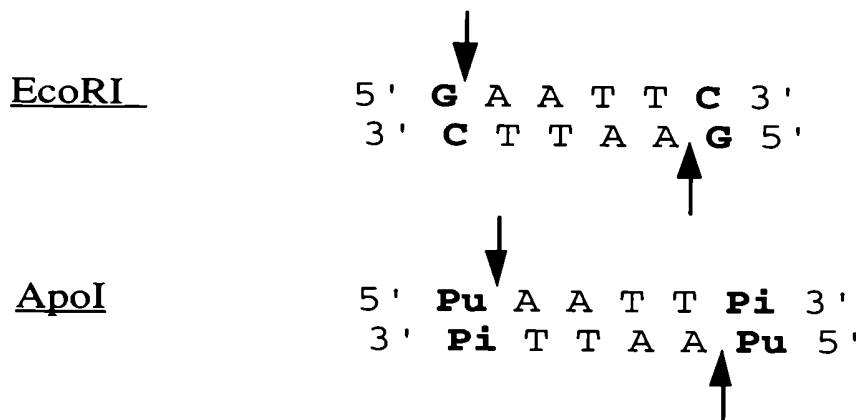
realizado sobre los fagos positivos. Calle 1: PCR fago λ 11(1); calle 2: PCR fago λ 6(1); calle 3: PCR fago λ 2(3); calle 4: PCR fago λ 2(2); calle 5: PCR fago λ 2(1); calle 6: PCR genómico. ϕ X174HaeIII fue utilizado como marcador de peso molecular.



Estos resultados acerca de la presencia de más de un gen que codifica para la GluDH-NADP en el ADN genómico, son coherentes con los obtenidos en los experimentos de Southern blot.

Para corroborar los datos mencionados se trataron los mismos productos de PCR con la enzima *ApoI* cuyo sitio de restricción contiene al sitio *EcoRI*, obteniéndose un patrón de restricción semejante al de la enzima *EcoRI*.

Si la digestión del producto de PCR hubiera sido insuficiente, los fragmentos obtenidos deberían mostrar diferente intensidad.



Pu: purina (A, G)

Pi: pirimidina (C, T)

Polimorfismos detectados por secuenciación en el extremo N-terminal.

Se determinó la secuencia del extremo 5' de diferentes clones, ya sea provenientes de reacciones de PCR sobre ADN genómico como de ADN de los fagos positivos.

El resultado de la comparación de tres clones genómicos de la cepa M76 y 3 clones de la cepa Tul2, uno de ADN genómico y dos de ADNc mostró que todos presentaban cambios conservativos de nucleótidos.

Como se detalla en la figura 19, se encontraron varias diferencias en una zona de aproximadamente 40 nucleótidos del extremo 5' del gen. Todas estas diferencias corresponden a cambios en una sola base, siempre ubicadas en la tercera posición de cada codón sin que los mismos se traduzcan en cambios de la secuencia aminoacídica.

Solo en el caso del aminoácido serina (S) se produce un cambio completo del codón (las tres bases), que también resulta silencioso, ya que en el código genético hay seis tripletes que codifican para dicho residuo.

Estos resultados sugieren que existen por lo menos 3 genes diferentes que codifican para la GluDH-NADP en ambas cepas de parásitos, coincidiendo con los resultados obtenidos del Southern blot, aunque no podemos conocer si todos ellos son activos o son pseudogenes.

Como el ADN utilizado en los experimentos proviene de reacciones de PCR y la Taq polimerasa tiene una tasa de error estimada en 2×10^{-4} nucleótidos/ciclo (1/5000), se puede pensar que podría tratarse de errores. Sin embargo, aunque los errores introducidos por la enzima no pueden excluirse, la naturaleza conservativa o silenciosa de todos los cambios detectados hace que esta sea una alternativa poco probable.

```

1  A T G A A G T A C A C G A G C G T G G A T G A C T T T A T C A A C A A G T G C G N-ter T. cruzi GluDH 1
1  A T G A A G T A T A C G A G T G T G G A C G A T T T T A T T A A C A A G T G C G N-ter fago 1
1  A T G A A A T A C A C G A G C G T G G A C G A T T T C A T T A A C A A G T G C G N-ter fago 2
1  A T G A A A T A C A C G A G C G T G G A T G A T T T C A T C A A C A A A T G C G N-ter T. cruzi GluDH 2
1  A T G A A G T A C A C T T T C G T G G A C G A C T T T A T C A A C A A G T G C G N-ter 1
1  A T G A A G T A C A C T T T C T G T G G A C G A C T T T A T C A A C A A A T G C G N-ter 2

41 T G A A G A A G C G C G A C C C C A A T N-ter T. cruzi GluDH 1
41 T G A A G A A G C G C G A C C C C A A T N-ter fago 1
41 T G A A G A A G C G C G A C C C C A A T N-ter fago 2
41 T G A A G A A G C G C G A C C C C A A T N-ter T. cruzi GluDH 2
41 T G A A G A A G C G C G A C C C C A A T N-ter 1
41 T G A A G A A G C G C G A C C C C A A T N-ter 2

```

Figura 19: Microheterogeneidades en la secuencia nucleotídica del extremo 5' de la región de código del gen.

Dos clones completamente secuenciados (*TcGluDH₁* y *TcGluDH₂*) y cuatro clones secuenciados parcialmente (dos provenientes de fagos recombinantes, N-ter fago 1 y 2, y dos provenientes de ADN genómico, N-ter 1 y 2) fueron comparados. Encerradas en cajas se indican las diferencias encontradas entre las secuencias nucleotídicas. Para dicha comparación se utilizó el programa de alineamiento Múltiple de Secuencia, Megalign, de Lasergene (DNA STAR, Inc, Madison, WI, USA) que emplea el algoritmo de Jotun Hein (Hein, 1990).

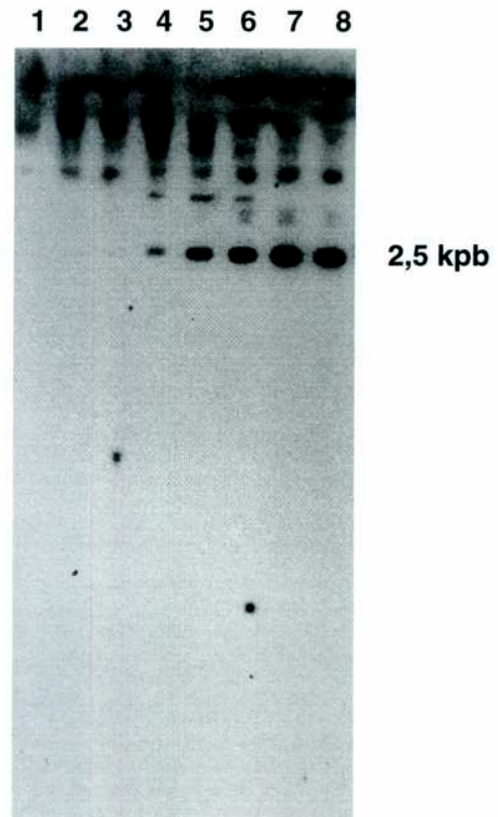
¿Los genes de la GluDH-NADP se organizan en tandem?

Con frecuencia en los Trypanosomátidos los genes con copias múltiples se encuentran ordenados en tandems, como ocurre por ejemplo con los genes de la cruzipaina de *T. cruzi* (Campetella *et al.*, 1992). Para estudiar la posibilidad de que los genes que codifican para la GluDH-NADP se encuentren organizados de esta manera, se realizaron ensayos de

digestiones parciales en tiempos crecientes desde 1 hasta 90 minutos. Para el experimento se eligió la enzima BglII que corta a la derecha del codón de terminación del gen. El ADN genómico de la cepa Tul2 de *T. cruzi* digerido con esta enzima fue utilizado para un ensayo de Southern blot usando una sonda del gen completo *TcGluDH1*. Los resultados obtenidos nos permitieron descartar la hipótesis de la disposición de los genes en tandem. Como se puede observar en la figura 20, con tiempos crecientes de incubación con la enzima solo puede detectarse una banda de aproximadamente 2.5 a 2.8 kpb que aumenta su intensidad a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con la enzima.

Figura 20: Digestiones parciales con la enzima BglII para verificar si los genes de la GluDH-NADP dependiente se disponen en tandem.

La mezcla de reacción contiene 100 µg de ADN genómico de epimastigotes de la cepa Tul2 y 50 U de enzima en un volumen final de 500 µl. Se precalienta dicha mezcla a 37 °C antes del agregado de la enzima. Se sacan 50 µl de la incubación por cada tiempo elegido y se detiene la reacción como se indica en la sección de Materiales y Métodos. El material obtenido se siembra en un gel de agarosa 1% mediano y se corre a 3 V/cm toda la noche. Luego de la transferencia se realiza un ensayo de Southern blot usando como sonda el gen completo *TcGluDH1*. Los tiempos elegidos para las digestiones parciales fueron: calle 1: 1'; calle 2: 5'; calle 3: 10'; calle 4: 15'; calle 5: 30'; calle 6: 45'; calle 7: 60'; calle 8: 90'.



Electroforesis en campo pulsado (PFGE).

Esta nueva técnica de electroforesis en gel permite la separación de moléculas de un tamaño entre 30 y 2000 kpb, utilizando geles 1.5% y entre 10 y 20 µg de ADN por calle. Utilizando sondas adecuadas puede asignarse cada banda del gel al cromosoma correspondiente en ensayos de Southern blot (Schwartz and Cantor 1984; Van der Ploeg *et al.*, 1984).

Para conocer la distribución de los genes de la GluDH-NADP en los cromosomas del parásito se realizaron ensayos de PFGE y Southern blot con los siguientes clones: Tul10, Sylvio X10/7, HO3/5, CanIII, NIH, YIE9, YIE10, CA-I/72 y CA-I/72hdna, las cepas Tul2, RA y los parásitos *T. rangeli*, *C. fasciculata* y *L. mexicana*.

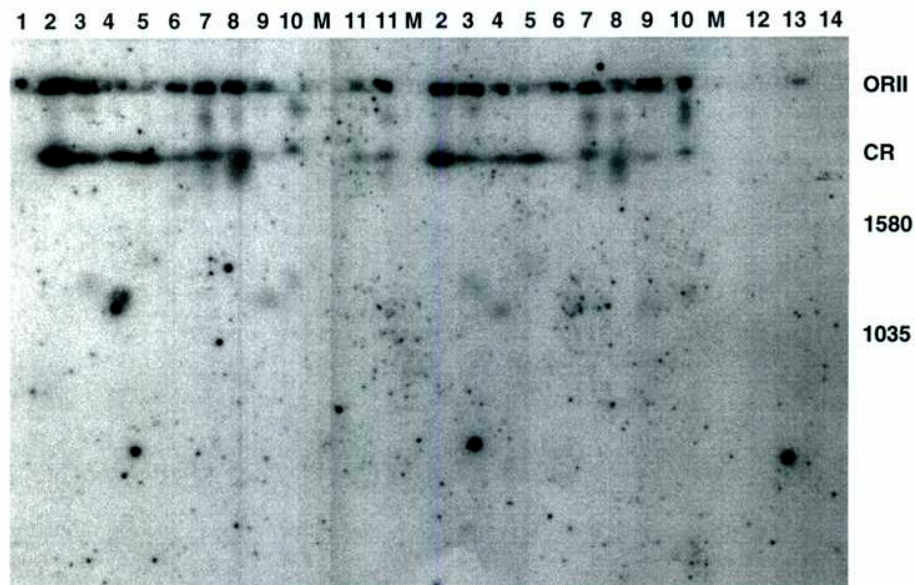


Figura 21: PFGE de distintos parásitos, cepas y clones.

El PFGE fue corrido como se describe en la sección de Materiales y Métodos usando los siguientes parásitos, cepas y clones: calle 1: Tul2; calle 2: Tul10; calle 3: Sylvio X10/7; calle 4: HO3/5; calle 5: CANIII; calle 6: NIH2; calle 7: YIE9; calle 8: YIE10; calle 9: CA-I/72; calle 10: CA-I/72 hDNA; calle 11: RA; calle 12: *L. mexicana*; calle 13: *T. rangeli*; calle 14: *C. fasciculata*. Calle M: los cromosomas de *S. cerevisiae* (Bio-Rad) (2200, 1600, 1125, 1020, 945, 850, 800, 770, 700, 630, 580, 460, 370, 290 y 245 kpb) e YP148 (2500, 1580, 1115, 1025, 970, 946, 829, 791, 752, 681, 598, 550, 441, 351, 276, 213 y 90 kpb) fueron usados como marcadores de peso molecular. Luego de la transferencia se realiza un ensayo de Southern blot usando como sonda el gen completo *TcGluDH1*.

El Southern blot de las bandas cromosomales de los parásitos, resueltas en un PFGE fue revelado usando una sonda del gen completo *TcGluDH1*. Dicho ensayo reveló dos regiones de hibridización. Una de ellas corresponde a la zona de compresión (CR), la cual, en las condiciones particulares en las que se hizo el ensayo, contiene cromosomas de un tamaño mayor a 2500 kpb. La otra banda fue encontrada en diferentes stocks de parásitos entre los marcadores de 1035 y 1580 kpb (figura 21).

En cambio no se detectaron bandas de hibridización con los cromosomas de *C. fasciculata* y *L. mexicana* a pesar de que se puede detectar baja actividad GluDH-NADP en extractos de estos organismos.

En el caso de *T. rangeli* pudo observarse una zona de hibridización débil con el ADN en la zona del origen, sugiriendo que posiblemente un gen homólogo se encuentra localizado en un cromosoma muy grande.

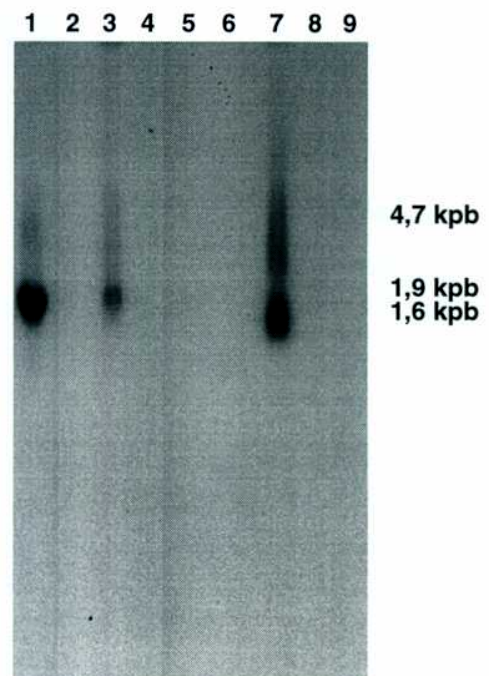
Expresión de la GluDH-NADP en los distintos estadios y cepas de *T. cruzi* y en otros parásitos.

Ensayos de Northern blot.

Las muestras de ARN total provenientes de los distintos parásitos, clones, cepas y formas del ciclo de vida fueron utilizadas para realizar ensayos de Northern blot usando una sonda marcada por "random priming" que contiene el gen entero *TcGluDH₁* de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos muestran una banda única de un tamaño aproximado de 1600, 1700 pb para epimastigotes de las cepas Tul2 y RA respectivamente y 1300-1400 pb, para epimastigotes del clon Silvio.

Figura 22: Ensayo de Northern blot.

En cada calle fueron sembrados 30 µg de ARN total de los siguientes parásitos: calle 1: Tul2 (epimastigotes); calle 2: *T. rangeli*; calle 3: RA (epimastigotes); calle 4: RA (tripomastigotes); calle 5: RA (amastigotes); calle 6: CL (metacíclicos); calle 7: Silvio (epimastigotes); calle 8: *C. fasciculata* y calle 9: *L. mexicana*. Los marcadores de peso molecular: 4,7 y 1,9 kpb. El gen completo *TcGluDH₁* fue utilizado como sonda.



No se detectó ninguna señal en *C. fasciculata* ni en *L. mexicana* aún luego de varios días de exposición sugiriendo que las enzimas en estos parásitos podrían ser muy diferentes. En el caso de *T. rangeli*, tampoco se observaron señales a pesar de mostrar un patrón claro de bandas, muy diferentes a Tul2, en el ensayo de Southern blot.

Mientras que en la forma epimastigote se observa una banda intensa, en las formas amastigote y tripomastigote de la cepa RA solo pueden detectarse señales muy débiles luego de largos períodos de exposición de la placa radiográfica. La señal no aumenta ni siquiera sembrando 30 µg de ARN total en cada caso como se puede observar en la figura 22.

Las diferencias obtenidas en las señales de las distintas formas del ciclo de vida del *T. cruzi* indican que la GluDH-NADP es una enzima regulada en el desarrollo.

Medición de la actividad GluDH.

Para analizar la existencia de una correlación entre los resultados obtenidos en el Northern blot y la cantidad de proteína y su actividad, se midió la actividad específica de las enzimas GluDH (NAD y NADP dependientes), en las distintas cepas y formas del ciclo de vida del parásito, a partir de un extracto crudo, cuyos resultados se detallan en la Tabla 2.

	GluDH-NADP AE (unid/min/mg de prot)	GluDH-NAD AE (unid/min/mg de prot)
RA(e)	11,6	0,52
RA(t)	0,875	0,172
RA(a)	0,048	0,058
T2(e)	11,6	0,91
Sil(e)	5,2	0,60
Sil(m)	0,857	0,31

Tabla 2: Actividad específica de las enzimas GluDH-NADP y GluDH-NAD dependientes de *T. cruzi* en diferentes cepas y estadios del ciclo de vida.

Se detallan los valores de actividad específica en: RA epimastigotes RA(e), RA tripomastigotes RA(t), RA amastigotes RA(a), Tul2 epimastigotes T2(e), clon Silvio epimastigotes Sil(e) y Silvio metacíclicos Sil(m).

La actividad específica de la GluDH-NADP de la forma amastigote representa el 0,4% de la actividad de la forma epimastigote tanto de Tul2 como de RA, mientras que la forma tripomastigote alcanza poco menos del 10%.

En cambio la actividad específica de la GluDH-NAD dependiente es muy baja en todos los casos, sin embargo, en los amastigotes representa casi el 7% de la actividad de la forma epimastigote de Tul2 y en los tripomastigotes cerca del 20%.

Detección de la GluDH-NADP en ensayos de Western blot.

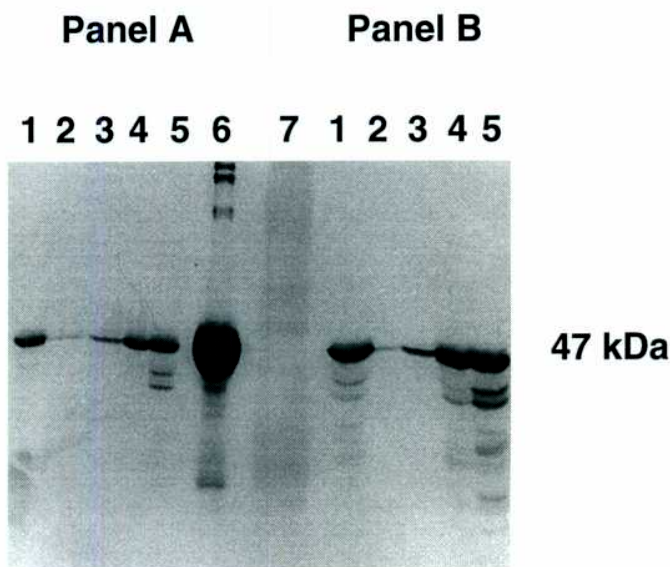
Los resultados de medición de la actividad enzimática, se completaron con la comparación de la cantidad de proteína GluDH-NADP en cada forma del parásito a través de un gel de poliacrilamida con SDS teñido con Coomassie Blue. Para que los resultados fueran comparables se realizaron dos geles, en los cuales cada calle fue sembrada con el mismo número de parásitos (5×10^6 parásitos/calle) o con igual masa de proteínas (50 μ g de proteína/calle). Con los geles transferidos se realizaron ensayos de Western blot, que mostraron para ambas condiciones de siembra, una menor cantidad de proteína GluDH-NADP en las formas amastigote y tripomastigote en comparación con la forma epimastigote de Tul2 o RA (figura 23).

Esto significa que las variaciones en los niveles de ARNm de la GluDH-NADP se correlacionan con la cantidad de proteína y su actividad enzimática.

Las diferencias en los niveles de ARNm en las diferentes formas del ciclo de vida del parásito pueden deberse a una disminución en la expresión del gen debido a la presencia de mecanismos de regulación de la transcripción, muy poco estudiados en *T. cruzi*, o a una alta tasa de degradación del ARNm correspondiente a la GluDH-NADP.

Figura 23: Detección de GluDH-NADP en distintos estadios del ciclo de vida por ensayos de Western blot.

Los geles SDS-PAGE 10% transferidos, fueron enfrentados en ensayos de Western blot con el anticuerpo policlonal monoespecífico anti GluDH-NADP purificada (dil. 1/1500). Panel A: gel sembrado con igual número de parásitos por calle (5×10^6 parásitos/calle). Panel B: gel sembrado con igual cantidad de proteínas por calle ($50 \mu\text{g}$ de proteína/calle). Calle 1: Silvio (epimastigotes); calle 2: RA (amastigotes); calle 3: RA (tripomastigotes); calle 4: RA (epimastigotes); calle 5: Tul2 (epimastigotes); calle 6: GluDH-NADP purificada (1mg); calle 7: marcadores de peso molecular. Los pesos moleculares se indican en kiloDaltones.



Expresión de la GluDH-NADP recombinante en *E. coli* usando el vector de expresión pET-22b(+).

Estrategia para la obtención del clon recombinante.

Con el objeto de conocer si el gen clonado y secuenciado, *TcGluDH1* proveniente de la cepa Miranda 76 de *T. cruzi* era activo (*pT7-TcGluDH1*), se procedió a subclonarlo en el vector de expresión pET-22b(+). Luego de linealizarlo con la enzima HindIII, fue utilizado como sustrato para una reacción de PCR. Los oligonucleótidos usados en la reacción fueron contruídos teniendo en cuenta los extremos 5' y 3' del gen clonado además de una secuencia adicional que introduce sitios específicos para las endonucleasas de restricción NdeI y XhoI, respectivamente. Se eligieron estos sitios de restricción por ser compatibles con el vector de expresión pET-22b(+).

N-ter expr:

Tm: 58°C

Ndel

5' TATACAT ATG AAG TAC ACG AGC GTG GAT 3'

Met Lys Thyr Thr Ser Val Asp

C-ter expr:

Tm: 62°C

XhoI

5' ATG AAG GGT CTT GGC GTA GTT CTC GAG CAC 3'

Met Lys Gly Leu Gly Val Val Leu Glu His

Para esta amplificación se realizó un ciclo de desnaturalización de 4 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

La reacción fue corrida en un gel de agarosa 1%. El producto obtenido consistió en una banda única cuyo tamaño aproximado fue de 1400 pb. Para evitar la acción residual de la Taq polimerasa la banda obtenida fue purificada y luego sometida a la digestión combinada con las endonucleasas Ndel-XhoI.

Debido a que la enzima Ndel corta de forma ineficiente cerca de los extremos, además de ser muy inestable (su vida media en la reacción es de 15 minutos) y sensible a impurezas en la preparación de ADN, el producto de PCR fue primeramente clonado en el plásmido pT7 para favorecer la digestión con Ndel-XhoI. El fragmento obtenido de 1360 pb fue purificado y subclonado finalmente en el plásmido de expresión pET-22b(+) (Novagen) en los sitios Ndel-XhoI. Con él se transformaron bacterias *E. coli* Novablue, plaqueadas en medio LB agar con ampicilina, IPTG y X-gal (figura 24).

Las bacterias Novablue son elegidas inicialmente porque en ellas el gen introducido en el plásmido pET-22b(+) se mantiene silencioso (no se transcribe), ya que no tienen el gen de la ARN polimerasa del fago T7. Son convenientes para el clonado inicial en el vector pET-22b(+) y para el mantenimiento del plásmido, ya que las bacterias son *recA*⁻ y presentan alta eficiencia de transformación dando buen rendimiento en la preparación del plásmido.

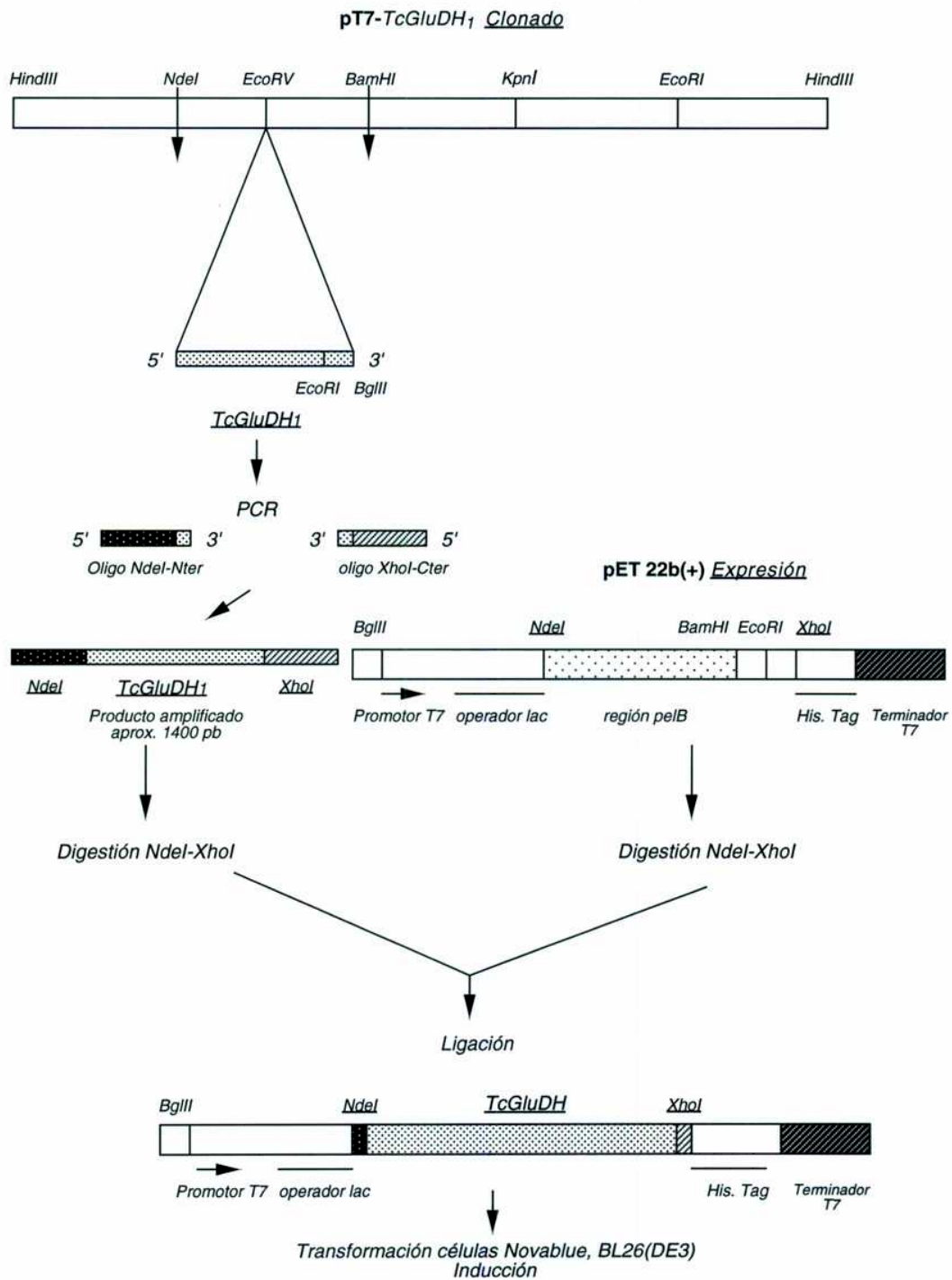


Figura 24: Estrategia de clonado en el vector de expresión pET-22b(+).

Con los plásmidos obtenidos de las colonias positivas se realizó un mapa de restricción para comprobar la integridad y orientación del gen, eligiendo las siguientes enzimas: EcoRI, BglII, EcoRI-BglII, NdeI, XhoI y XhoI-NdeI.

Finalmente, para la producción de la proteína, el plásmido recombinante se transfirió a una cepa bacteriana que contiene una copia cromosomal del gen de la ARN polimerasa de T7. Este va acompañado con un λ DE3 (derivado lisógeno de λ) que lleva un fragmento de ADN conteniendo el gen *lacI* y el promotor *lac UV5* (que dirige la transcripción y es inducible por IPTG). Por lo tanto, al agregar IPTG al medio de cultivo se induce la ARN polimerasa de T7 permitiendo la transcripción de los genes río abajo del promotor.

La cepa bacteriana BL26(DE3) (baja eficiencia de transformación) fue elegida para la expresión de la proteína recombinante. También fueron transformadas bacterias BL26(DE3)PLysS que contienen una lisozima capaz de inhibir a la ARN polimerasa de T7. Por esta razón la expresión del gen clonado debería ser menor al inducir las células con IPTG y las colonias resultantes serían de mayor tamaño. De esta forma expresando poca proteína recombinante, las bacterias pueden sobrevivir si el producto inducido no es tóxico. Al transformar bacterias BL26(DE3)PLysS, se obtuvieron colonias de mayor tamaño como era lo esperado, indicando que el producto del gen no es tóxico para las células. En cambio, en las bacterias BL26(DE3), al establecer la inducción con IPTG, se logra la sobreproducción de la GluDH-NADP, resultando las colonias sobrevivientes más pequeñas. Los datos obtenidos se detallan en la Tabla 3.

	BL26(DE3)PLysS	BL26(DE3)
Sin transformar	césped	césped
Transformada	110 colonias grandes	480 colonias grandes
Transformada e inducida	120 colonias grandes	400 colonias chicas

Tabla 3: Comparación entre las células BL26(DE3)PLysS y BL26(DE3).

Ambos tipos de bacterias fueron plaqueados en medio LB agar con o sin ampicilina (100 mg/ml). Bacterias no transformadas con el plásmido pET-22b(+)-GluDH; transformadas con el plásmido; transformadas e inducidas con IPTG. Luego de una incubación toda la noche a 37°C se contaron las colonias.

Una vez obtenido el clon recombinante y sabiendo que el producto no resulta tóxico, se crecieron ambos tipos de bacterias en un medio LB con ampicilina para su miniinducción.

Miniinducción para la expresión de la proteína recombinante.

A partir de una colonia recombinante de bacterias BL26(DE3) y BL26(DE3)PLysS transformadas con el plásmido conteniendo el gen *TcGluDH₁* (pET-22b(+)-GluDH) se realizó la miniinducción de acuerdo al protocolo detallado en la sección de Materiales y Métodos.

Todas las fracciones obtenidas para ambos tipos celulares, llamadas, proteínas totales, solubles e insolubles provenientes de bacterias inducidas y sin inducir, así como también las proteínas totales de las bacterias no transformadas con el plásmido mencionado, fueron corridas en un gel de poliacrilamida 10% con SDS teñido con Coomassie Blue. Los resultados obtenidos se detallan en la Figura 25(a) y (b).

Figura 25: SDS-PAGE 10% de las distintas fracciones provenientes de una miniinducción.

(a) gel correspondiente a las fracciones de las células BL26(DE3). Panel (A): bacterias sin transformar con el plásmido recombinante. Panel (B): bacterias transformadas con el plásmido recombinante. Calles 1 y 7: proteínas totales de un cultivo sin inducir; calles 2 y 8: proteínas totales de un cultivo inducido; calles 3 y 9: proteínas solubles de un cultivo inducido; calles 4 y 10: proteínas insolubles de un cultivo inducido; calle 5: marcadores de peso molecular; calle 6: GluDH-NADP pura.

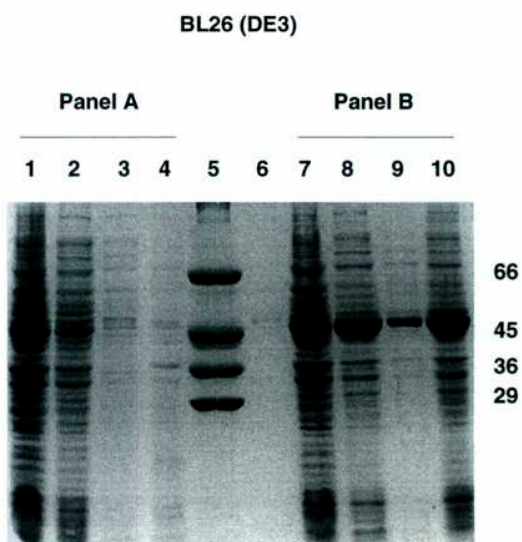
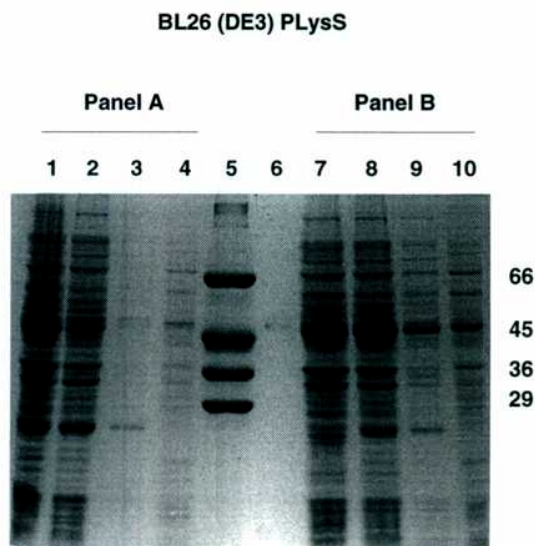


Figura 25: SDS-PAGE 10% de las distintas fracciones provenientes de una miniinducción.

(b) gel correspondiente a las fracciones de las células BL26(DE3)PLysS. Panel (A): bacterias sin transformar con el plásmido recombinante. Panel (B): bacterias transformadas con el plásmido recombinante. Calles 1 y 7: proteínas totales de un cultivo sin inducir; calles 2 y 8: proteínas totales de un cultivo inducido; calles 3 y 9: proteínas solubles de un cultivo inducido; calles 4 y 10: proteínas insolubles de un cultivo inducido; calle 5: marcadores de peso molecular; calle 6: GluDH-NADP pura. Los pesos moleculares se indican en kiloDaltones.



Cuando las células BL26(DE3) y BL26(DE3)PLysS no son transformadas con el plásmido recombinante, no se detecta GluDH-NADP (Panel A en ambas figuras). En cambio, al transformarlas con el plásmido recombinante, se detecta una banda de 47 kDa de peso molecular, correspondiente a la GluDH-NADP, presente aún sin inducir el cultivo con IPTG (Panel B).

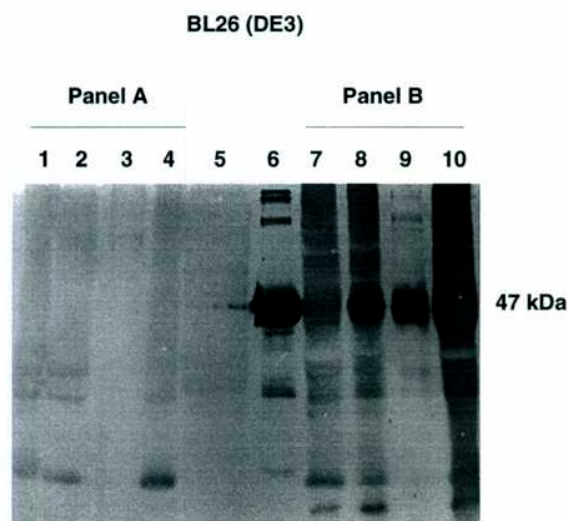
La cantidad de enzima inducida por el agregado de IPTG varía en cada fracción y depende del tipo celular. En el precipitado de las bacterias BL26(DE3) es muy abundante, probablemente formando cuerpos de inclusión. En cambio, en la fracción sobrenadante de las mismas células puede detectarse menos cantidad de proteína aunque suficiente para realizar ensayos cinéticos, mientras que en las células BL26(DE3)PLysS donde está inhibida la ARN polimerasa de T7 se encuentra en bastante menor proporción.

Los resultados muestran que la proteína recombinante se expresa adecuadamente en este sistema, con un peso molecular semejante al de la GluDH-NADP natural de *T. cruzi*.

Para corroborar que la proteína inducida corresponde a la enzima en estudio, el gel conteniendo las fracciones provenientes de las células BL26(DE3) fue transferido a membranas de nitrocelulosa y enfrentado en ensayos de Western blot con el anticuerpo policlonal monoespecífico anti GluDH-NADP. Los resultados indicados en la figura 26 demuestran que la proteína expresada, en el marco de lectura correcto, es efectivamente la GluDH-NADP dependiente de *T. cruzi*.

Figura 26: Western blot del gel SDS-PAGE indicado en la Figura 25a.

Panel (A): bacterias sin transformar con el plásmido recombinante. Panel (B): bacterias transformadas con el plásmido recombinante. Calles 1 y 7: proteínas totales de un cultivo sin inducir; calles 2 y 8: proteínas totales de un cultivo inducido; calles 3 y 9: proteínas solubles de un cultivo inducido; calles 4 y 10: proteínas insolubles de un cultivo inducido; calle 5: marcadores de peso molecular y calle 6: GluDH-NADP pura. Los pesos moleculares se indican en kiloDaltones. El ensayo de Western blot se realizó con el suero anti-GluDH (dil. 1/1500).



En el sistema utilizado, el clonado del gen *TcGluDH₁* en los sitios NdeI-XhoI del plásmido pET-22b(+), permite la expresión de la proteína GluDH-NADP completa y en fase, unida a una secuencia llamada His.TagTM formada por 6 a 10 histidinas consecutivas, cuya presencia debería permitir la purificación de la proteína en un solo paso. Luego dicha secuencia puede ser removida por medio de la acción de proteasas sitio específicas.

La GluDH-NADP de *T. cruzi* es una proteína cuya forma activa es un homohexámero de 280 kDa. Si cada subunidad expresada presenta una extensión de polihistidina, ésta podría afectar la interacción de las subunidades y como consecuencia la actividad de la enzima. Para verificar que la proteína inducida fuera activa, se repitió la inducción y se midió la actividad específica de la GluDH-NADP en las bacterias no transformadas, transformadas con el plásmido sin inducir y transformadas e inducidas con IPTG. Los resultados indicaron que la inducción provoca un aumento de la actividad de aproximadamente 553 veces con respecto al control de células sin transformar como se ve en la figura 27. De esta manera concluimos que la secuencia de polihistidina no afectó, en este sentido, el ensamblado correcto del complejo enzimáticamente activo.

	AE	Nº de veces
BL26(DE3) Tal cual	0.196	1
BL26(DE3) Transf, sin inducir	8.78	45
BL26(DE3) Transf, inducidas a 28°C	108.33	553

Figura 27: Medida de la actividad específica de la proteína recombinante.

La AE de la GluDH-NADP recombinante fue medida como unidades/minuto/mg de proteína en: células BL26(DE3) sin transformar con el plásmido recombinante, transformadas pero sin inducir y transformadas e inducidas con IPTG a 28°C.

Purificación de la proteína recombinante.

Para purificar la proteína recombinante en gran cantidad, se realizó una inducción de las bacterias a 28°C de forma tal de favorecer la producción de la proteína inducida.

Para la purificación, se utilizó solo la fracción sobrenadante de las bacterias inducidas, sin intentar la solubilización y el plegado correcto de la enzima presente en los cuerpos de inclusión.

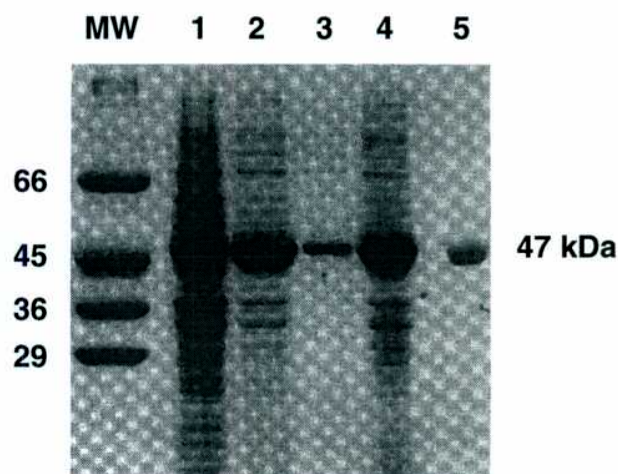
En un primer momento, se intentó sin éxito la purificación de la proteína inducida a través de una columna de quelatos metálicos, utilizando la secuencia de histidinas consecutivas agregadas en el extremo C-terminal de cada subunidad de la GluDH-NADP.

Finalmente se utilizó la columna de afinidad Cibacron Blue debido a su buena purificación y rendimiento al ser utilizada como último paso en el protocolo de purificación de la proteína natural.

El sobrenadante bacteriano, conteniendo la proteína recombinante (4000 unidades totales de enzima) fue dializado exhaustivamente y aplicado a la columna. El procedimiento empleado fue el mismo que en el caso de la última etapa de la purificación de la enzima natural. El material que no logró ligarse a la columna, los lavados y los eluidos fueron corridos en un gel SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa para realizar ensayos de Western blot. La proteína fue obtenida en un solo paso, en muy buena cantidad y en alto grado de pureza como para poder ser utilizada para los estudios cinéticos correspondientes (figura 28).

Figura 28: Expresión y purificación de la proteína recombinante.

Gel SDS-PAGE 10% teñido con Coomassie Blue. MW: marcadores de peso molecular; calles 1 y 2: proteínas totales de un cultivo no inducido e inducido respectivamente; calles 3 y 4: proteínas solubles e insolubles de un cultivo inducido respectivamente; calle 5: GluDH-NADP recombinante eluída de una columna de Blue Sepharose con NADP 2mM. Los pesos moleculares se indican en kiloDaltones.

**Estudios cinéticos comparados de la enzima natural y la recombinante.**

Utilizando la enzima recombinante purificada por columna de Cibacron Blue, se determinaron los valores de K_m aparente para la enzima natural y la forma recombinante, en el sentido de la aminación reductiva y la desaminación oxidativa comprobándose que no existen diferencias significativas entre ambas, como se puede observar en la Tabla 4.

Km aparente		
Sustrato	Enzima natural	Enzima recombinante
NADPH	$12,6 \pm 1,49 \mu\text{M}$	$9,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$
αKG	$1,27 \pm 0,45 \text{ mM}$	$0,84 \pm 0,3 \text{ mM}$
CINH_4	$2,03 \pm 0,36 \text{ mM}$	$3,3 \pm 0,52 \text{ mM}$
L-glut	$2,10 \pm 0,25 \text{ mM}$	$0,90 \pm 0,63 \text{ mM}$
NADP	$0,43 \pm 0,05 \mu\text{M}$	$0,69 \pm 0,1 \mu\text{M}$

Tabla 4: Km de la enzima natural y de la forma recombinante.

Usando concentraciones saturantes de todos los sustratos menos uno y con 30 μl de una dilución 1:100 de la enzima recombinante, se calcula la velocidad inicial de la reacción. Las constantes cinéticas aparentes fueron determinadas usando un programa de computadora, ajustando los datos a una hipérbola aplicando el algoritmo de Gauss-Newton (Fraser and Suzuki, 1973).

Identificación de la forma citosólica de la GluDH-NADP de *T. cruzi*.

Debido a que el oligonucleótido iniciador Nter-1 utilizado para la amplificación de los genes, fue obtenido a partir de la secuencia amino terminal de la enzima madura, no se puede descartar la presencia de dos genes que codifiquen para isoformas con diferente localización subcelular. Datos de la bibliografía sugerían que la GluDH-NADP de *T. cruzi* presentaría una doble localización dentro del parásito, citoplasmática y mitocondrial; además de proponer una tercera ubicación aún no determinada (Duschak and Cazzulo, 1991). Ambas isoformas deberían diferir en la presencia o ausencia de un péptido de tránsito a la mitocondria.

Con el objetivo de obtener mayor información acerca de la posible existencia de una isoforma mitocondrial, se realizaron experimentos de transcriptasa reversa acoplada a reacciones de PCR semianidada.

Teniendo en cuenta que la forma mitocondrial debería presentar una secuencia de aminoácidos adicional para direccionar la proteína a la mitocondria, a diferencia de la citosólica, se buscaron y analizaron las secuencias nucleotídicas río arriba del codón de iniciación de la síntesis de proteínas, que incluyen a la región 5'UTR (región no traducida). A partir del ARN total de epimastigotes de Tul2 se sintetizó ADNc por transcripción reversa, utilizando los iniciadores oligo(dT) o GDH₃. El primero de ellos, permite obtener todos los mensajeros que lleven la cola de poliA, mientras que el oligo GDH₃ selecciona únicamente los mensajeros de la GluDH-NADP por homología de secuencia, a una distancia de 219 pb del codón ATG de iniciación.

Todos los mensajeros maduros en *T. cruzi* llevan en el extremo 5' un miniexón, el cual es introducido por trans-splicing (McCarthy-Burke *et al.*, 1989). Por lo tanto, se realizaron reacciones de PCR, combinando un oligo iniciador con parte de la secuencia del miniexón con otro oligonucleótido interno, exactamente homólogo a la secuencia del *TcGluDH₁* a una cierta distancia del ATG de iniciación. La elección del iniciador depende del utilizado para la obtención del ADNc (oligo(dT) o GDH₃).

La segunda reacción de PCR es semianidada ya que incluye el mismo oligo miniexón pero combinado con otro iniciador, también homólogo a la GluDH-NADP, pero más cercano a su codón ATG, llamado GDH₁.

La ubicación de los iniciadores en la secuencia de la enzima madura y la estrategia mencionada se detallan en la figura 29.

Oligo miniexón: 5' AACTAACGGTATTATTGATA 3'

Tm: 50°C

Oligo GDH₃: 5' TTCACCCTTGTCATCCACCCA 3'

Tm: 57°C

Oligo GDH₁: 5' ATTGGGGTCGCGCTTCTTCAC 3'

Tm: 60°C

```

Miniexón      A A C G C T A T T A T T G A T A C A G T T T C T G T A C T A T A T T G - - - - -
oligo_miniexón 5' A A C G G T A T T A T T G A T A 3'  → - - - - -

Iniciación
Tc GluDH1 A T G A A G T A C A C G A G C G T G G A T G A C T T T A T C A A C A A G T G C G T G A A G A A G C G
oligo_GDH1                                     ← 3' C A C T T C T T C G C

Tc GluDH1  C G A C C C C A A T C A A C C C G A A T T T G A G C A G G C G G T T C A T G A A G T A A T G A C C T
oligo_GDH1 G C T G G G G T T A 5'

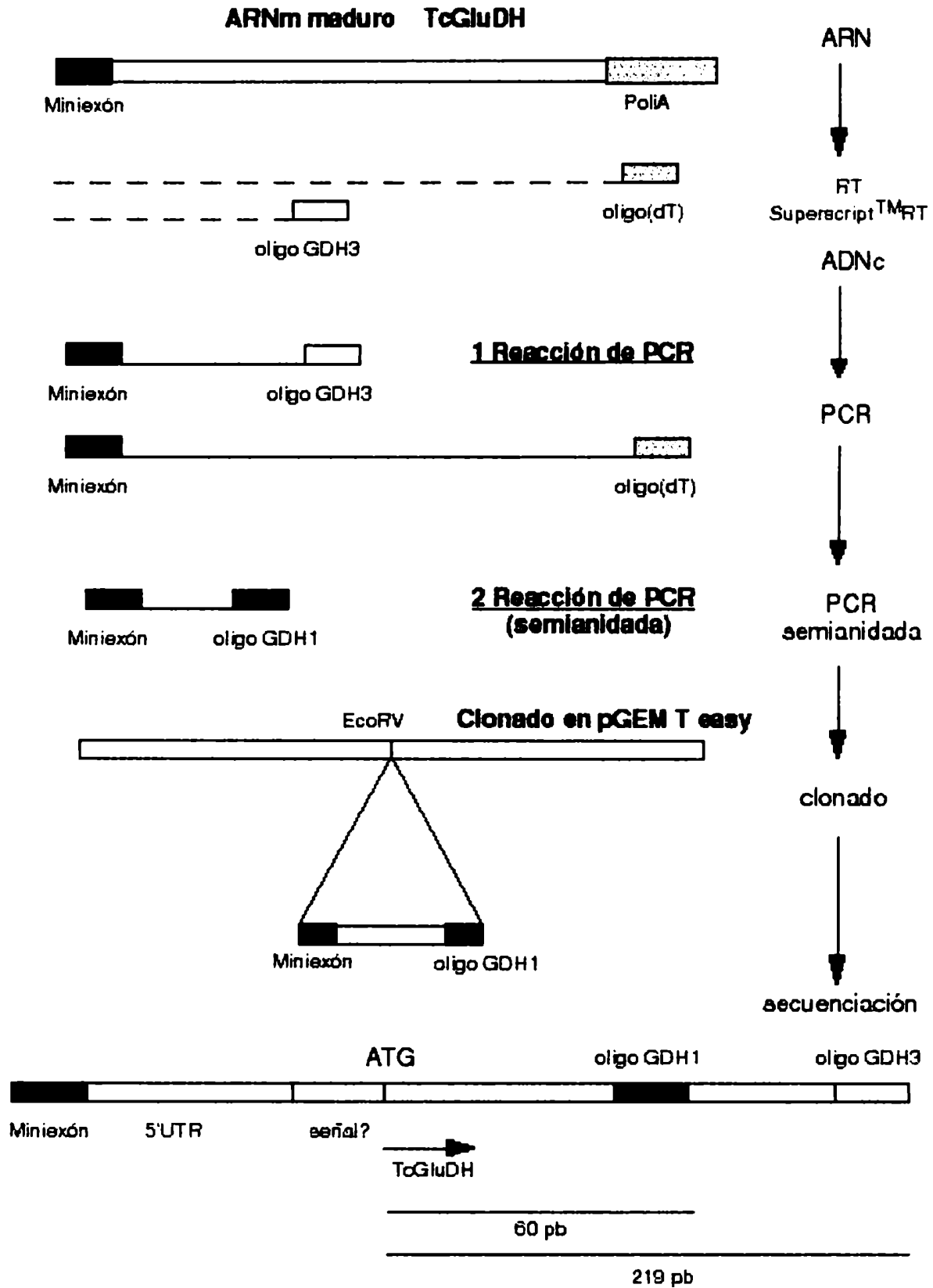
Tc GluDH1  C G C T T T G G C C T T T T C T G G A A A A G C A T C C A G A G T A C T G C C A G G A T T C T C T T

Tc GluDH1  C T G G A G C G C C T G G T G G A G C C C G A A C G T G T C G T T C A G T T C C G C G T G T C A T G
oligo_GDH1                                     ← 3' A C

Tc GluDH1  G G T G G A T G A C A A G G G T G A A G T G C A G G T G A
oligo_GDH3 C C A C C T A C T G T T C C C A C T T 5'

```

Figura 29: Ubicación de los iniciadores utilizados en la reacción de RT-PCR semianidada y estrategia empleada (próxima página).



Para la primera reacción de amplificación se realizó un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 93°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 93°C; 30 segundos a 43°C y 1 minuto a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

En cambio para la segunda reacción se realizó un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 93°C seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 93°C; 30 segundos a 47°C y 1 minuto a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Cualquiera sea el iniciador utilizado para la obtención del ADNc y la primera reacción de PCR, el fragmento obtenido luego de la segunda reacción utilizando el iniciador GDH₁ presentó un tamaño de aproximadamente 150 pb. Dicho fragmento fue recuperado de un gel de poliacrilamida no desnaturalizante, clonado en el vector pGEM T easy y secuenciado completamente.

Los datos de secuencia que se muestran en la figura 30, indican que el ARNm maduro de la GluDH-NADP obtenido comprende: en el extremo 5' la secuencia del oligo minixón de 39 pb y a continuación una región 5'UTR de 40 pb. Inmediatamente después se encuentra el codón AUG que indica el comienzo de la proteína. En las dos secuencias analizadas, correspondientes a experimentos independientes, se pudieron detectar diferencias en la región 5'UTR.

La comparación de la secuencia del extremo N-terminal de la enzima con los datos previos del laboratorio muestran total coincidencia, y no se encuentra ninguna zona que pueda indicar la presencia de un péptido que dirija la proteína a la mitocondria. Estos resultados sugieren que la enzima caracterizada en nuestro laboratorio es citosólica y que la posible presencia de una isoforma mitocondrial podría ser un artefacto.

AACTAACGGTATTATTGATACAGTTTCTGTACTATATTGAAAACTAA TTT	Minixón 5'-UTR N-ter1
AACTAACGGTATTATTGATACAGTTTCTGTACTATATTGAAAACTAA TTT	Minixón 5'-UTR N-ter2
TAAAGAA AAGGAAAAAAGCAAATACATCATAATGAAGTACACTTCCGTGG	Minixón 5'-UTR N-ter1
TAAAGAA AAGGAAAAA- -CAAATACATCATAATGAAGTACACTTCTGTGG	Minixón 5'-UTR N-ter2
ACGACTTTATCAACAAGTGCGTGAAGAAGCGCGACCCCAAT	Minixón 5'-UTR N-ter1
ACGACTTTATCAACAAGTGCGTGAAGAAGCGCGACCCCAAT	Minixón 5'-UTR N-ter2

Figura 30: Secuencia de la zona 5'UTR, minlexón y comienzo de la zona codificante correspondiente al gen de la GluDH-NADP.

Las secuencias obtenidas en dos experimentos independientes fueron comparadas usando el programa Megalign, Multiple Sequence Alignment, de Lasergene (DNA STAR, Inc, Madison, WI, USA).

Discusión

Purificación.

La modificación introducida en el protocolo de purificación, en comparación con el publicado previamente (Cazzulo *et al.*, 1988b), consistente en la utilización de una columna de afinidad de Cibacron Blue F3G-A (Blue Sepharose CL-6B), nos permitió obtener preparaciones de GluDH-NADP dependiente de *T. cruzi* de alta actividad específica, 330 unidades. mg^{-1} , comparadas con las 189 unidades. mg^{-1} obtenidas previamente, (probablemente debido a la ausencia de proteína desnaturalizada, la cual copurifica con la enzima nativa en los pasos convencionales, pero no se une a la columna de afinidad en Blue Sepharose) y con alto rendimiento (se llevó la purificación a 60 veces y el rendimiento al 58%) (tabla 1).

El eluido de la columna de Blue Sepharose presentó además de la subunidad de 47 kDa correspondiente a la GluDH-NADP dependiente sólo trazas de otras proteínas, de menor peso molecular (figura 1 (b)). Dichas trazas, observables en geles SDS-PAGE sobrecargados y teñidos con nitrato de plata, copurifican con la enzima en filtración por gel en Superosa 6 en un sistema de FPLC; una de ellas presentó una reacción antigénica cruzada con el anticuerpo policlonal monoespecífico anti-GluDH-NADP, siendo probablemente un producto menor de degradación proteolítica de la propia enzima.

La proteína purificada es muy estable y puede permanecer por varios meses a 4°C con muy poca inactivación. Luego de largos períodos de almacenamiento, algunas preparaciones presentan pequeñas cantidades de material de alto peso molecular, probablemente debido a fenómenos de agregación.

Clonado, secuenciación y organización genómica.

Secuenciación de la proteína.

La secuencia nucleotídica completa de la enzima fue obtenida por combinación de técnicas de química de proteínas y biología molecular.

Los péptidos secuenciados a partir de digestiones con BrCN, tripsina y las endopeptidasas Arg-C y Lys-C, corresponden aproximadamente a una tercera parte de la proteína total y coinciden muy bien con la secuencia completa deducida a partir del gen *TcGluDH₂* clonado a partir de la misma cepa de parásito (Tul2) (figura 14(a) y 14(b)).

Sin embargo, se encontraron algunas diferencias entre las secuencias peptídicas y aquella deducida a partir del gen. A continuación se subrayan los aminoácidos diferentes.

Péptidos de Lys-C:	KHGTVEEYAK KYGTEGGK
Péptido de Arg-C:	RHLGADTD
Péptidos de BrCN:	MRPEATGYGLVYFLDALLKKHNQELKG MDIKNVKHGTVEEYAKGLG MSQNAARL

Los cambios son: T por A; V por E; I por L; P por A, V por L, T por A y R que no aparece en la secuencia.

Las tres modificaciones más llamativas son la de un aminoácido polar como la treonina (T) por uno hidrofóbico como la alanina (A) y un aminoácido hidrofóbico, valina (V), por uno cargado como el ácido glutámico (E). En el caso del aminoácido arginina (R) aparece secuenciado en el péptido de BrCN y también está presente en la secuencia de la enzima de *E. coli*, pero no en la secuencia obtenida de ambos genes de *T. cruzi*.

El resultado de la comparación entre la secuencia de dichos péptidos junto con los primeros 34 aminoácidos del extremo N-terminal (Cazzulo *et al.*, 1988b) y la enzima similar de *E. coli* mostró un grado de homología del 74% (figura 4).

Clonado y secuenciación del gen.

Usando la técnica de PCR sobre ADN genómico a partir de las cepas de parásitos Miranda 76 (M76) y Tulahuén 2 (Tul2) fueron obtenidas dos secuencias codificantes completas de la GluDH-NADP dependiente de *T. cruzi* llamadas *TcGluDH₁* y *TcGluDH₂*, respectivamente (GenBank Accession Numbers AF009364 y AF009365). El iniciador 5' (degenerado) utilizado para la reacción de PCR fue construido teniendo en cuenta la información obtenida de la secuencia directa de la proteína. En cambio la secuencia del iniciador 3' fue obtenida a partir de un clon identificado luego de un rastreo inmunológico (con un anticuerpo policlonal monoespecífico anti-GluDH-NADP) de una biblioteca de expresión genómica de *T. cruzi* en el fago λ gt11 (figura 13).

El marco abierto de lectura para ambos genes contiene 1341 nucleótidos (447 codones incluyendo el codón de terminación TGA), codificando para una proteína de 446 aminoácidos. En la figura 14(a) se observan las secuencias nucleotídicas de ambos genes como así también las secuencias proteicas deducidas de ellos. Estas últimas presentan entre sí una identidad del 96% (figura 14(b)).

En la región GGGKGG de la secuencia proteica se encuentra conservada la lisina (K) 128 del sitio activo, deducido por homología con otras GluDHs descriptas en la bibliografía (figura 14(b)).

De la misma manera pudieron identificarse los aminoácidos críticos de la proteína para la unión a la coenzima. Al analizar el motivo $\beta_1.\alpha.\beta_2$ se encontraron los residuos de glicina conservados e incluidos en la secuencia Gli-X-Gli-X-X-**Ala** característica de las enzimas específicas para NADP e importante para ubicar la parte central de la coenzima en la conformación correcta, permitiendo el contacto del entorno de la proteína con el difosfato de la coenzima (Scrutton *et al.*, 1990). En la figura 31 se comparan las secuencias de aminoácidos de la zona mencionada de *TcGluDH₁* y *TcGluDH₂* con algunas enzimas NAD y NADP dependientes.

Unión a NADP(H)

Enzima mítica

Rata	300	G A G E A A L G I A H L I V M A M
Glutamato dehidrogenasa		
<i>TcGluDH₁</i>	238	G S G N V A Q Y A V K K C L Q L G
<i>TcGluDH₂</i>	238	G S G N V A Q Y P V E K C L Q L G
<i>E. coli</i>	239	G S G N V A Q Y A I E K A M E F G
<i>N. crassa</i>	225	G S G N V A Q Y A A L K L I E L G
Levadura	224	G S G N V A Q Y A A L K V I E L G
Trypanotona reductasa		
<i>T. congolense</i>	195	G G G F I S V E F A G I F N A Y K
Glutation reductasa		
<i>E. coli</i>	174	G A G Y I A V E L A G V I N G L G
Humana	195	G A G Y I A V E M A G I L S A L G
<i>P. aeruginosa</i>	172	G G G Y I A V E F A S I F N G L G

Figura 31: Comparación de la secuencia de aminoácidos de una parte del dominio $\beta_1.\alpha.\beta_2$ de unión al dinucleótido en algunas enzimas NADP dependientes (en esta página) y NAD dependientes (en la página siguiente) (Scrutton *et al.*, 1990).

Unión a NAD(H)

Alcohol dehidrogenasa

Drosophila

14 **G L G G I G L D T S K Q L L K R D**

Rata

15 **G L G G V G L S V V I G C K T A G**

Lactato dehidrogenasa

B. stearothermophilus

13 **G A G F V G A S Y V F A L M N Q G**

Ratón

25 **G V G D V G M A C A I S I L L K G**

Gliceraldehído fosfato dehidrogenasa

Levadura

7 **G F G R I G R L V M R I A L S R P**

Figura 31: Comparación de la secuencia de aminoácidos de una parte del dominio β_1 . α A. β_2 de unión al dinucleótido en algunas enzimas NADP y NAD dependientes (continuación).

Además fueron localizados los residuos hidrofóbicos, también conservados, importantes para la interacción entre las estructuras secundarias; así como también un aminoácido cargado positivamente en el extremo amino terminal de la cadena β_1 , lisina (K) o arginina (R). Aunque su función se desconoce, se asocia con la estabilidad de la interacción de las cadenas β . En el carboxilo terminal de la cadena β_2 de la enzima, que se une al grupo oxidrilo de la ribosa de la coenzima, el ácido aspártico presente en las enzimas NAD dependientes se encuentra reemplazado por una glicina en todos los casos analizados de GluDHs-NADP dependientes (figura 32).

Figura 32 (en la próxima página): Comparación de la secuencia de aminoácidos de la región completa β_1 . α A. β_2 de varias GluDH-NADP dependientes.

GXGXXA Zona de glicinas y alanina conservadas.

Δ Residuos conservados cargados positivamente.

† Residuos hidrofóbicos.

‡ Glicina en reemplazo del aminoácido aspártico.

		β_1	coil	αA	β_2	
		Δ	† †	GXGXXA	† †	†
<i>TcGluDH₁</i>	KHNQEL	K GMTV	VV	S GSGNVA	QYAV	KKCLQL G EKVLSVSDSSG
<i>TcGluDH₂</i>	KHNQEL	K GMTV	VV	S GSGNVA	QYPVEK	CLQL G AKVLSVSDSRG
<i>E. coli</i>	RHGMGF	E GMRV	SV	S GSGNVA	QYAIEK	AMEFGARVITASDSSG
<i>S. typhimurium</i>	RHGLGF	E GMRV	AV	S GSGNVA	QYAIEK	AMAFGARVVTASDSSG
<i>H. influenzae</i>	EKGDSF	A GKV	VS	S GSGNVA	QYAIEK	ALSLGAKVVTCSDSG
<i>G. intestinalis</i>	DNNTVIR	G KNV	LL	S GSGNVA	QFA	CEKLIQLGAKVLTFSDSNG
<i>C. sorokiniana</i>	DKGESL	K GKR	CL	V S GAGNVA	QYCAEL	LLEKGAIVLSLSDSQG
<i>N. crassa</i>	SGAGSY	A GKR	VAL	S GSGNVA	QYAA	LKLIELGGIVVLSLSDSKG

Organización genómica.

La GluDH-NADP parece estar codificada por al menos 2 genes y probablemente más, por genoma haploide del parásito, como lo sugieren los resultados del Southern blot (figura 17 (a y b)) y por las microheterogeneidades encontradas en la secuencia de nucleótidos de la zona 5' de la región codificante (figura 19), aunque no podemos saber si todos los genes son activos o son pseudogenes.

La comparación de las secuencias de una zona de aproximadamente 40 nucleótidos del extremo 5' de tres clones genómicos de la cepa M76 y tres clones (uno genómico y dos de ADNc) de la cepa Tul2 muestra cambios conservativos. Todas las diferencias corresponden a cambios en una sola base, siempre ubicadas en la tercera posición de cada codón, resultando silenciosas. Estas sustituciones deberían ser auténticas, pues aunque los errores introducidos por la Taq polimerasa no pueden excluirse, la naturaleza conservativa o silenciosa de todos los cambios detectados hace que esta sea una alternativa poco probable. Estos datos nos permiten concluir que habría por lo menos 3 genes diferentes codificando para la GluDH en ambas cepas de parásitos.

Los experimentos de Southern blot realizados en las cepas Tul2 y RA de *T. cruzi*, el clon CA-1/72 y *T. rangeli* mostraron las señales más nítidas en condiciones muy estrictas. A pesar de la claridad de las señales, el patrón de bandas observado en *T. rangeli* resultó ser muy diferente al de Tul2. En cambio, usando ADN de los parásitos *C. fasciculata* y

L. mexicana no se detectaron señales, ni siquiera en condiciones menos estrictas, sugiriendo que en estos trypanosomátidos existen genes para GluDH-NADP diferentes, con baja homología con el gen de *T. cruzi*.

El análisis de restricción del gen completo evidenció un polimorfismo en el sitio de restricción EcoRI (a 270 pb del extremo C-terminal del gen) en el ADN genómico (figura 18, Panel a). Esta enzima permitió distinguir 2 clases de genes que codifican para la GluDH-NADP. Con el resto de las endonucleasas de restricción utilizadas no se pudieron detectar diferencias. Estos datos son coherentes con los resultados previos de los experimentos de Southern blot.

A diferencia de algunos casos estudiados en *T. cruzi*, como la cruzipaina (Campetella *et al.*, 1992) y la tirosina aminotransferasa (Bontempi *et al.*, 1993), no hay evidencias de que los genes para la GluDH-NADP estén organizados en tandems, luego de realizar digestiones parciales usando una enzima que corta inmediatamente después del codón de terminación del gen (figura 20).

El Southern blot del PFGE, usando como sonda el gen completo *TcGluDH1*, mostró dos regiones de hibridización de considerable diferencia de tamaño en varios clones de parásitos. Una de ellas corresponde a la zona de compresión (CR) que contiene cromosomas mayores a 2500 kpb y la otra banda corresponde a un tamaño entre los marcadores de 1035 y 1580 kpb.

Realizando el ensayo con los cromosomas de *C. fasciculata* y *L. mexicana* no se observó ninguna banda de hibridización, en buen acuerdo con los resultados previos del Southern blot.

En el caso de *T. rangeli* pudo observarse una zona de hibridización débil con el ADN en la zona del origen, sugiriendo que posiblemente un gen homólogo se encuentra localizado en un cromosoma muy grande (figura 21).

La comparación de las secuencias de los genes clonados de la GluDH-NADP de *T. cruzi* mostró que se encuentran más relacionados con las enzimas de eubacterias como *E. coli* (Valle *et al.*, 1983), *Salmonella thyphimurium* (Miller and Brenchley, 1984; Bansal *et al.*, 1989) y *Haemophilus influenzae* (Fleischman *et al.*, 1995) que con aquellas provenientes de eucariontes inferiores como otros protozoos, *G. intestinalis* (Yee and Dennis, 1992) (supuestamente el organismo eucarionte más antiguo), el alga unicelular *C. sorokiniana* (Cock *et al.*, 1991) y hongos como *N. crassa* (Kinnard and Fincham, 1983)

y *S. cerevisiae* (Nagasu and Hall, 1985). En las figuras 15(a) y 15(b) se muestran las comparaciones entre las secuencias de las GluDHs mencionadas. Teniendo en cuenta a *TcGluDH₂* como base para la comparación, las enzimas de *E. coli*, *S. thyphimurium* y *H. influenzae* presentan 69, 70 y 67% de identidad, respectivamente; si se tiene en cuenta *TcGluDH₁* para la comparación la identidad con la enzima bacteriana es ligeramente mayor, 71, 71 y 68%, respectivamente. La identidad de *TcGluDH₂* con respecto a las enzimas de eucariontes inferiores fue entre el 56% para *G. intestinalis* y 51% para *S. cerevisiae*. La menor identidad fue encontrada al comparar las secuencias de GluDH-NADP de *T. cruzi* con las de Arqueobacterias, como *Sulfolobus shibatae* (Benachenhou and Baldacci, 1991) y *Halobacterium salinarum* (Benachenhou-Lahfa et al., 1994) (19 y 21% de similitud, respectivamente).

Es destacable que en el caso de otras enzimas del *T. cruzi* involucradas en el catabolismo de proteínas y aminoácidos, presentan mayor similitud a las enzimas correspondientes de mamíferos, como en el caso de la tirosina aminotransferasa, mientras que la alanina aminotransferasa del parásito, parcialmente secuenciada, presenta la mayor similitud con la correspondiente enzima de plantas.

Uso preferencial de codones.

A pesar de la degeneración del código genético, el análisis de secuencias nucleotídicas revela que los codones no son usados de la misma forma. La preferencia por ciertos codones tiene efectos profundos en la expresión de los genes. Por ejemplo en el caso del aminoácido arginina (R) codificado por 6 codones diferentes, el uso de los codones AGA y AGG presenta alta frecuencia de aparición en parásitos de humanos como *Plasmodium falciparum* y *Entamoeba histolytica*. En cambio estos codones aparecen muy raramente en *E. coli*. Por lo tanto dichos codones podrían estar involucrados en la regulación de la expresión de ciertos genes (Sayers et al., 1995). Los genes con marco abierto de lectura conteniendo los codones AGG y AGA podrían ser traducidos en baja proporción en comparación con aquellos que posean los codones CGU y CGC para el mismo aminoácido. Esto puede ocurrir debido a la limitada interacción con los escasos ARNt^{AGA/AGG} disponibles. La expresión genética puede verse inhibida si se presentan los codones mencionados en tandem o cerca del codón de iniciación. Esto tiene además importantes consecuencias cuando se quiere expresar un gen en bacterias. Sin embargo, en nuestro caso, no constituyó un problema durante la expresión de la proteína recombinante GluDH-NADP en *E. coli* debido a que ambos organismos presentan una preferencia de codones muy semejante.

Parsons *et al.* (1991) revelaron que en *T. brucei* los genes que codifican enzimas de las vías metabólicas centrales, llamados “housekeeping”, presentan una muy fuerte preferencia por codones, a diferencia de los genes que codifican para proteínas raras o poco abundantes. Los resultados informados están de acuerdo con lo que ocurre en *E. coli* y levadura, en los cuales los genes codificando proteínas expresadas en cantidad muestran preferencia por codones con abundantes ARNt. En el caso de *T. brucei* los codones escogidos para los genes “housekeeping” no fueron elegidos para los genes que codifican la proteína altamente expresada VSG, indicando que además de la abundancia de los aminoacil-ARNt otros factores deben estar involucrados en la elección de los codones.

La preferencia de codones de la GluDH-NADP de *T. cruzi* mostró que para el aminoácido leucina (L) rara vez se utiliza el codón UUA, lo mismo que para la valina (V) el codón GUA, al igual que en *E. coli*. Sin embargo el codón preferido para (V) en *T. cruzi* es GUG y en *E. coli* es GUU. Además se detectaron diferencias entre ambos organismos en las preferencias para los aminoácidos prolina (P), CCC en *T. cruzi* sobre CCG en *E. coli*, treonina (T), ACA o ACG en *T. cruzi* sobre ACC en *E. coli*. Para alanina (A), en *T. cruzi* rara vez se utiliza el codón GCA lo mismo que para Tirosina (Y) el codón UAU. Para asparagina (N), lisina (K) y arginina (R) se prefiere AAC, AAG y CGC respectivamente en la GluDH-NADP de *T. cruzi*. Para la glicina (G) el codón usado con mayor frecuencia en ambos genes es GGC (figura 16 (a y b)).

Luego se compararon las preferencias de codones con otros organismos y con otros genes de *T. cruzi*. En relación con *Homo sapiens* muestran diferencias importantes en los aminoácidos treonina (T), alanina (A), arginina (R) y glicina (G). *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae* indican mayores diferencias y en más alto número de aminoácidos. Las diferencias con *Giardia intestinalis* son aún mayores. Entre los trypanosomátidos, la preferencia es muy diferente en al caso del material genético del kinetoplasto, en cambio los genes comparados de *T. cruzi*, *T. rangeli* y *T. brucei brucei*, muestran bastante semejanza en cuanto a sus preferencias salvo contadas excepciones (en orden decreciente de semejanza). *Crithidia fasciculata*, *Leishmania donovani* y *Leishmania mexicana* presentan una semejanza sorprendente entre ellas en el uso preferencial de codones y difieren de los usados en el gen GluDH-NADP de *T. cruzi*.

Búsqueda de posibles isoformas de la GluDH-NADP.

Las evidencias bioquímicas obtenidas de la bibliografía sugerían que la GluDH-NADP presentaba localizaciones múltiples, siendo mayormente citosólica, con una segunda localización, menor, mitocondrial y una posible tercera ubicación, muy minoritaria, aún no determinada (Duschak and Cazzulo, 1991). Los resultados obtenidos en este trabajo se inclinan por la primera localización y ratifican las evidencias obtenidas por experimentos de inmunomicroscopía electrónica que sugieren una ubicación exclusivamente citosólica (Souto-Padrón *et al.*, 1990). A diferencia de los genes codificando para la isoforma citosólica, aquellos que contienen información para la forma mitocondrial deberían presentar un péptido de tránsito a la mitocondria como una secuencia corta de aminoácidos (entre 20 y 80) en el extremo N-terminal para su translocación post-traducciona. Dicha secuencia, reconocida por receptores de la mitocondria sería luego clivada de la proteína durante la translocación (Glick *et al.*, 1992).

Ya que el oligonucleótido N-terminal utilizado para la amplificación de los genes completos es derivado de la secuencia de la proteína madura, no podría descartarse *a priori* la posible presencia de dos genes codificando isoformas de la enzima con diferente localización subcelular, difiriendo solamente en la presencia o ausencia de un péptido señal. Para obtener información en este sentido, se realizaron estudios de RT-PCR sobre ARN total de la cepa Tul2, usando como oligonucleótidos iniciadores la secuencia del miniexón, presente en todos los ARNm maduros (De Lange *et al.*, 1984) y dos secuencias internas del gen *TcGluDH2*. Solo se obtuvo un tipo de fragmento de 139 pb de longitud. En los clones analizados dicho fragmento contenía la secuencia del miniexón de 39 pb (5' AACTAACGGTATTATTGATACAGTTTCTGTACTATATTG 3'), luego una zona no traducida (5' UTR) de 40 pb (AAA ACTAATTTTAAAGAAAAGGAAAAAAGCAAATACATCATA) o (AAA ACTAATTTTAAAGAAAAGAAAAAACAATACATCATA) y finalmente 60 pb correspondientes al extremo amino terminal del gen de la GluDH-NADP (figura 30). Los resultados obtenidos hacen muy poco probable la presencia de dos genes (uno conteniendo un péptido señal) y además, el residuo Met (metionina) presente en el extremo N-terminal de la proteína madura fue la única Met posible encontrada para la iniciación de la síntesis proteica.

Expresión de la proteína recombinante.

El gen *TcGluDH1* codifica una proteína enzimáticamente activa al ser expresada en *E. coli*. El sistema utilizado para dicha expresión permitió la obtención de la proteína con un tamaño adecuado por subunidad de 47 kDa, reconocida por el antisuero policlonal monoespecífico anti-GluDH-NADP en ensayos de Western blot (figura 25(a) y 26). La proteína recombinante pudo ser purificada en un solo paso por cromatografía de afinidad en Blue Sepharose en las mismas condiciones que la enzima natural, obteniendosela homogénea en muy buena cantidad y con el peso molecular esperado (figura 28). La alta homología de la enzima de *T. cruzi* con respecto a la de *E. coli* no interfiere con la expresión de la primera, ya que los niveles basales de actividad endógena de la enzima bacteriana son muy bajos en comparación con los de la enzima recombinante debido a que la GluDH de *E. coli* se encuentra sometida a una estricta regulación.

A pesar de la secuencia de polihistidina que introduce el sistema de expresión en cada subunidad de la GluDH-NADP la proteína se ensambló correctamente para formar el homohexámero enzimáticamente activo de 280 kDa (figura 27).

Los estudios cinéticos comparados de la enzima natural y la forma recombinante permitieron comprobar que no existen diferencias significativas entre ambas en este sentido (tabla 4).

La enzima recombinante puede ser utilizada para estudios estructurales, y eventualmente para la obtención de cristales. Además, ya que la enzima natural es tan estable, manteniendo su actividad por varios meses en solución a 4°C, la posibilidad de producir la proteína recombinante en *E. coli* a gran escala, hace posible su uso como reactivo para la determinación enzimática de amonio y como enzima acoplada para el ensayo de transaminasas.

Expresión de la GluDH-NADP de *T. cruzi* en los diferentes estadios del ciclo de vida.

Durante el proceso de diferenciación existen cambios dinámicos en la expresión de un gran número de proteínas (Ruiz-Ruano *et al.*, 1991).

Rodríguez *et al.* (1993) estudiaron la expresión de la β -tubulina durante la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos en *T. cruzi*. Experimentos cuantitativos de Western blot y ensayos de marcación y seguimiento revelaron un aumento en la cantidad relativa de la proteína en los tripomastigotes metacíclicos con respecto a los epimastigotes,

acompañado por una baja tasa de degradación. En cambio, experimentos de Northern blot y traducción *in vitro* mostraron una menor presencia de transcritos de β -tubulina en tripomastigotes metacíclicos. Los autores proponen que en *T. cruzi*, luego de la diferenciación, la maquinaria de traducción para proteínas clave como la β -tubulina se apaga por falta de su mensajero específico. Sin embargo los niveles de proteína se mantuvieron debido a un mecanismo compensatorio que involucra una baja tasa de recambio de la proteína sintetizada.

La expresión de la GluDH-NADP de *T. cruzi* está regulada en el desarrollo de una forma parecida a la cruzipaina. La forma epimastigote de cultivo presentó en ambos casos, considerablemente mayor actividad enzimática y mayores niveles de proteína, al compararlos con las formas amastigote y tripomastigote. Sin embargo, la cruzipaina no muestra correlación entre los niveles de ARNm, la cantidad de proteína y su actividad, sugiriendo que la regulación de la expresión de la proteinasa es post-transcripcional (Tomas and Kelly, 1996), mientras que en el caso de la GluDH-NADP existe mucha mayor correlación.

Los resultados obtenidos muestran que los niveles de ARNm en los extractos de tripomastigotes y amastigotes fueron casi indetectables en comparación con los niveles en la forma epimastigote, y los niveles de proteína fueron también mucho menores que en la forma epimastigote (figuras 22, 23 y tabla 2). Las diferencias en los niveles de ARNm en las diferentes formas del parásito pueden deberse a una disminución en la expresión del gen debido a la presencia de mecanismos de regulación de la transcripción, muy poco estudiados en *T. cruzi*, o a una alta tasa de degradación del ARNm correspondiente a la GluDH-NADP.

Cuando el mismo ensayo de Northern blot se realizó usando ARN de los parásitos *C. fasciculata* y *L. mexicana* no se evidenció la presencia de mensajeros para la GluDH en estos organismos, aún luego de varios días de exposición, sugiriendo que las enzimas de estos parásitos deberían ser muy diferentes en concordancia con los ensayos de Southern blot.

La diferencia en los niveles de la GluDH-NADP en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito sugiere que el rol que juega esta enzima en el metabolismo de aminoácidos es probablemente diferente, al menos cuantitativamente.

La forma tripomastigote sanguínea tiene la posibilidad de usar glucosa como principal fuente de carbono, mientras que la fuente utilizada por la forma amastigote no se encuentra bien definida aún. Por otro lado, la forma epimastigote que se aloja en el insecto vector, probablemente dependa casi exclusivamente de los aminoácidos como fuente de carbono y energía. El intestino del vector *Triatoma*, poco tiempo después de la ingesta de sangre, permanece casi completamente privado de carbohidratos, mientras que los principales nutrientes deberán ser derivados de aminoácidos provenientes de la degradación de la hemoglobina por medio de las peptidasas del insecto. La actividad incrementada de la GluDH-NADP en esta forma del parásito sugiere que la enzima debe tener un rol conectado de algún modo con el catabolismo y la generación de energía, pese al hecho de que en otros organismos bioquímicamente más convencionales, esta enzima es esencialmente biosintética.

Conclusiones

Conclusiones

A través de este trabajo de Tesis Doctoral se llegaron a las siguientes conclusiones:

(1) La glutamato dehidrogenasa-NADP dependiente (GluDH-NADP) de *Trypanosoma cruzi* fue purificada a homogeneidad proteica a través de una modificación del protocolo original. Al cambiar el paso de la columna de Sephadex G-200 por una columna de afinidad en Blue Sepharose se logró una mejor purificación en igual número de pasos. La enzima se purificó 60 veces con un rendimiento del 58%.

(2) La obtención de secuencias peptídicas de la GluDH-NADP por tratamiento con tripsina, BrCN y las endoproteinasas Arg-C y Lys-C, junto con la secuencia del extremo N-terminal (determinada previamente en el laboratorio) permitió conocer la secuencia del 30% de la molécula, que mostró una homología del 74% con la enzima correspondiente de *E. coli*.

(3) Se pudo determinar la secuencia completa de 2 genes que codifican para la GluDH-NADP provenientes de dos cepas de parásitos, Miranda 76 (M76) y Tul2, llamados *TcGluDH₁* y *TcGluDH₂* respectivamente (Número de Acceso al GenBank AF009364 y AF009365). En ambos casos el marco abierto de lectura consiste en 1338 nucleótidos codificando para una proteína de 446 aminoácidos. Las secuencias proteicas de *TcGluDH₁* y *TcGluDH₂* presentan una identidad del 96%. En la región GGGKGG de la secuencia proteica se encuentra conservado el residuo Lys 128 del sitio activo deducido por homología con otras GluDHs descritas en la bibliografía. De la misma manera pudieron identificarse los aminoácidos críticos de la proteína para la unión a la coenzima.

(4) La comparación de las secuencias proteicas de *TcGluDH₁* y *TcGluDH₂* con otras GluDHs-NADP del banco de datos, indica que hay una relación mayor entre la enzima de *T. cruzi* con las correspondientes de *E. coli*, *Salmonella thyphimurium* y *Haemophilus influenzae*, que con la enzima de otros eucariontes como *G. intestinalis*, *C. sorokiniana*, *N. crassa* y *S. cerevisiae*.

(5) Experimentos de Southern blot usando como sonda el gen completo *TcGluDH₁* mostraron que cuando el ADN genómico es digerido con diferentes enzimas de restricción se puede detectar la presencia de más de un gen por genoma haploide. El patrón de bandas más claro se detectó con las cepas Tul2 y RA, el clon CA-1/72 de *T. cruzi* y con el ADN de *T. rangeli*. En cambio no se detectaron señales en los experimentos con ADN de *C. fasciculata* y *L. mexicana*, sugiriendo que en estos organismos posiblemente los genes sean poco homólogos a los de *T. cruzi*.

(6) Se determinó un polimorfismo solo para la enzima de restricción EcoRI en ADN genómico de la cepa Tul2, sugiriendo la presencia de dos genes que codifican para la proteína.

(7) Al secuenciar el extremo N-terminal de distintos clones (completos e incompletos) provenientes de ADN genómico de la cepa M76 y de la cepa Tul2, se encontraron varios cambios conservativos en los primeros 40 nucleótidos que apoyan los resultados del Southern blot acerca de la existencia de varios genes. Dichos cambios se producen siempre en la tercera base del codón y en algunos casos se sustituye completamente el codón sin provocar cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

(8) Mediante experimentos de digestiones parciales se pudo concluir que los genes para la GluDH-NADP no se encuentran dispuestos en tandem.

(9) Los experimentos de PFGE y Southern blot para determinar la ubicación cromosomal de los genes de la GluDH-NADP revelaron dos zonas de hibridización en distintos parásitos. Una de ellas corresponde a la zona de compresión (CR) que contiene cromosomas mayores a 2500 kpb. La otra banda se encuentra entre los marcadores de 1035 y 1580 kpb. No se detectaron bandas de hibridización con los cromosomas de *C. fasciculata* y *L. mexicana*. En *T. rangeli* solo se detecta una zona de hibridización débil con el ADN en la zona del origen, sugiriendo que posiblemente un gen homólogo se localiza en un cromosoma muy grande.

(10) En experimentos de Northern blot, comparando distintas cepas, clones y formas del ciclo de vida del parásito, se detectaron señales en la forma epimastigote de las cepas RA, Tul2 y el clon Sylvio, siendo apenas detectables en las formas trypomastigote

y amastigote de RA. Las diferencias obtenidas en las señales de las distintas formas del ciclo de vida de *T. cruzi* indican que la GluDH-NADP es una enzima regulada en el desarrollo. No se detectaron señales en *C. fasciculata* y *L. mexicana*.

(11) La determinación de la actividad específica y la comparación a nivel de la cantidad de proteína GluDH-NADP en las distintas formas del ciclo de vida de *T. cruzi* mostraron una buena correlación con los resultados del Northern blot.

(12) El gen clonado y secuenciado *TcGluDH₁* de la cepa M76 fue expresado como una proteína recombinante en el marco de lectura correcto, con un peso molecular de 47 kDa por subunidad, reconocida por el antisuero anti-GluDH-NADP, y activa. La inducción de la proteína recombinante provoca un aumento en la actividad de aproximadamente 550 veces con respecto al control de células sin transformar con el plásmido recombinante.

(13) La enzima recombinante fue purificada, a partir de células inducidas, por cromatografía de afinidad en Blue Sepharose de la misma manera que la enzima natural. La purificación en un solo paso permitió la producción de enzima recombinante homogénea y en muy buena cantidad. Los estudios cinéticos comparados de la enzima natural y la forma recombinante permitieron concluir que no existen diferencias significativas entre ellas.

(14) Para descartar la posibilidad de la existencia de dos genes codificando isoformas de la GluDH-NADP con diferente localización subcelular (citosólica y mitocondrial), diferenciadas por la presencia o ausencia de un péptido de tránsito a la mitocondria, se realizaron experimentos de RT-PCR semianidada. Los resultados obtenidos permiten asegurar que la enzima estudiada en nuestro laboratorio es citosólica excluyendo la presencia de una isoforma mitocondrial.

Bibliografía

Al-Gharawi, A. and Moore, D. (1977). Factors affecting the amount and the activity of the glutamate dehydrogenase of *Coprinus cinereus*. **Biochim. Biophys. Acta** **496**, 95-102.

Amuro, N., Yamaura, M., Goto, Y. and Okazaki, T. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA for human liver glutamate dehydrogenase precursor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **152**, 1395-1400.

Andrews, N.W., Abrams, C.K., Slatin, S.L., Griffiths, G. (1990). A *T. cruzi* secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell** **61**, 1277-1287.

Arts, G.J. and Benne, R. (1996). Mechanism and evolution of RNA editing in kinetoplastida. Review. **Biochim. Biophys. Acta** **1307**, 39-54.

Ashall, F. (1990). Characterization of an alkaline peptidase of *Trypanosoma cruzi* and other Trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.** **38**, 77-88.

Ashby, B., Wootton, J.C. and Fincham, J.R. (1974). Slow conformational changes of a *Neurospora*. glutamate dehydrogenase studied by protein fluorescence. **Biochem. J.** **143**, 317-329.

Austen, B.M., Haberland, M.E., Nyc, J.F. and Smith, E.L. (1977). Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. **J. Biol. Chem.** **252**, 8142-8149.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. Editorial board (1987). Current Protocols in Molecular Biology. Volume 1, Chapter 4. Published by Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Avila, J.L., Casanova, M.A., Avila, A. and Bretaña, A. (1976). Acid and neutral hydrolases in *Trypanosoma cruzi*. Characterization and assay. **J. Protozool.** **26**, 304-311.

Avila, J.L. (1992). Intracellular digestion of endocytosed proteins as a source of amino acids for protein synthesis in *Trypanosoma cruzi*. In Subcellular Biochemistry, Vol 18: Intracellular Parasites, Cap 6, 187-227. Edited by J.L. Avila and J.R. Harris. Plenum Press, New York, 1992.

Bacchi, C.J., Lambros, C., Goldberg, B., Hutner, S.H. and De Carvalho, D.A. (1974). Susceptibility of *Leptomonas* and *Crithidia fasciculata* to several established antitrypanosomatid agents. **Antimicrob. Agents. Chemother.** **6**, 787-790.

Baker, P.J., Britton, K.L., Engel, P.C., Farrants, G.W., Lilley, K.S., Rice, D.W & Stillman, T.J. (1992). Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase. **Proteins Struct. Funct. Genet.** **12**, 75-86.

Banner, C., Silverman, S., Thomas, J.W., Lampel, K.A., Vitkovic, L., Huie, D. and Wenthold, R.J. (1987). Isolation of a human brain cDNA for glutamate dehydrogenase. **J. Neurochem.** **49**, 246-252.

Bansal, A., Dayton, M.A., Zalkin, H. and Colman, R.F. (1989). Affinity labeling of a glutamyl peptide in the coenzyme binding site of NADP⁺-specific glutamate dehydrogenase of *Salmonella typhimurium* by 2-[(4-bromo-2,3-dioxobutyl)thio]-1, N6-ethenoadenosine 2',5'-bisphosphate. **J. Biol. Chem.** **264**, 9827-9835.

Barriga, O.O. (1991). Inmunología en las infecciones parasitarias. Parasitología clínica. Cap. 6, 74-97. Antonio Atias, ed. Publicaciones Técnicas, Mediterráneo, Santiago, Chile.

Barros, E.G. and Caldas, R.A. (1983). Partial purification and characterization of glutamic-pyruvic transaminase from *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** **74B**, 449-452.

Bellamacina, C.R. (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. **FASEB J.** **10**, 1257-1269.

Benachenhou, N. and Baldacci, G. (1991). The gene for a halophilic glutamate dehydrogenase: sequence, transcription analysis and phylogenetic implications. **Mol. Gen. Genet.** **230**, 345-352.

Benachenhou-Lahfa, N., Labedan, B. and Forterre, P. (1994). PCR-mediated cloning and sequencing of gene encoding GDH from the archaeon *Sulfolobus shibatae*: identification of putative amino-acid signatures for extremophilic adaptation. **Gene** **140**, 17-24.

Bimboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids. Res.** **7**, 1513-1523.

Bogonez, E., Satrústegui, J. and Machado, A. (1985). Regulation by ammonium of glutamate dehydrogenase (NADP⁺) from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** **131**, 1425-1432.

Boles, E., Lehnert, W. and Zimmermann, F.K. (1993). The role of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase in restoring growth on glucose of a *Saccharomyces cerevisiae* phosphoglucose isomerase mutant. **Eur. J. Biochem.** **217**, 469-477.

Bongertz, V. and Hungerer, K.D. (1978). *Trypanosoma cruzi*: Isolation and characterization of a protease. **Exp. Parasitol.** **45**, 8-18.

Bontempi, E., Franke de Cazzulo, B.M., Ruiz, A.M. and Cazzulo, J.J. (1984). Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** **77B**, 599-604.

Bontempi, E., Martinez, J. and Cazzulo, J.J. (1989). Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **33**, 43-47.

Bontempi, E., Búa, E.J., Åslund, L., Porcel, B., Segura, E.L., Henriksson, J., Orn, A., Pettersson, U. and Ruiz, A.M. (1993). Isolation and characterization of a gene from *Trypanosoma cruzi* encoding a 46-kilodalton protein with homology to human and rat tyrosine aminotransferase. **Mol. Biochem. Parasitol.** **59**, 253-262.

Börmann, E.R., Eikmanns, B.J. and Sahm, H. (1992). Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. **Mol. Microbiol.** **6**, 317-326.

Borst, P. (1986). Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. **Ann. Rev. Biochem.** **55**, 701-732.

Borst, P. (1991). Why kinetoplast DNA networks?. **TIG** **7**, 139-141.

Borst, P., Nussenzweig, V. (1992). Molecular Parasitology at Woods Hole. **Cell** **71**, 895-899.

Boveris, A., Hertig, C.M. and Turrens, J.F. (1986). Fumarate reductase and other mitochondrial activities in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **19**, 163-169.

Bowman, I.B.R., Flynn, I.W. (1976). Oxidative metabolism of trypanosomes. In Biology of the Kinetoplastida, ed. W.H.R. Lumsden, D.A. Evans, 1, 435-476. New York: Academic.

Boyer, H. W. and Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.** **41**, 459-472.

Brabin, L. (1993). *Trypanosoma cruzi* infection in women. **Parasitol. Today** **9**, 198-199.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**, 248-254.

Branden, C. and Tooze, J. (1991). Enzymes that bind nucleotides. In Introduction to Protein Structure. Garland Publishing, Inc. New York and London. Capítulo 10, 141-159.

Bringaud, F., Stripecke, R., Frech, G.C., Freedland, S., Turck, C., Byrne, E. and Simpson, L. (1997). Mitochondrial glutamate dehydrogenase from *Leishmania tarentolae* is a guide RNA-binding protein. **Mol. Cell. Biol.** **17**, 3915-3923.

Britton, K.L., Baker, P.J., Rice, D.W. and Stillman, T.J. (1992). Structural relationship between the hexameric and tetrameric family of glutamate dehydrogenases. **Eur. J. Biochem.** **209**, 851-859.

Bulen, W.A. (1956). The isolation and characterization of glutamic dehydrogenases from Corn leaves. **Arch. Biochem. Biophys.** **62**, 173-183.

Burleigh, B.A., Caler, E.V., Webster, P. and Andrews, N.W. (1997). A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signalling in mammalian cells. **J. Cell. Biol.** **136**, 609-620.

Burnette, N.W. (1981). "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.** **112**, 195-203.

- Cáceres, O. and Fernandes, J.F. (1976). Glucose metabolism, growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Brasil. Biol.** **36**, 397-410.
- Camargo, E.P., Coelho, J.A., Moraes, G. and Figueiredo, E.N. (1978). *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and *Leptomonas* spp.: Enzymes of ornithine-arginine metabolism. **Exp. Parasitol.** **46**, 141-144.
- Campetella, O., Martínez, J. and Cazzulo, J.J. (1990). A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.** **67**, 145-150.
- Campetella, O., Henriksson, J., Åslund, L., Frasch, A.C.C., Pettersson, U. and Cazzulo, J.J. (1992). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.** **50**, 225-234.
- Cannata, J.J.B., Valle, E., Docampo, R. and Cazzulo, J.J. (1982). Subcellular localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **6**, 151-160.
- Cannata, J.J.B., and Cazzulo, J.J. (1984a). The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** **79B**, 297-308.
- Cannata, J.J.B., and Cazzulo, J.J. (1984b). Glycosomal and mitochondrial malate dehydrogenases in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **11**, 37-49.
- Carlomagno, M., Cura, E., Pérez, A., y Segura, E. (1989). Informe sobre Chagas. **Ciencia Hoy** **1**, 37-44.
- Carvalho, T.U. and De Souza, W. (1983) Separation of amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from cultured cells. **Zentbl. Bakt. Parasitenkunde Abt. I** **69**, 571-575.
- Cazzulo, J.J., Juan, S.M. and Segura, E.L. (1977). Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** **56B**, 301-303.
- Cazzulo, J.J., Franke de Cazzulo, B.M., Higa, A.I. and Segura, E.L. (1979). NAD-linked glutamate dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** **64**, 129-131.

Cazzulo, J.J., Franke de Cazzulo, B.M. and Segura, E.L. (1980). Inhibition of the NAD-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* by sulfhydryl reagents. **Comp. Biochem. Physiol.** **67 B**, 163-166.

Cazzulo, J.J. (1984). Protein and amino acids catabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** **79B**, 309-320.

Cazzulo, J.J., Franke de Cazzulo, B.M., Engel, J.C. and Cannata, J.J.B. (1985). End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in Trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.** **16**, 329-343.

Cazzulo, J.J., Arauzo, S., Franke de Cazzulo, B.M., and Cannata, J.J.B. (1988a). On the production of glycerol and L-alanine during the aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. **FEMS Microbiol. Lett.** **51**, 187-192.

Cazzulo, J.J., Nowicki, C., Santomé, J.A., Wernstedt, C., Hellman, U. (1988b). Amino acid composition and N-terminal sequence of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.** **56**, 215-220.

Cazzulo, J.J., Couso, R., Raimondi, A., Wernstedt, C. and Hellman, U. (1989a). Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **33**, 33-41.

Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C. and Franke de Cazzulo, B.M. (1989b). On the regulatory properties of the pyruvate kinase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **FEMS Microbiol. Lett.** **59**, 259-264.

Cazzulo, J.J. (1992a). Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*. In Subcellular Biochemistry, Vol 18: Intracellular Parasites, Cap 7, 235-257. Edited by J.L. Avila and J.R. Harris. Plenum Press, New York, 1992.

Cazzulo, J.J. (1992b). Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. **FASEB J.** **6**, 3153-3161.

Chávez, S., Reyes, J.C., Chauvat, F., Florencio, F.J. and Candau, P. (1995). The NADP-glutamate dehydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis 6803*: cloning, transcriptional analysis and disruption of the *gdhA* gene. **Plant Mol. Biol.** **28**, 173-188.

Cho, S.W., Lee, J. and Choi, S.Y. (1995). Two soluble forms of glutamate dehydrogenase isoproteins from bovine brain. **Eur. J. Biochem.** **233**, 340-346.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.** **162**, 156-159.

Chung, H.M., Lee, M.G.S. and Van der Ploeg, L.H.T. (1992). RNA polymerase I-mediated protein-coding gene expression in *Trypanosoma brucei*. **Parasitol. Today** **8**, 414-418.

Clayton, C.E. and Michels, P. (1996). Metabolic compartmentation in African trypanosomes. **Parasitol. Today** **12**, 465-472.

Cock, J.M., Kim, K.D., Miller, P.W., Hutson, R.G. and Schmidt, R.R. (1991). A nuclear gene with many introns encoding ammonium-inducible chloroplastic NADP-specific glutamate dehydrogenase(s) in *Chlorella sorokiniana*. **Plant Mol. Biol.** **17**, 1023-1044.

Corman, L. and Kaplan, N.O. (1967). Kinetic studies of dogfish liver glutamate dehydrogenase with diphosphopyridine nucleotide and the effect of added salts. **J. Biol. Chem.** **242**, 2840-2846.

Covello, P.S. and Gray, M.W. (1993). On the evolution of RNA editing. **TIG** **9**, 265-268.

Cox, F.E.G. (1993). Parasitic Protozoa. In Modern parasitology. A Textbook of Parasitology. Blackwell Scientific Publications. Oxford. (Cox, F.E.G. ed). Capítulo 1, 1-23.

Cross, G.A.M., Klein, R.A. and Linstead, D.J. (1975). Utilization of amino acids by *Trypanosoma cruzi* in culture: L-threonine as a precursor for acetate. **Parasitology** **71**, 311-326.

Cymeryng, C., Cazzulo, J.J. and Cannata, J.J. (1995). Phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and physicochemical and kinetic properties. **Mol. Biochem. Parasitol.** **73**, 91-101.

Darling, T.N., Davis, D.G., London, R.E., and Blum, J.J. (1987). Products of *Leishmania braziliensis* glucose catabolism: release of D-lactate and, under anaerobic conditions, glycerol. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **84**, 7129-7133.

Das, A.T., Moerer, P., Charles, R., Moorman, A.F. and Lamers, W.H. (1989). Nucleotide sequence of rat liver glutamate dehydrogenase cDNA. **Nucleic Acids Res.** **17**, 2355.

Das, A.T., Arnberg, A.C., Malingre, H., Moerer, P., Charles, R., Moorman, A.F. and Lamers, W.H. (1993). Isolation and characterization of the rat gene encoding glutamate dehydrogenase. **Eur. J. Biochem.** **211**, 795-803.

De Lange, T., Berkvens, T.M., Veerman, H.J.G., Frasch, A.C.C., Barry, J.D. and Borst, P. (1984). Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. **Nucleic Acids Res.** **12**, 4431-4443.

De Souza, M.A. (1983). A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE- cellulose columns. **Mem. Inst. O. Cruz.** **83**, 123-133.

De Zoysa, P.A., Connerton, I.F., Watson, D.C. and Johnston, J.R. (1991). Cloning, sequencing and expression of the *Schwannomyces occidentalis* NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene. **Curr. Genet.** **20**, 219-224.

Dietrich, P., Soares, M.B., Affonso, M.H.T. and Floeter-Winter, L.M. (1993). The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene** **125**, 103-107.

Di Prisco, G. and Casola, L. (1975). Detection of structural differences between nuclear and mitochondrial glutamate dehydrogenases by the use of immunoadsorbents. **Biochemistry** **14**, 4679-4683.

Di Prisco, G. (1975). Effect of pH and ionic strength on the catalytic and allosteric properties of native and chemically modified ox liver mitochondrial glutamate dehydrogenase. **Arch. Biochem. Biophys.** **171**, 604-612.

DiRuggiero, J., Robb, F.T., Jagus, R., Klump, H.H., Borge, K.M., Kessel, M., Mai, X. and Adams, M.W. (1993). Characterization, cloning, and in vitro expression of the extremely thermostable glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon, ES4. **J. Biol. Chem.** **268**, 17767-17774.

Duschak, V. and Cazzulo, J. J. (1991). Subcellular localization of glutamate dehydrogenases and alanine aminotransferase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.** **83**, 131-136.

Eggen, R.I., Geerling, A.C. Waldkotter, K., Antranikian, G. and de Vos, W.M. (1993). The glutamate dehydrogenase-encoding gene of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: sequence, transcription and analysis of the deduced amino acid sequence. **Gene** **132**, 143-148.

Engel, J.C., Franke de Cazzulo, B.M., Stoppani, A.O.M., Cannata, J.J.B. and Cazzulo, J.J. (1987). Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.** **25**, 1-10.

Engelhardt, H. and Klemme, J.H. (1978). Characterization of an allosteric, nucleotide-unspecific glutamate dehydrogenase from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. **FEMS Microbiol. Lett.** **3**, 287-290.

Fairlamb, A.H. and Oppendoes, F.R. (1986). Carbohydrate metabolism in African trypanosomes, with special reference to the glycosome. In Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells (Morgan, M.J., ed) pp. 183-224. Plenum, New York and London.

Fernández, A.P., Nelson, K. and Beverley, S.M. (1993). Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: Perspectives on the age and origins of parasitism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **90**, 11608-11612.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Smith, H.O. and Venter, J.C. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science** **269**, 496-512.

Fraidenraich, D., Peña, C., Isola, E.L., Lammel, E.M., Coso, O., Díaz Añel, A., pongor, S., Baralle, F., Torres, H.N. and Flawiá, M.M. (1993). Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an α D-globin fragment from *Triatoma* hindgut: Effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** **90**, 10140-10144.

Fraser, R.D.B. and Suzuki, E. (1973). In Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, Part C (Leach S.J., ed) vol. 21, pág. 301-355. Academic Press, New York.

Frasch, A.C.C., Cazzulo, J.J. and Stoppani, A.O.M. (1978). Solubilization and some properties of the Mg^{2+} -activated adenosine triphosphatase from *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** **61B**, 207-212.

Frasch, A.C.C., Cazzulo, J.J., Åslund, L. and Petterson, U. (1991). Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. **Parasitol. Today** **7**, 148-151.

Frieden, C. (1959). Glutamic dehydrogenase. **J. Biol. Chem.** **234**, 809-814.

Frieden, C. and Colman, R. (1967). Glutamate dehydrogenase concentration as a determinant in the effect of purine nucleotides on enzymatic activity. **J. Biol. Chem.** **242**, 1705-1715.

Galanti, N. and Toro, C.G. (1994). Organization of *Trypanosoma cruzi* chromatin. Biology of Parasitism, pág 197-203. Ediciones Trilce, Montevideo, Uruguay, 1994. (Edited by Ehrlich, R. and Nieto, A).

Glick, B.S., Beasley, E.M. and Schatz, G. (1992). Protein sorting in mitochondria. **TIBS** **17**, 453-458.

Grieg, S. and Ashall, F. (1990). Electrophoretic detection of *Trypanosoma cruzi* peptidases. **Mol. Biochem. Parasitol.** **39**, 31-38.

Haberland, M.E. and Smith, E.L. (1980). Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora crassa*. **J. Biol. Chem.** **255**, 7984-7992.

Hajduk, S.L., Harris, M.E. and Pollard, V.W. (1993). RNA editing in kinetoplastid mitochondria. **FASEB J.** **7**, 54-63.

Hawkins, A.R., Gurr, S.J., Montague, P. and Kinghorn, J.R. (1989). Nucleotide sequence and regulation of expression of the *Aspergillus nidulans* gdhA gene encoding NADP dependent glutamate dehydrogenase. **Mol. Gen. Genet.** **218**, 105-111.

Hein, J.J. (1990). Unified Approach to Alignment and Phylogenies. **Meth. Enzymol.** **183**, 626-645.

Hemmilä, I.A. and Mäntsälä, P.I. (1978). Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. **Biochem. J.** **173**, 45-52.

Henriksson, J., Åslund, L., Macina, R.A., Franke de Cazzulo, B.M., Cazzulo, J.J., Frasch, A.C.C. and Pettersson, U. (1990). Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **42**, 213-224.

Henriksson, J., Porcel, B., Ridåker, M., Ruiz, A., Sabaj, V., Galanti, N., Cazzulo, J.J., Frasch, A.C.C. and Pettersson, U. (1995). Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **73**, 63-74.

Higa, A.I., Franke de Cazzulo, B.M. and Cazzulo, J.J. (1979). Some properties of the NAD-specific glutamate dehydrogenase from *Crithidia fasciculata*. **J. Gen. Microbiol.** **113**, 429-432.

Hoare, C.Z. (1964). **J. Protozool.** **11**, 206-207.

Holder, A.A., Wootton, J.C., Baron, A.J., Chambers, G.K. and Fincham, J.R. (1975). The amino acid sequence of *Neurospora* NADP-specific glutamate dehydrogenase. Peptic and chymotryptic peptides and the complete sequence. **Biochem. J.** **149**, 757-773.

Hooper, A.B., Hansen, J. and Bell, R. (1967). Characterization of glutamate dehydrogenase from the ammonia-oxidizing chemoautotroph *Nitrosomonas europaea*. **J. Biol. Chem.** **242**, 288-296.

Hooper, A.B., Terry, K.R. and Kemp, K.D. (1974). Glutamate dehydrogenase of Tetrahymena. **Biochim. Biophys Acta** **358**, 14-20.

Huynh, T. V., Young, R.A. and Davis, R.W. (1985). Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. In DNA Cloning, Volume 1 ed. Glover, D. M. IRL Press Limited, Oxford, England pág. 56-110.

Ibáñez, C., Affranchino, J.L. and Frasch, A.C.C. (1987). Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. **Mol. Biochem. Parasitol.** **25**, 175-184.

Itow, S. and Camargo, E.P. (1977). Proteolytic activities in cell extracts of *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.** **24**, 591-595.

Jallon, J.M., DiFranco, A. and Iwatsubo, M. (1970). Étude cinétique de changements conformationnels de la L-glutamate déshydrogénase provoqués par le couple effecteur GTP+NADH. **Eur. J. Biochem.** **13**, 428-437.

Jallon, J.M. and Iwatsubo, M. (1971). Evidence for two nicotinamide binding sites on L-glutamate dehydrogenase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **45**, 964-971.

Jeronimo, S.M.B. and Pearson, R.D. (1992). In Subcellular Biochemistry, volume 18, Intracellular Parasites. Cap 1, "The Leishmania. Protozoans adapted for extracellular and intracellular survival" pág 1-37. Plenum Press, New York and London. Edited by Avila, J.L. and Harris, J.R.

Joe, A., Yamamoto, A. and McBride, B.C. (1993). Characterization of recombinant and native forms of a cell surface antigen of *Porphyromonas (bacteroides) gingivalis*. **Infect. Immun.** **61**, 3294-3303.

Juan, S.M., Cazzulo J.J. and Segura, E.L. (1976). The pyruvate kinase from *Trypanosoma cruzi*. **Acta Physiol. Latinoam.** **26**, 424-426.

Juan, S.M., Segura, E.L. and Cazzulo J.J. (1978). Purification and some properties of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Biochem.** **9**, 395-400.

Juan, S.M. (1979). Glutamato dehidrogenasa NADP dependiente de *Trypanosoma cruzi*. Purificación y propiedades. **Tesis Doctoral**, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Juan, S.M., Cazzulo J.J. and Segura, E.L. (1979a). Inhibition of the glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* by sulfhydryl reagents. **Comp. Biochem. Physiol.** **63B**, 531-535.

Juan, S.M., Segura, E.L. and Cazzulo J.J. (1979b). Inhibition of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* by silver nitrate. **Experientia** **35**, 1139-1140.

Julliard, J.H. and Smith, E.L. (1979). Partial amino acid sequence of the glutamate dehydrogenase of human liver and a revision of the sequence of the bovine enzyme. **J. Biol. Chem.** **254**, 3427-3438.

Kane, J.F., Wakim, J. and Fischer, R.S. (1981). Regulation of glutamate dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** **148**, 1002-1005.

Kew, O.M. and Woolfolk, C.A. (1970). Preparation of glutamate dehydrogenase from *Micrococcus aerogenes*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **39**, 1126-1133.

Kimura, K., Miyakawa, A. and Imai, T. (1977). Glutamate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* PCI 219. **J. Biochem.** **81**, 467-476.

King, J. and Wu, W.Y.F. (1971). Partial purification and kinetic properties of glutamic dehydrogenase from Soybean cotyledons. **Phytochemistry** **10**, 915-928.

Kinnard, J.H. and Fincham, R.S. (1983). The complete nucleotide sequence of the *Neurospora crassa am* (NADP-specific glutamate dehydrogenase) gene. **Gene** **26**, 253-260.

Kort, R., Liebl, W., Labedan, B., Forterre, P., Eggen, R.I.L. and de Vos, W.M. (1997). Glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermatoga maritima*: molecular characterization and phylogenetic implications. **Extremophiles** **1**, 52-60.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**, 680-685.

Laird, P.W. (1989). *Trans* splicing in trypanosomes-archaism or adaptation? **TIG** **5**, 204-208.

Lake, J.A., de la Cruz, V.F., Ferreira, P.C.G., Morel, C., Simpson, L. (1988). Evolution of parasitism: Kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. **85**, 4779-4783.

Landweber, L.F. and Gilbert, W. (1994). Phylogenetic analysis of RNA editing: a primitive genetic phenomenon. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **91**, 918-921.

LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L. and Beverley, S.M. (1993). Coupling of poly(A) site selection and *trans*-splicing in *Leishmania*. **Genes & Development** **7**, 996-1007.

LeJohn, H.B., Cameron, L.E., Yang, B. and Rennie, S.L. (1994). Molecular characterization of an NAD-specific glutamate dehydrogenase gene inducible by L-glutamine. Antisense gene pair arrangement with L-glutamine-inducible heat shock 70-like protein gene. **J. Biol. Chem.** **269**, 4523-4531.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Pljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. and Wallace, F.G. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa. **J. Protozool.** **27**, 37-58.

Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. and Andrews, N. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **J. Exp. Med.** **171**, 401-403.

Lilley, K.S., Baker, P.J., Britton, K.L., Stillman, T.J., Brown, P.E., Moir, A.G., Engel, P.C., Rice, D.W., Bell, J.E. and Bell, E. (1991). The partial amino acid sequence of the NAD(+)-dependent glutamate dehydrogenase of *Clostridium symbiosus*: implications for the evolution and structural basis of coenzyme specificity. **Biochim. Biophys. Acta.** **1080**, 191-197.

Lilley, K.S. and Engel, P.C. (1992). The essential active-site lysines of clostridial glutamate dehydrogenase. A study with pyridoxal-5'-phosphate. **Eur. J. Biochem.** **207**, 533-540.

Lorillou, S.S. and Martin, F.F. **Unpublished. SWISS-PROT: locus DHE4-LACBI, accession P54388.**

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**, 265-275.

Lyerly, D.M., Barroso, L.A. and Wilkins, T.D. (1991). Identification of the latex test-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase. **J. Clin. Microbiol.** **29**, 2639-2642.

Mansilla, R., Náquira, C. and Lanás, C. (1967). Protein biosynthesis in Trypanosomatidae. II. The metabolic fate of DL-leucine-1-¹⁴C in *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.** **21**, 154-159.

Maras, B., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., De Rosa, M., Bossa, F., Scandurra, R. and Barra, D. (1992). The protein sequence of glutamate dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*, a thermoacidophilic archaeobacterium. Is the presence of N-epsilon-methyllysine related to thermostability?. **Eur. J. Biochem.** **203**, 81-87.

Martínez, J., Campetella, O., Frasch, A.C.C. and Cazzulo, J.J. (1991). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is antigenic in human infections. **Infection and Immunity** **59**, 4275-4277.

Matsudaira, P.T., Ed. (1989). A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing. Academic Press Inc.

Matthews, K.R., Tschudi, C. and Ullu, E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs *trans*-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes & Development.** **8**, 491-501.

Maurizi, M. R., Trisler, P. and Gottesman, S. (1985). Insertional mutagenesis of the lon gene in *Escherichia coli*: lon is dispensable. **J. Bacteriol.** **164**, 1124-1135.

Mavrothalassitis, G., Tzimagiorgis, G., Mitsialis, A., Zannis, V., Plaitakis, A., Papamatheakis, J. and Moschonas, N. (1988). Isolation and characterization of cDNA clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: Evidence for a small gene family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **85**, 3494-3498.

McCarthy-Burke, C., Taylor, Z.A. and Busch, G.A. (1989). Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. **Gene** **82**, 177-189.

McDaniel, H.G. (1995). Comparison of the primary structure of nuclear and mitochondrial glutamate dehydrogenase from bovine liver. **Arch. Biochem. Biophys.** **319**, 316-321.

McGadey, R. (1970). A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. **Histochemie** **23**, 180-184.

McPherson, M.J. and Wootton, J.C. (1983). Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *gdhA* gene. **Nucl. Acid. Res.** **11**, 5257-5266.

Meers, J.L. and Pedersen, L. (1972). Nitrogen assimilation by *Bacillus licheniformis* organisms growing in chemostat cultures. **J. Gen. Microbiol.** **70**, 277-286.

Meredith, M.J., Gronostajski, R.M. and Schmidt, R.R. (1978). Physical and kinetic properties of the nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamate dehydrogenase purified from *Chlorella sorokiniana*. **Plant. Physiol.** **61**, 967-974.

Michaelidis, T.M., Tzimagiorgis, G., Moschonas, N.K. and Papamatheakis, J. (1993). The human glutamate dehydrogenase gene family: gene organization and structural characterization. **Genomics** **16**, 150-160.

Miller, E.S. and Brenchley, J.E. (1984). Cloning and characterization of *gdhA*, the structural gene for glutamate dehydrogenase of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** **157**, 171-178.

Molyneux, D.H. (1993). Vectors. In Modern parasitology. A Textbook of Parasitology. Blackwell Scientific Publications. Oxford. (Cox, F.E.G. ed). Capitulo 3, 53-74.

Montemartini, M., Santome, J.J., Cazzulo, J.J. and Nowicki, C. (1993). Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.** **292**, 901-906.

Montemartini, M., Santome, J.J., Cazzulo, J.J. and Nowicki, C. (1994). Purification and partial structural and kinetic characterization of an aromatic L-alpha-hydroxy acid dehydrogenase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **68**, 15-23.

Moon, K. and Smith, E.L. (1973). Sequence of bovine liver glutamate dehydrogenase. Peptides produced by specific chemical cleavages; the complete sequence of the protein. **J. Biol. Chem.** **248**, 3082-3088.

Moon, K., Piszkievicz, D. and Smith, E.L. (1973). Amino acid sequence of chicken liver glutamate dehydrogenase. **J. Biol. Chem.** **248**, 3093-3107.

Moye, W.S., Amuro, N., Mohana Rao, J.K. and Zalkin, H. (1985). Nucleotide sequence of yeast *GDH1* encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. **J. Biol. Chem.** **260**, 8502-8508.

Nagasu, T. and Hall, B.D. (1985). Nucleotide sequence of the GDH gene coding for the NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene** **37**, 247-253.

Nakatani, Y., Banner, C., von Herrath, M., Schneider, M.E., Smith, H.H. and Freese, E. (1987). Comparison of human brain and liver glutamate dehydrogenase cDNAs. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **149**, 405-410.

Nowicki, C., Montemartini, M., Duschak, V., Santome, J.J. and Cazzulo, J.J. (1992). Presence and subcellular localization of tyrosine aminotransferase and p-hydroxyphenyllactate dehydrogenase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol Lett.** **71**, 119-124.

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Morris, R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.** **105**, 361-363.

O'Daly, J.A., Serrano, L.E. and Rodríguez, M.B. (1983). Free amino acid pool and proteolytic enzymes in *Trypanosoma cruzi* cultured *in vitro*. **Int. J. Parasitol.** **13**, 433-440.

Ohlsson, I., Nordström, B., and Brändén, C.I. (1974). Structural and Functional Similarities within the Coenzyme Binding Domains of Dehydrogenases. **J. Mol. Biol.** **89**, 339-354.

Opperdoes, F.R., Borst, P. (1977). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. **FEBS Lett.** **80**, 360-364.

Opperdoes, F.R., Baudhuin, P., Coppens, I., De Roe, C., Edwards, S.W. (1984). Purification, morphometric analysis and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate. **J. Cell. Biol.** **98**, 1178-1184.

Opperdoes, F.R. (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism in Trypanosomes. **Annu. Rev. Microbiol.** **41**, 127-151.

Opperdoes, F.R. (1988). Glycosomes may provide clues to the import of peroxisomal proteins. **TIBS** **13**, 255-260.

Orellano, E.G., Vallejos, R.H. and Cazzulo, J.J. (1985). Chemical modification of the active site of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** **80B**, 563-568.

Ortega-Barria, E. and Pereira, M.E.A. (1992). Entry of *Trypanosoma cruzi* into eukaryotic cells. **Infect. Ags. Dis.** **1**, 136-145.

Overath, P., Chaudhri, M., Steverding, D. and Ziegelbauer, K. (1994). Invariant surface proteins in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. **Parasitol. Today** **10**, 53-58.

Pahlich, E. and Joy, K.N. (1971). Glutamate dehydrogenase from pea roots: purification and properties of the enzyme. **Can.J. Biochem.** **49**, 127-138.

Pamula, F., Wheldrake, J.F. (1991). Purification and properties of the NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Dictyostelium discoideum*. **Mol. Cell. Biochem.** **105**, 85-92.

Pamula, F. and Wheldrake, J.F. (1991). The NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Dictyostelium discoideum*: purification and properties. **Arch. Biochem. Biophys.** **291**, 225-230.

Papadopoulou, D. and Louis, C. (1990). The glutamate dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*: structural and functional analysis. **EMBL: locus DMGDHLONG, accession Y11314. Biochem. Genet.** **28**, 337-346.

Parsons, M., Stuart, K. and Smiley, B. (1991). *Trypanosoma brucei*: analysis of codon usage and nucleotide composition of nuclear genes. **Exp. Parasitol.** **73**, 101-105.

Preiss, T., Sang, A.E., Chzanowska-Lightowlers, Z.M.A. and Lightowlers, R. (1995). The mRNA-binding protein COLBP is glutamate dehydrogenase. **FEBS Lett.** **367**, 291-296.

Purnell, M., Stewart, G.R. and Botella, J.R. Cloning of a GDH cDNA in tomato. **Unpublished. GENBANK: locus SLU48695, accession U48695.**

Renlund, S., Klintrot, I.M., Nunn, M., Schrimsher, J.L., Wernstedt, C. and Hellman, U. (1990). Peptide mapping on HIV polypeptides expressed in *Escherichia coli*. Quality control of different batches and identification of tryptic fragments containing residues of aromatic amino acids or cysteine. **J. Chromatog.** **512**, 325-335.

Restivo, F., Ficarelli, A. and Tassi, F. **Unpublished. EMBL: locus NPY08293, accession Y08293.**

Robb, F.T., Park, J.B. and Adams, M.W. (1992). Characterization of an extremely thermostable glutamate dehydrogenase: a key enzyme in the primary metabolism of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. **Biochim. Biophys. Acta.** **1120**, 267-272.

Rodríguez, F., Ramírez, J.L. and Rangel-Aldao, R. (1993). Differential turn-over of β -tubulin during the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Biol. Res.** **26**, 35-40.

Roitman, I. and Gutteridge, W.E. (1978). Synthesis of lipids in *Trypanosoma cruzi*. Abstract N°. A-28, V Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambú, Brazil.

Rosenfeld, S.A., Dendinger, S.M., Murphy, C.H. and Brenchley, J.E. (1982). Genetic characterization of the glutamate dehydrogenase gene (gdhA) of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** **150**, 795-803.

Rossmann, M.G., Moras, D. and Olsen, K.W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. **Nature** **250**, 194-199.

Ruiz-Ruano, A., Villalta, F. and Lima, M.F. (1991). Changes in polypeptide expression following *Trypanosoma cruzi* differentiation from trypomastigotes to amastigotes. **Biochem. Internat.** **25**, 101-108.

Ryan, F.A., Shapiro, T.A., Rauch, C.A., Englund, P.T. (1988). Replication of Kinetoplast DNA in Trypanosomes. **Ann. Rev. Microbiol.** **42**, 339-358.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** **230**, 1350-1354.

Sakakibara, H., Fujii, K. and Sugiyama, T. (1995). Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize glutamate dehydrogenase. **Plant Cell Physiol.** **36**, 789-797.

Sakanari, J.A., Staunton, C.E., Eakin, A.E., Craik, C.S. and McKerrow, J.H. (1989). Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**, 4863-4867.

Sambrook, J., Fritsch, E.T. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Springs Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, USA.

Sánchez-Pescador, R., Sanvicente, E., Valle, F. and Bolivar, F. (1982). Recombinant plasmids carrying the glutamate dehydrogenase structural gene from *Escherichia coli* K-12. **Gene** **17**, 1-8.

Sanger, F. and Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J. Mol. Biol.** **94**, 441-448.

Sanwal, B.D. and Lata, M. (1962). Effect of glutamic acid on the formation of two glutamic acid dehydrogenases of *Neurospora*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **6**, 404-409.

Sayers, J.R., Price, H.P., Fallon, P.G. and Doenhoff, M.J. (1995). AGA/AGG Codon usage in parasites: implications for gene expression in *Escherichia coli*. **Parasitol. Today** **11**, 345-346.

Schaap, P.J., Muller, Y., Baars, J.J., Op den Camp, H.J., Sonnenberg, A.S., van Griensven, L.J. and Visser, J. (1996). Nucleotide sequence and expression of the gene encoding NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase (gdhA) from *Agaricus bisporus*. **Mol. Gen. Genet.** **250**, 339-347.

Schenkman, S., Andrews, N.W., Nussenzweig, V. and Robbins, E. (1988). *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. **Cell** **55**, 157-165.

Schenkman, S., Robbins, E. and Nussenzweig, V. (1991a). Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells required parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. **Infect. Immun.** **59**, 645-654.

Schenkman, S., Jiang, M., Hart, G.W. and Nussenzweig, V. (1991b). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell** **65**, 1117-1125.

Schenkman, S. and Eichinger, D. (1993). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. **Parasitol. Today** **9**, 218-222.

Scrutton, N.S., Berry, A., Perham, R.N. (1990). Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. **Nature** **343**, 38-43.

Shatilov, V.R. and Kretoich, W.L. (1977). Glutamate dehydrogenases from *Chlorella*: forms, regulation and properties. **Mol. Cell. Biochem.** **15**, 201-212.

Siebert, P.D. and Chenchik, A. (1993). Modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction method which greatly reduces DNA contamination. **Nucl. Acids. Res.** **21**, 2019-2020.

Simpson, L. and Thiemann, O. (1995). Sense from nonsense: RNA editing in mitochondria of kinetoplastid protozoa and slime molds. **Cell** **81**, 837-840.

Sleigh, M.A. (1989). In *Protozoa and other protists*. London, Edward Arnold ed.

Smith, E.L., Austen, B.M., Blumenthal, K.M. and Nyc, J.F. (1975). *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) Vol. 11, pág 293-367. Academic Press, New York and London.

Snedecor, B., Chu, H. and Chen, E. (1991). Selection, expression, and nucleotide sequence of the glutamate dehydrogenase gene of *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. **J. Bacteriol.** **173**, 6162-6167.

Souto-Pradrón, T., Campetella, O., Cazzulo, J.J. and de Souza, W. (1990). Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **J. Cell. Sci.** **96**, 485-490.

Storey, K.B., Fields, J.H.A. and Hochachka, P.W. (1978a). Purification and properties of glutamate dehydrogenase from the mantle muscle of the squid, *Loligo pealeii*. Role of the enzyme in energy production from amino acids. **J. Exp. Zool.** **205**, 111-118.

Storey, K.B., Guderley, H.E., Guppy, M. and Hochachka, P.W. (1978b). **Can. J. Zool.** **56**, 845.

Strambini, G.B., Cioni, P. and Puntoni, A. (1989). Relationship between the conformation of glutamate dehydrogenase, the state of association of its subunit, and catalytic function. **Biochemistry** **28**, 3808-3814.

Stuart, K. (1991). RNA editing in mitochondrial mRNA of trypanosomatids. **TIBS** **16**, 68-72.

Sylvester, D. and Krasser, S.M. (1976). Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comp. Biochem. Physiol.** **55B**, 443-447.

Syntichaki, K.M., Loulakis, K.A. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (1996). The amino-acid sequence similarity of plant glutamate dehydrogenase to the extremophilic archaeal enzyme conforms to its stress-related function. **Gene** **168**, 87-92.

Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosomes-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell** **37**, 67-75.

Tang, M.Q., Ando, S., Yamada, S. and Hayashi, S. (1992). The trypsin-catalyzed activation of glutamate dehydrogenase purified from liver. **J. Biochem.** **111**, 655-661.

Tardieux, L., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J and Andrews, N.W. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell** **71**, 1117-1130.

Teller, J.K., Smith, R.J., McPherson, M.J., Engel, P. and Guest, J.R. (1992). The glutamate dehydrogenase gene of *Clostridium symbiosus*. **Eur. J. Biochem.** **206**, 151-159.

Tempest, D.W., Meers, J.L. and Brown, C.M. (1970). Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. **Biochem. J.** **117**, 405-407.

Thiemann, O.H., Maslov, D.A. and Simpson, L. (1994). Disruption of RNA editing in *Leishmania tarentolae* by the loss of minicircle-encoded guide RNA genes. **EMBO J.** **13**, 5689-5700.

Tomas, A.M. and Kelly, J.M. (1996). Stage regulated expression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is independent of the level of RNA. **Mol. Biochem. Parasitol.** **76**, 91-103.

Thusius, D. (1975). Mechanism of bovine liver glutamate dehydrogenase self-association. **J. Mol. Biol.** **92**, 413-432.

Turrens, J.F. (1989). The role of succinate in the respiratory chain of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes. **Biochem. J.** **259**, 363-368.

Tzimagiorgis, G. and Moschonas, N.K. (1991). Molecular cloning, structure and expression analysis of a full-length mouse brain glutamate dehydrogenase cDNA. **Biochim. Biophys. Acta** **1089**, 250-253.

Urbina, J.A. and Azavache, V. (1984). Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes. II. NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase. **Mol. Biochem. Parasitol.** **11**, 241-255.

Urbina, J.A. (1987). The phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes: molecular, kinetic, and regulatory properties. **Arch. Biochem. Biophys.** **258**, 186-195.

Urbina, J.A., Osorno, C.E., and Rojas, A. (1990). Inhibition of phosphoenol pyruvate carboxykinase from *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes by 3-mercaptopicolinic acid: in vitro and in vivo studies. **Arch. Biochem. Biophys.** **282**, 91-99.

Valle, F., Sanvicente, E., Seeburg, P., Covarrubias, A., Rodriguez, R.L. and Bolivar, F. (1983). Nucleotide sequence of the promoter and amino-terminal coding region of the glutamate dehydrogenase structural gene of *Escherichia coli*. **Gene** **23**, 199-209.

Van der Ploeg, L.H.T., Schwartz, D.C., Cantor, C.R. and Borst, P. (1984). Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analyzed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. **Cell** **37**, 77-84.

Vassella, E., Braun, R. and Roditi, I. (1994). Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? **Nucleic. Acids. Res.** **22**, 1359-1364.

Venard, R., Jallon, J.M., Fourcade, A. and Iwatsubo, M. (1975). Binding studies of NADPH to NADP-specific L-glutamate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.** **57**, 371-378.

Veronese, F.M., Boccu, E. and Coventi, L. (1975). Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli* : induction, purification and properties of the enzyme. **Biochim. Biophys. Acta** **377**, 217-228.

Veronese, F.M., Bevilacqua, R., Boccu, E. and Brown, D.M. (1976). Purification, characteristics and sequence of a peptide containing an essential lysine residue. **Biochim. Biophys. Acta** **445**, 1-13.

von Brand, T. (1979). "Biochemistry and Physiology of Endoparasites". Elsevier/North Holland, Amsterdam.

Walter, R.D., Nordmeyer, J.P. and Konigk, E. (1974). NADP-specific glutamate dehydrogenase from *Plasmodium chabaudi*. Hoppe-Seyler's. **Z. Physiol. Chem.** **355**, 495-500.

Walter, R.D. and Ebert, F. (1979). Evidence for NADH-and NADPH-linked glutamate dehydrogenases in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **J. Protozool.** **26**, 653-656.

Webster, P. and Russell, D.G. (1993). The flagellar pocket of Trypanosomatids. **Parasitol. Today** **9**, 201-206.

Wootton, J.C. (1974). The coenzyme-binding domains of glutamate dehydrogenases. **Nature** **252**, 542-546.

Yarrison, G., Young, D.W. and Choules, G.L. (1972). Glutamate dehydrogenase from *Mycoplasma laidlawii*. **J. Bacteriol.** **110**, 494-503.

Yee, J., and Dennis, P.P. (1992). Isolation and characterization of a NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from the primitive eucaryote *Giardia lamblia*. **J. Biol. Chem.** **267**, 7539-7544.

Yeung, A.T., Bascomb, N.F., Turner, K.J. and Schmidt, R.R. (1981). Regulation of accumulation of ammonium-inducible glutamate dehydrogenase catalytic activity and antigen during the cell cycle of fully induced, synchronous *Chlorella sorokiniana* cells. **J Bacteriol** **146**, 571-577.

Yoshida, N. and Camargo, E.P. (1978). Ureotelism and ammonotelism in Trypanosomatids. **J. Bacteriol.** **136**, 1184-1186.

Zelada, C., Montemartini, M., Cazzulo, J.J. and Nowicki, C. (1996). Purification and partial structural and kinetic characterization of an alanine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **79**, 225-228.

Zeledón, R. (1960). Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. V. Transaminases. **Rev. Brasil. Biol.** **20**, 309-414.

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized 'J' and 'C' with a horizontal line extending to the left.

Dr. Juan José Cazzulo
Director

A handwritten signature in black ink, featuring a stylized 'P' and 'B' with a horizontal line extending to the right.

Lic. Patricia A. Barderi
Tesisista

Esta Tesis de Doctorado fue tipeada y corregida en Microsoft Word 5.1. Las fotografías fueron digitalizadas con un scanner UMAX Vista S-12 y optimizadas con Adobe Photoshop 4. Las figuras se hicieron en Adobe Illustrator 6, MacDraw Pro y Canvas 5. Finalmente todo fue reunido y armado en Adobe PageMaker 6.5.

La mayor parte del trabajo fue hecho en una computadora Power Macintosh 7200/75. La impresión final fue hecha en una impresora Apple LaserWriter 16/600.

La tipografía es ITC-Korinna para el texto y Courier para el monoespaciado.

Esta Tesis de Doctorado se encuentra disponible en formato electrónico (PDF) en la siguiente dirección:

<http://www.iib.unsam.edu.ar/gente/patrib/tesis>

©1998 Patricia A. Barderi

