

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

“ CARACTERIZACION MOLECULAR Y BIOQUIMICA DE UNA NUEVA  
PROTEINA QUINASA DE TRYPANOSOMA CRUZI”

AUTOR: Lic. Verónica Pascuccelli

DIRECTOR: Dr. Armando. J. Parodi

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
“Fundación Campomar”

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

-1997-

3461.

*A mi familia*

*A Sebastián y a Martín*

## AGRADECIMIENTOS

*A mi director de tesis, Dr.Armando.J. Parodi por haberme permitido desarrollar la tesis en su laboratorio, por su dedicación, apoyo y confianza.*

*A la Dra. María Teresa Téllez-Iñon, por su buena predisposición brindándome su experiencia y sugerencias.*

*A los profesores y miembros del Instituto que me brindaron su apoyo y ayuda.*

*A los compañeros que me ayudaron y acompañaron durante todos estos años.*

*A la Comisión Directiva de la Fundación Campomar por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad de Buenos Aires*

## Abreviaturas

AC: adenililciclase

CaM: calmodulina

DAG: diacilglicerol

dNTP: desoxiribonucleótido

DTT: ditiotreitól

EGF: factor de crecimiento epidérmico

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

GF: bisindol maleimida

GPI: glicofosfatidilinositol

H7: inhibidor específico de PKC

IP3: inositol trisfosfato

IPTG: isopropiltiogalactósido

LG: gránulos grandes

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

pb: pares de bases

PCR: reacción de la polimerasa en cadena

PDE: fosfodiesterasa

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PIK3: fosfatidilinositol-3-OH quinasa

PI(4,5)P3: fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato

PK: quinasa de proteínas

PKA: quinasa de proteínas dependiente de cAMP

PKC: quinasa de proteínas tipo C

PKI: Inhibidor de PKA

PKTc: proteína quinasa RAC homóloga de *T. cruzi*

PLC: fosfolipasa C

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoruro

POPOP: 2,2-p-fenilenbis-5-feniloxazol

PPO: 2,5-difeniloxazol

PVDF: polivinildendivinilfluoruro

RAC: quinasa de proteínas relacionada a PKA y PKC

RE: retículo endoplásmico

RNAsa: ribonucleasa

SDS: sodio dodecil sulfato

SG: gránulos pequeños

TLCK: tosil-lisil-clorometilcetona

UFP: unidades formadoras de placa

# INDICE

- Abreviaturas	
- Resumen	
- Introducción	3
1. <i>Tripanosomátidos</i>	3
1.1. Generalidades	3
1.2. Clasificación taxonómica	3
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> . Ciclo de vida	5
2. Fosforilación de proteínas	8
2.1. Quinasas de proteínas	8
2.1.1. Generalidades	8
2.1.2. Clasificación	9
2.1.3. Características de algunas proteínas quinasas	12
a- Quinasas de proteínas dependientes de cAMP (PKA)	12
b- Quinasas dependientes de calcio y fosfolípidos (PKC)	13
3. Mecanismos de transducción de señales	14
3.1. Eucariotes superiores	14
3.2. <i>Tripanosomátidos</i>	16
4. RAC quinasas	20
- Objetivos	26
- Materiales y métodos	28
1. Células y medios de cultivo	28
2. Preparación de DNA genómico de <i>T. cruzi</i>	28
3. Preparación de RNA total de <i>T. cruzi</i>	29
4. Preparación de cDNA	29
5. Procedimientos con DNA	30
6. Reacciones de PCR	30
7. Análisis de la biblioteca genómica	31
7.1. Prehibridización	32
7.2. Hibridización	32
7.3. Lavados	32
8. Expresión de la PKTc recombinante	33
8.1. Construcción del plásmido de expresión	33
8.2. Inducción de la expresión de la PKTc recombinante	33
8.3. Purificación de cuerpos de inclusión	34

8.4. Cromatografía en columna de afinidad.....	34
8.5. Cromatografía en columna de Mono Q.....	35
9. Producción de anticuerpos.....	35
10. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas.....	36
11. Western blot.....	36
12. Determinación de proteínas.....	37
13. Ensayos bioquímicos.....	37
13.1. Medición de actividad quíntasa in vitro.....	37
13.2. Análisis de fosfoaminoácidos.....	38
13.2.1. Hidrólisis ácida.....	38
13.2.2. Determinación de la labilidad de la unión aminoácido- fosfato bajo condiciones alcalinas suaves.....	38
14. Obtención de extracto totales de <i>T. cruzi</i> .....	39
15. Fraccionamiento subcelular.....	39
16. Tratamiento con carbonato de sodio.....	39
17. Partición con Tritón X114 / agua.....	40
18. Tratamiento con hidroxilamina.....	40
- <b>Resultados</b> .....	41
1. <i>Caracterización molecular</i> .....	41
1.1. Clonado y secuenciación del gen <i>pktc</i> de <i>T. cruzi</i> .....	41
1.1.1. PCR con oligonucleótidos degenerados.....	41
1.1.2. Screening de una biblioteca genómica.....	44
1.2. Análisis de la secuencia aminoacídica de PKTc.....	46
1.2.1 Homología con otras proteínas quinasas.....	46
1.3. Análisis por Southern blot.....	52
1.4. Análisis de expresión del gen <i>pktc</i> . Northern Blot.....	54
1.5. Expresión de la PKTc recombinante.....	57
1.5.1. Inducción de la expresión del gen <i>pktc</i> .....	58
1.5.2. Purificación de la PKTc recombinante.....	59
1.5.3 Renaturalización de la PKTc.....	60
1.6. Identificación de la actividad quíntasa.....	62
2. <i>Caracterización bioquímica</i> .....	64
2.1. Especificidad de sustrato.....	64
2.2. Requerimiento de cationes.....	65
2.3. Efecto del pH y la temperatura.....	67
2.4. Efecto de moduladores.....	68

2.5. ATP como dador de fosfatos.....	70
2.6. Estudios cinéticos.....	71
2.7. Análisis de fosfoaminoácidos.....	72
3. <i>Identificación de la PKTc in vivo</i> .....	74
3.1. Inmunolocalización en un extracto crudo de <i>T. cruzi</i> .....	74
3.2. Localización subcelular.....	75
4. <i>Caracterización del tipo de anclaje a membrana</i> .....	76
4.1. La Pktc no está asociada a una proteína de membrana.....	76
4.2. PKTc está unida a través de un ancla lipídica a la membrana.....	78
5. <i>Análisis de la expresión diferencial de la PKTc en los distintos     estadios del ciclo de vida del parásito</i> .....	80
- <b>Discusión</b> .....	81
- <b>Bibliografía</b> .....	86



## RESUMEN

En los organismos eucariotas, la regulación de las complejas interacciones requeridas para la diferenciación y proliferación, está mediada en parte por los sistemas de fosforilación de proteínas. En *Trypanosoma cruzi*, se han podido caracterizar varias vías de transducción de señales a partir de la identificación y caracterización de sus distintos componentes como proteínas quinasas (PKA, PKC, Cam quinasa, CDK), adenililciclasa (AC) y proteína G, entre otros. Dentro de la familia de las serina/treonina quinasas, recientemente ha sido identificada una nueva subfamilia de quinasas llamadas RAC o PKB, cuya principal característica radica en la similitud de identidad que existe a nivel de su secuencia aminoacídica con PKA y PKC por igual. Estas proteínas han sido identificadas en células de mamíferos, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Dyctiostelium discoideum* y *Entamoeba histolytica* pero no han sido aún detectadas en ningún tripanosomátido. Por lo tanto, nos hemos propuesto clonar el o los genes que codifican para esta nueva proteína quinasa en *T. cruzi*, para su posterior caracterización molecular y bioquímica y si es posible dilucidar su probable rol *in vivo*. Como resultado, hemos clonado el gen que codifica para una proteína quinasa RAC homóloga (PKTc), cuyo tamaño es de 1287 pb y codifica para una proteína de 428 aminoácidos. Esta proteína mostró tener entre un 60 y un 70% de homología con otras RAC quinasas. La PKTc recombinante es capaz de fosforilar a la histona H4S, y de autofosforilarse, fosforilando específicamente residuos de treonina en ambos casos. Utiliza ATP como dador de fosfatos, requiere exclusivamente  $Mn^{2+}$  para su actividad, su valor de pH óptimo es entre 6-8 y su temperatura óptima es de 37 °C. El Km aparente para el ATP resultó ser de 1.6  $\mu M$ . La presencia de diferentes activadores ( $Ca^{2+}$ /Cam) o inhibidores (PKI, H7, GF, staurosporina) no mostró tener un efecto significativo sobre su actividad. Experimentos de inmunolocalización utilizando anticuerpos contra la proteína recombinante, demostraron que la enzima se encuentra anclada en la membrana posiblemente, a través de ácido palmítico. Por otro lado, a través de experimentos de Western blot pudimos establecer que la PKTc está presente en los estadios de amastigote, epimastigote y tripomastigote metacíclico sin mostrar un patrón de expresión diferencial, que demuestra que esta proteína sería de carácter constitutivo. Experimentos de inmunoprecipitación nos permitirán en el futuro, identificar otras proteínas que interactúan con PKTc *in vivo* y dilucidar así la vía de transducción de señales en la que PKTc estaría involucrada.

## SUMMARY

### “MOLECULAR AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A NEW PROTEIN KINASE IN *TRYPANOSOMA CRUZI*”

In eucariotes, the regulation of the complex interactions required for differentiation and proliferation, is partially control by protein phosphorylation. The characteristics of several signal transduction pathways have been described in *Trypanosoma cruzi* from the identification and characterization of several components such as protein kinases (PKA, PKC, Cam kinase, CDK),adenylyl cyclase (AC), protein G.

Recently, a new subfamily of serine/threonine kinases have been identified, called RAC or PKB, which are closely related to PKC and PKA families at their aminoacidic sequences. This proteins have been identified in mammals cells, *Drosophila melanogaster*, *Caenorahbditis elegans*, *Dyctiostelium discoideum* and *Entamoeba histolytica* but they haven't been detected yet in trypanosomatids. So, our objective was the cloning of the gene/s that codifies for these new protein kinase in *T. cruzi*, its later characterization at the molecular and biochemical level and if it's possible, elucidate its function *in vivo*. As results, we cloned the gene that codifies for a protein kinase RAC homolog (named PKTc), with an open reading frame of 1287 pb that corresponds to a protein of 428 aminoacids long. This protein shares 60-70% homology with other RAC proteins. The recombinant PKTc can phosphorylate histone IIAS and itself, in both cases, exclusively in threonine residues. Uses ATP as phosphate doncr, requires  $Mn^{2+}$  exclusively for its activity, the optime pH is neutral (6-8) and the optime temperature is 37°C. The apparent Km for the ATP is 1.6  $\mu M$ . The presence of different activators ( $Ca^{2+}$ /Cam) or inhibitors (GF, H7, staurosporine, PKI) did not affect the kinase activity significatly. Experiments of immunolocalization using antibodies against the recombinant enzyme showed that PKTc is anchored to a membrane probably by a palmitic acid. Western blots experiments were done in order to investigate the differential expression of PKTc during the different stages of the life cycle of *T. cruzi*. The results demonstrated that this enzyme is present in the 3 stages (amastigote, epimastigote, metacyclic trypomastigote), without a differential expression pattern, so we supposed that it's a constitutive protein. In the future, immunoprecipitation experiments will allow us to identified other proteins that could interacted with PKTc *in vivo* and elucidate the signal transduction pathway in which this enzyme is involved.

## *INTRODUCCION*

# 1-Tripanosomátidos

## 1.1 Generalidades

Los tripanosomátidos son protozoarios parásitos flagelados que comparten entre sí un conjunto de rasgos a nivel molecular y celular que los caracterizan. Estos son :

- Un DNA mitocondrial incompleto que luego de su transcripción es editado para ser funcional
- un genoma carente de intrones
- RNA's policistrónicos que se convierten en monocistrónicos antes de la traducción
- un miniexón que ocupa el extremo 5' de todos los RNA mensajeros
- promotores y factores de transcripción aún desconocidos

Entre los rasgos salientes a nivel celular:

- existencia de glicosomas
- membrana plasmática con moléculas que cumplen función en la interacción con el huésped
- existencia de un bolsillo flagelar
- una mitocondria única
- la existencia del kinetoplasto, estructura subcelular en la base del flagelo, conectada a la mitocondria, que contiene cantidades de DNA superiores a los contenidos en la mitocondria
- anclas de GPI en las proteínas unidas a membrana

## 1.2 Clasificación taxonómica

La ubicación sistemática de *Trypanosoma cruzi* es la que se muestra en el siguiente cuadro (figura 1):

Reino Protista

Subtipo Sarcomastigophora

Superclase Mastigophora

Clase Zoomastigophora

Orden Kinetoplastida

Suborden Trypanosomatina

Familia Trypanosomatidae

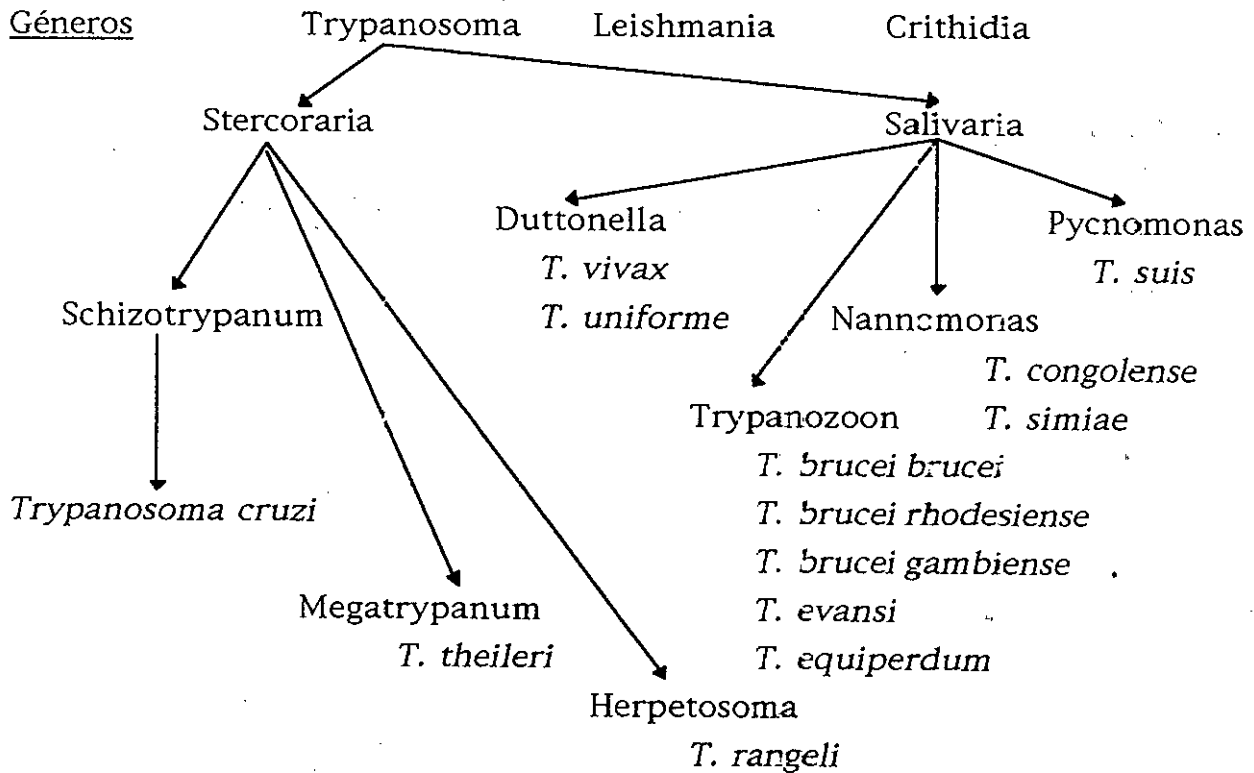


Figura 1- Clasificación taxonómica

Los tripanosomátidos pueden tener ciclos de vida monogenéticos (únicamente dentro del huésped invertebrado) o digenéticos, es decir, alternan su ciclo de vida entre dos huéspedes: un insecto vector y un vertebrado o planta huésped.

A lo largo del ciclo de vida sufren cambios morfológicos característicos, proceso denominado morfociclologénesis.

El género *Trypanosoma* en particular, se divide en dos secciones: *Salivaria* y *Stercoraria*. En la primera están comprendidos tripanosomátidos patógenos que se multiplican en el estadio tripomastigote en el mamífero, completan el desarrollo en la parte anterior del vector invertebrado y son transmitidos por inoculación. En la segunda se agrupan especies no patógenas (con excepción de *T. cruzi*). Se multiplican en el mamífero como amastigotes y como epimastigotes en el vector invertebrado, completan su desarrollo en la parte posterior del vector a tripomastigotes y son transmitidos por contaminación.

### 1.3 *T. cruzi*

Es un tripanosomátido flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida, género *Trypanosoma* y constituye el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es una de las parasitosis endémicas más importantes de América del Sur y Central.

Asimismo, es infectivo para 100-150 especies de mamíferos salvajes y domésticos, por ejemplo: ratas, perros, murciélagos, comadrejas y varios primates, quienes pueden transmitirlos a más de 80 especies de triatomínidos.

#### Ciclo de vida

*T. cruzi* sufre a lo largo de su ciclo de vida digenético, cambios morfológicos complejos en el insecto vector y en el huésped vertebrado (Brenner 1973).

El huésped vertebrado está constituido en general, por un número variado de células de mamífero.

El insecto vector más común en nuestro país es el hematófago *Triatoma infestans* (vinchuca). Este vector se infecta al ingerir tripanosomas presentes en la sangre periférica del huésped vertebrado.

A diferencia de otros protozoarios parásitos, *T. cruzi* no es inoculado directamente en la circulación del huésped mamífero, sino que al picar la

vinchuca, ésta ingiere la sangre y defeca las heces conteniendo el parásito, inmediatamente luego de la alimentación, cerca del sitio de la picadura. *T. cruzi* posee 4 estadios a lo largo de su ciclo de vida

Los tripanosomas ingeridos por la vinchuca a partir de sangre de un animal infectado corresponden a la forma tripomastigote. Estos no pueden dividirse y se caracterizan por tener un flagelo largo que nace en la parte posterior del parásito y que recorre el cuerpo celular formando la membrana ondulante (figura 2)

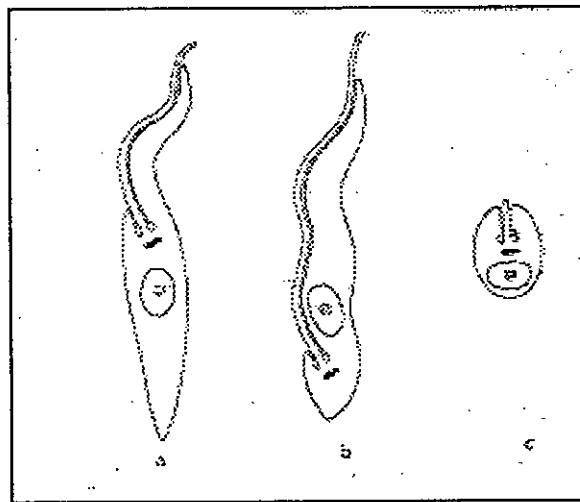


Figura 2 - Formas del ciclo de vida de *T. cruzi* a) epimastigote, b) tripomastigote, c) amastigote

Estos tripomastigotes sanguíneos llegan al intestino de la vinchuca y se diferencian al estadio de epimastigote.

Esta forma se divide activamente en el intestino por fisión binaria y mantiene así un estado permanente de infección en el insecto. No es infeccioso para el huésped mamífero.

En el recto de la vinchuca, los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, que son eliminados con las heces. Estos tripomastigotes son infecciosos y llegan a la sangre del huésped vertebrado a través de la piel o las mucosas.

Luego de la penetración en el huésped vertebrado, los tripomastigotes se diferencian a amastigotes intracelulares, estado en el que permanecen quiescentes durante horas, antes de iniciar la replicación.

Antes de que ocurra la lisis celular, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que se liberan al torrente sanguíneo por ruptura celular y pueden reiniciar el ciclo por infección en una nueva célula o en el insecto vector, por ingestión por una vinchuca reiniciando así el ciclo de vida (figura 3).

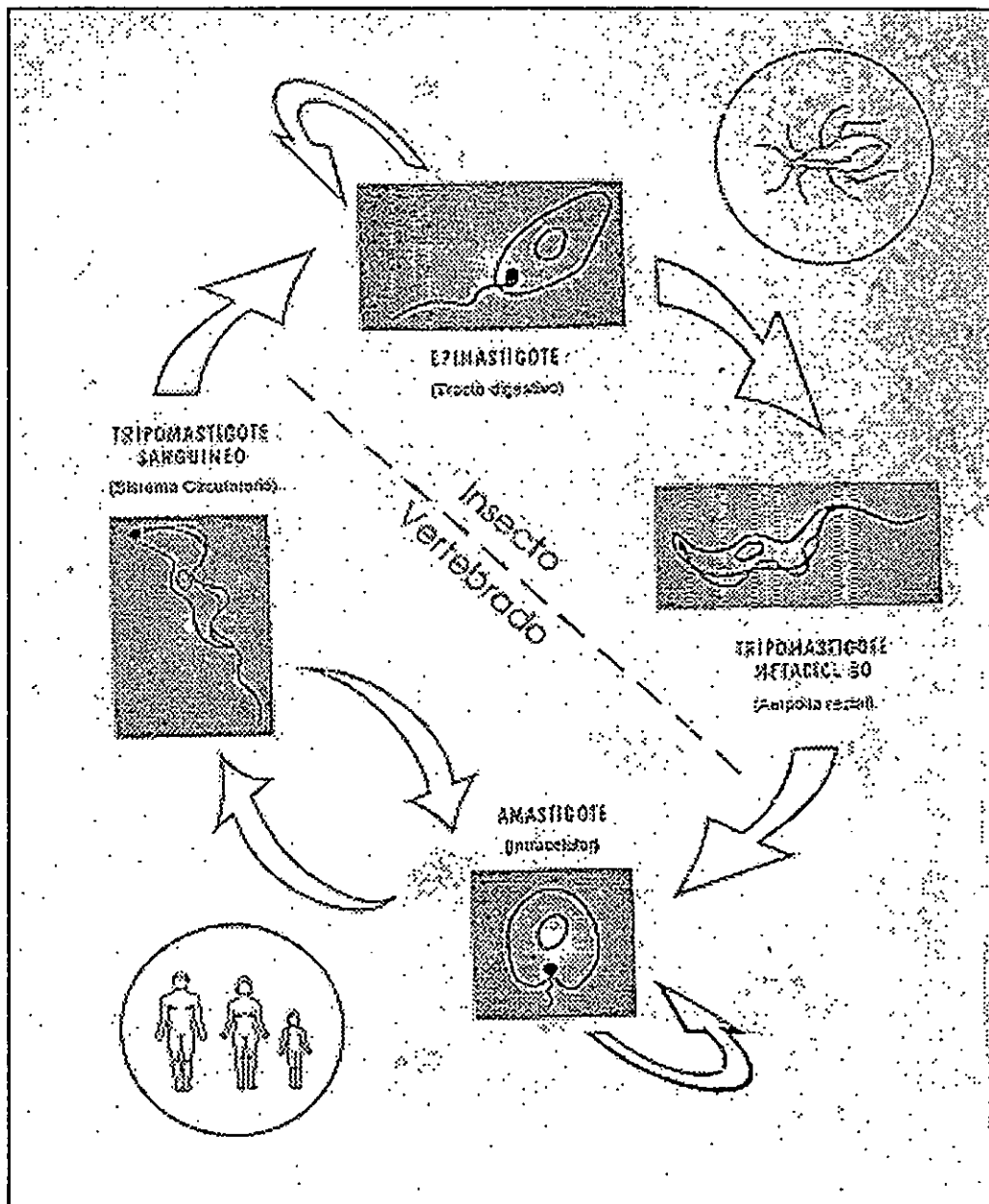


Figura 3 -Ciclo de vida de *T. cruzi*



## 2- Fosforilación de proteínas

### 2.1 Proteínas quinasas

#### 2.1.1 Generalidades

La fosforilación y desfosforilación de proteínas es el proceso postraduccionaI más importante involucrado en la regulación de funciones celulares.

La fosforilación covalente de residuos de Ser, Thr y Tyr en determinadas proteínas es un mecanismo celular común para modular distintos procesos fisiológicos como vías metabólicas, transducción génica, transporte de iones y metabolitos a través de membranas, división celular, diferenciación celular, entre otros.

La actividad de las múltiples proteínas quinasas involucradas es a menudo dependiente de activadores alostéricos regulados por vías de transducción de señales.

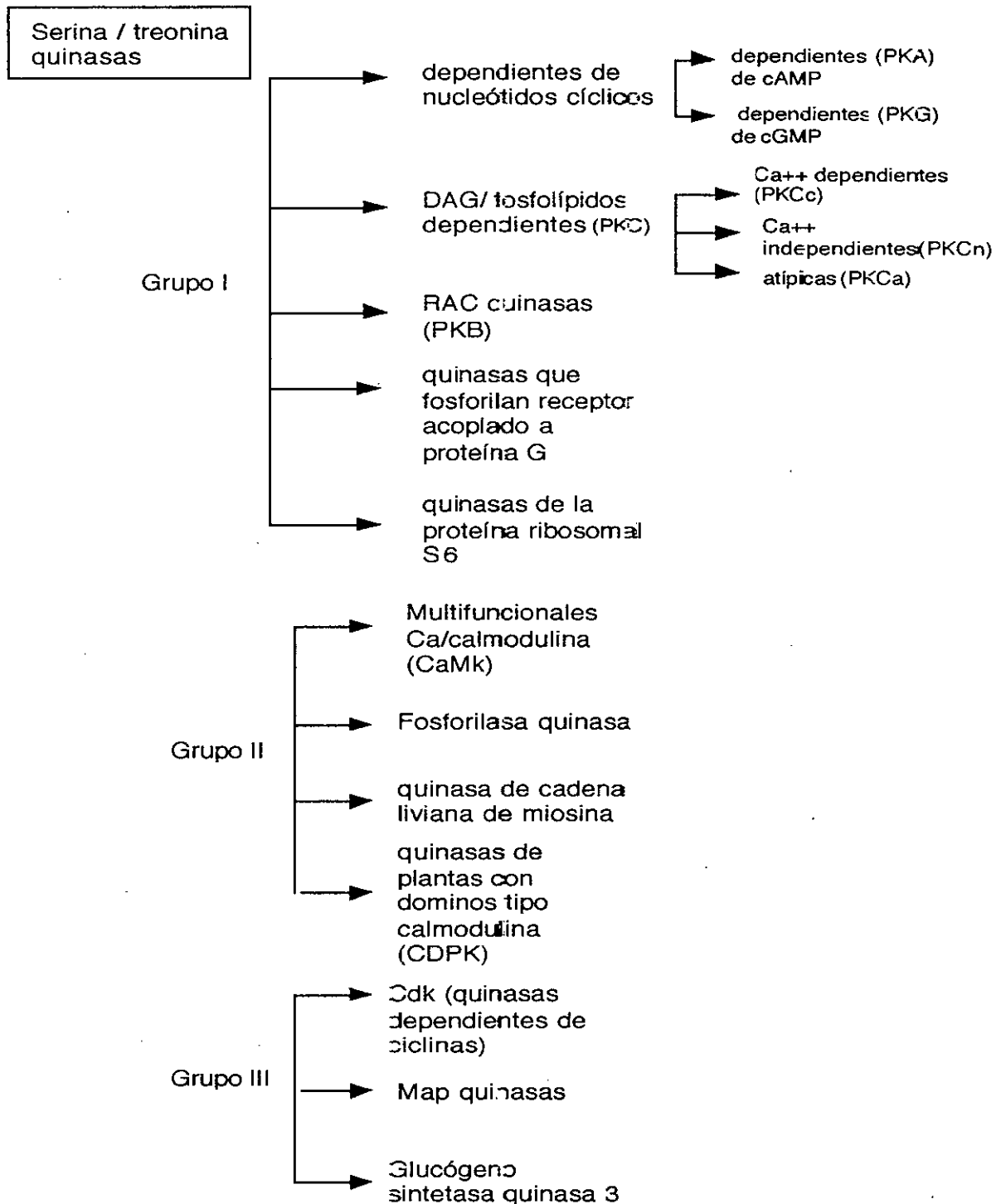
Las proteínas quinasas eucarióticas comprenden una de las mayores superfamilias de proteínas y genes homólogos. Aunque existe una vasta diversidad de estructuras, modos de regulación y especificidades de sustrato entre las diferentes proteínas quinasas, también tienen dominios estructurales comunes. Esto provee claros indicios de como estas enzimas dirigen la transferencia de los grupos fosfatos a las proteínasceptoras.

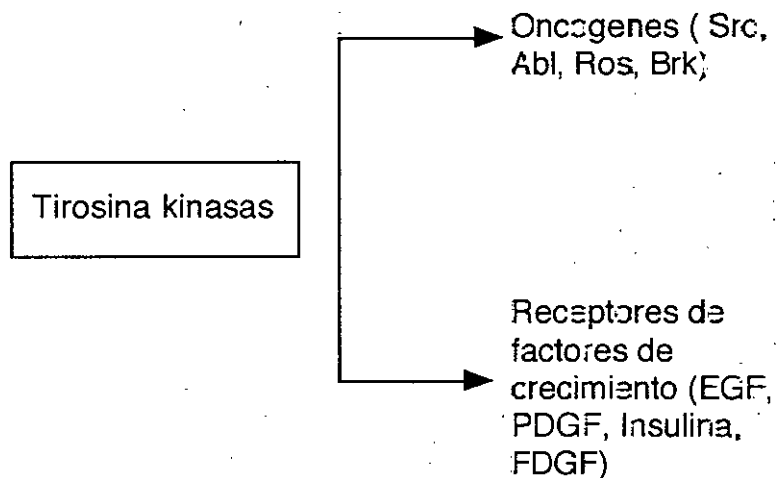
Las proteínas quinasas están relacionadas en virtud de sus dominios catalíticos los cuales consisten en 250-300 aminoácidos y a los cuales se les atribuyen 3 roles separados :

- 1- unión y orientación del ATP o GTP dador de fosfatos formando un complejo con un catión divalente ( $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ).
- 2- reconocimiento y unión del sustrato proteico.
- 3- transferencia de un fosfato a partir de ATP o GTP a un residuo aceptor en la proteína sustrato (Ser , Thr o Tyr).

## 2.1.2 Clasificación

Existen 2 principales subdivisiones dentro de la superfamilia de las proteínas kinasas (Hanks & Hunter, 1995) :





Aunque entre los 2 grandes grupos existen similitudes a nivel de su estructura primaria en la zona de los dominios catalíticos, ciertos fragmentos cortos de aminoácidos parecen caracterizar a cada clase (Hanks, 1987).

Los dominios catalíticos en todas las proteínas quinasas se dividen en 11 subdominios, los cuales contienen patrones característicos conservados. Estos son :

*Subdominio I:* en el amino terminal del dominio catalítico, se ubica el motivo consenso Gly-X-Gly-X-X-Gly-X-Val, donde la tercer Gly es reemplazada en algunas proteínas quinasas por Ser o Ala.

*Subdominio II:* tiene una Lys invariante que se reconoció como esencial para que la enzima tenga máxima actividad.

*Subdominio III:* posee un residuo de Glu conservado que ayuda a estabilizar las interacciones entre la Lys del dominio II y los fosfatos del ATP.

*Subdominio VIb:* existen en el 2 residuos invariantes (Asp y Asn) que se encuentran en el motivo consenso H-R-L-K-D-X-N.

*Subdominio VII:* contiene el motivo DFG altamente conservado.

*Subdominio VIII*: lleva la secuencia conservada APE, la cual parecería jugar el rol principal en el reconocimiento de los sustratos peptídicos. Muchas proteínas quinasas son activadas por fosforilación de residuos ubicados en el *subdominio VIII*, por ejemplo: las PKA cAMP dependiente requieren la fosforilación de la Thr en posición 197 para tener máxima actividad (Taylor *et al.*, 1988). Esta modificación ocurriría a través de un mecanismo de autofosforilación. Aparentemente, este fosfato unido a la Thr junto a las cadenas laterales de los aminoácidos vecinos, estabilizarían la estructura de este subdominio en una conformación activa para permitir la adecuada orientación del péptido sustrato.

Los *subdominios IX, X y XI* parecerían ser los menos conservados.

Los *subdominios VI y VII* presentan a su vez un interés particular ya que contienen residuos que son específicamente conservados entre las Ser/Thr quinasas y las Tyr quinasas y podrían jugar un rol en el reconocimiento del grupo OH correcto.

El subdominio VI es el más importante indicador de la especificidad del aminoácido. En el caso de las Ser/Thr quinasas, la secuencia consenso típica es DLKPEN mientras que en las Tyr quinasas, los consensos necesarios para el reconocimiento de la Tyr son DLRAAN o DLAARN.

La otra región conservada se ubica en el subdominio VII cerca del motivo APE. Esta región está altamente conservada entre las Tyr quinasas: F/I-V/K-R/T-M-A-P-E mientras que en las Ser/Thr quinasas la secuencia consenso es G/T-S-X-X-X-Y-F-X-A-P-E.

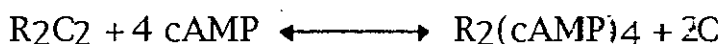
### 2.1.3 Características de algunas proteínas quinasas

#### a- Quinasas de proteínas dependientes de cAMP (PKA)

Las PKA son proteínas que transfieren un grupo fosfato a un aminoácido aceptor en una proteína sustrato. Los requerimientos básicos para el reconocimiento de péptidos son los residuos de arginina de los sustratos fisiológicos, que preceden al sitio de fosforilación, el cual normalmente es una Ser y con menor frecuencia una Thr (Toner-Webb & Taylor, 1987).

Existen dos tipos de PKA con capacidad de unir cAMP: PKA-I y PKA-II. Ambas quinasas son solubles, presentan la misma estructura tetramérica y el mismo mecanismo de acción frente al cAMP. Cada tetrámero está constituido por dos subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas. Las distintas subunidades catalíticas (cPKA) se conservan mientras que los distintos tipos de subunidades regulatorias (rPKA), del tipo I y II difieren entre sí.

La función catalítica de PKA muestra un ordenado mecanismo de unión. Primero, se une al complejo  $[Mg^{2+}-ATP]$ , lo cual le genera un cambio conformacional. Luego, se une al sustrato. Se produce la reacción catalítica y se libera secuencialmente el sustrato fosforilado y el  $[Mg^{2+}-ADP]$ , respondiendo directamente al cAMP, según la siguiente reacción:



Siendo,

$R_2C_2$ : la holoenzima inactiva

$R_2(\text{cAMP})_4$ : la subunidad regulatoria libre unida al cAMP

C: subunidad catalítica libre con actividad de quinasa

Los dominios de cPKA presentan por lo menos tres sitios funcionales:

- Un sitio conservado de unión a  $[Mg^{2+}-ATP]$  constituido por la tríada de Gly (Taylor *et al.*, 1988; Hanks *et al.*, 1988).
- Un sitio de reconocimiento a sustrato, con un consenso para especificidad Ser/Thr, precedido por una Cys 199, involucrada en la unión (Hanks *et al.*, 1988).
- Un sitio catalítico, donde ocurriría la transferencia de un grupo fosfato.

- El dominio cPKA posee dos sitios de autofosforilación muy resistentes a fosfatasas (Shoji *et al.*, 1983).

- Presenta en el dominio amino terminal un grupo N-tetradecanoil (miristilo), que indica una posible unión a membrana, cuya función de contralor de la actividad enzimática no se conoce aún.

En eucariotes superiores se han descrito varias isoformas para cPKA: c- $\alpha$  PKA y c- $\beta$  PKA, dependiendo del tipo de tejido estudiado (Uhler *et al.*, 1986).

#### b- Quinasas dependientes de calcio y fosfolípidos (PKC)

Estas quinasas catalizan específicamente la fosforilación de residuos Ser y Thr y su actividad depende de  $Ca^{2+}$  y fosfolípidos (Stabel y Parker, 1977). Sin embargo, a concentraciones fisiológicas de  $Ca^{2+}$ , la PKC requiere diacilglicerol (DAG) para su activación. Por lo tanto, el DAG ha sido definido como el segundo mensajero responsable de la activación de la PKC *in vivo* (Nishizuka, 1988).

Existe más de una especie de PKC, por lo que se han dividido en tres grupos. El grupo PKCc está compuesto por las cuatro PKC clásicas o convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ ); el grupo PKCn está formado por cuatro PKC nuevas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ) y el grupo PKCa está formado por dos PKC atípicas ( $\zeta$  y  $\lambda$ ) (Stabel y Parker, 1991). Todas las PKC están constituidas por una sola cadena polipeptídica. Todas presentan regiones conservadas y variables. Uno de los dominios de la región conservada contiene una región de pseudosustrato y dos tandem de una secuencia rica en Cys.

La región de pseudosustrato contiene una secuencia consenso para la fosforilación pero ningún residuo fosforilable, postulándose que controlaría la actividad catalítica bloqueando el acceso del sustrato al ocupar el sitio catalítico (Stabel & Parker, 1991). El sitio de pseudosustrato está seguido por estructuras de dedos de  $Zn^{2+}$  cuya secuencia es del tipo "Cys-Cys".

Los ésteres de forbol activarían a la PKC por dos vías distintas. Una vía de "activación reversible" postula que los ésteres de forbol reducirían los requerimientos de PKC por  $Ca^{2+}$  y fosfatidilserina, causando un cambio conformacional en el dominio regulatorio, induciendo una disociación del pseudosustrato del dominio catalítico

(Nishizuka, 1988). Los ésteres de forbol, el  $\text{Ca}^{2+}$  y la fosfatidilserina formarían un complejo ternario con la enzima.

La “activación irreversible” representaría la inserción de PKC en la bicapa lipídica, permaneciendo así activada independientemente de la presencia continua de ésteres de forbol o  $\text{Ca}^{2+}$  (Stabel & Parker, 1991), que determina el fenómeno de “down-regulation” y lleva a la degradación de la enzima.

### **3- Mecanismos de transducción de señales**

#### **3.1 Eucariotes superiores**

La mayoría de los agonistas extracelulares ejercen sus efectos sobre las células por activación o inhibición de sistemas de señales transmembrana que controlan la producción de segundos mensajeros.

Estos últimos son los mediadores que actúan modulando las actividades de quinasas y fosfatasas de proteínas. La fosforilación (o defosforilación) provoca cambios conformacionales en proteínas reguladas, las cuáles cambian sus propiedades bioquímicas, conduciendo a respuestas fisiológicas, normalmente evocadas por el agonista particular.

Las vías principales de los segundos mensajeros y las quinasas de proteínas que ellos activan tienen muchas características en común. Una molécula receptora ubicada en la superficie celular transmite información a través de la membrana plasmática hacia el interior de la célula a través de la familia de proteínas G, que solamente se activan cuando unen GTP. Estas proteínas G activan una proteína “amplificadora”, ubicada en la cara interna de la membrana, que convertirá ciertos precursores en segundos mensajeros. Dos caminos están principalmente asociados con la producción de segundos mensajeros que regulan la actividad de proteínas celulares: el sistema de la adenilato ciclasa (AC) y el de la fosfolipasa C (PLC). Ambas vías transducen la señal hormonal a través de la proteína G, a segundos mensajeros, que estimularán las quinasas de proteínas PKA y PKC. Dichas quinasas amplificarán la cascada, fosforilando sustratos específicos, encargados de llevar a cabo o modificar una determinada ruta metabólica.

La fosforilación específica de los sustratos por ambas quinasas es revertida por un diverso grupo de fosfatasas específicas e inespecíficas, muchas de las cuales, también son reguladas por fosforilaciones dependientes de cAMP.

El cAMP producido por la vía de la AC media un amplio espectro de respuestas a estímulos hormonales. Todos sus efectos los ejerce mediante la activación de la PKA, que actúa como receptor del nucleótido.

Actualmente se sabe que el cAMP interviene en el control del metabolismo de células animales, hongos, algas y protistas a nivel de diferenciación celular (de Gunzburg *et al.*, 1986), neurotransmisión (Hemmings *et al.*, 1989; Nairn *et al.*, 1985), síntesis de macromoléculas (de Gunzburg *et al.*, 1986), variaciones en la permeabilidad de membrana de muchos organismos eucariotas, crecimiento, síntesis de DNA, división celular y motilidad.

El otro camino, ligado a la activación primaria de la FLC, incluye dos segundos mensajeros: DAG e IP<sub>3</sub>. Estos se producen por la acción de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, que actúan sobre receptores, estimulando vía una proteína G, la actividad de PLC  $\beta$ , quien hidroliza específicamente el fosfolípido de membrana PI(4,5)P<sub>2</sub>, liberando DAG e IP<sub>3</sub>. El IP<sub>3</sub>, estimulando su propio receptor, libera Ca<sup>2+</sup> de los reservorios del RE. Este ión puede unirse a CaM, receptor intracelular más abundante para Ca<sup>2+</sup>, provocando cambios conformacionales a este péptido termoestable. El complejo Ca<sup>2+</sup>/CaM activa enzimas específicas como PDE, la quinasa multifuncional dependiente de Ca<sup>2+</sup>/CaM, llamada CaMKII y otras quinasas que fosforilan un solo sustrato, como la quinasa de la cadena liviana de la miosina o la fosforilasa quinasa.

El DAG ubicado en la membrana plasmática, activa junto con el ión Ca<sup>2+</sup> a la PKC, la cual fosforila sustratos intracelulares específicos.

Una clase de agonistas extracelulares peptídicos como los factores de crecimiento, se unen a receptores con actividad de Tyr quinasas. La autofosforilación de estos receptores permite su interacción con proteínas que poseen dominios SH2/SH3, que son las que juegan un papel importante en la transmisión de la señal. La activación de receptores de quinasas de Tyr dispara la activación de muchas quinasas de Ser y Thr cuyo efecto final se manifiesta a través de la variación en la fosforilación de muchas proteínas intracelulares.



Todos los sistemas de transducción de señales descritos interactúan entre sí produciendo diferentes señales y efectos de acuerdo a la respuesta biológica y el tipo celular.

En eucariotes inferiores, los resultados obtenidos hasta el presente demuestran que el sistema de transducción de señales es semejante al demostrado en células de mamíferos. Los segundos mensajeros como cAMP,  $Ca^{2+}$ /CaM y  $Ca^{2+}$ /fosfolípidos regulan sistemas enzimáticos en células como levaduras, protozoarios y plantas.

### **3.2 Mecanismos de transducción de señales en tripanosomátidos**

En los organismos eucariotas, la regulación de las complejas interacciones requeridas para la diferenciación y proliferación, está mediada en parte por los sistemas de fosforilación de proteínas.

Por ejemplo, la fosforilación juega un rol importante en los procesos de transformación celular a través de varios oncogenes (Collet *et al.*, 1980; Hunter & Sefton, 1980; Hunter & Cooper, 1985) y también, en los efectos celulares de varios factores de crecimiento (Hunter & Cooper, 1981; Ek *et al.*, 1982; Kasuga *et al.*, 1982).

También cumple un papel importante en el control del ciclo celular a través de las quinasas dependientes de ciclinas (Lee & Nurse, 1986; Lee *et al.*, 1988).

En los tripanosomátidos, existen evidencias que permiten comenzar a elucidar los mecanismos de transducción de señales. En *T. cruzi*, en particular, se han podido caracterizar varias vías de transducción que resultaron ser muy similares a sus homólogas en eucariotes superiores (Flawiá *et al.*, 1997). Entre ellas se destacan:

- a) vía del cAMP
- b) vías dependiente de  $Ca^{2+}$ , CaM y fosfolípidos.
- c) vía del óxido nítrico

## Vía del AMP cíclico

En esta vía, los componentes básicos son: un receptor transmembrana acoplado a la subunidad catalítica de una AC a través de una proteína G y una PKA que fosforila Ser y Thr en una variedad de enzimas y factores de transcripción.

En *T. cruzi*, fue posible identificar la actividad de AC y purificarla a homogeneidad (Zingales *et al.*, 1979; Torruela *et al.*, 1986; Eisenchlos *et al.*, 1986), y obtener evidencias funcionales y estructurales de la existencia de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína G en membranas de epimastigotes de *T. cruzi*, las cuales también fueron caracterizadas y purificadas (Eisenchlos *et al.*, 1986; Coso *et al.*, 1992). Los datos indican que el parásito poseería un conjunto de proteínas G bien desarrollado que estaría asociado con mecanismos de transducción a través de la membrana celular.

En *Trypanosoma brucei* también fue detectada la enzima AC (Voorheis y Martin, 1982).

Por otro lado, también fue posible identificar y purificar una PKA en epimastigotes de *T. cruzi*, que resultó ser similar a la PKA de corazón bovino clase II, presentando una estructura de holoenzima R<sub>2</sub>-C<sub>2</sub> (Ulloa *et al.*, 1988).

La PKA del parásito se activa a concentraciones nanomolares de cAMP, es específica para fosforilar kémtido (sustrato sintético específico de PKA), histona IIAS e histona VII. La holoenzima se disocia en sus componentes R y C y puede ser reconstituída a partir de las subunidades separadas tanto homólogas como heterólogas.

## Vía dependiente de Ca<sup>2+</sup>, CaM y fosfolípidos

Entre las proteínas quinasas que se asocian con esta vía de transducción, fue posible identificar en *T. cruzi*, actividad de proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/CaM, similar a la CaMKII de cerebro (Ogueta *et al.*, 1994) cuyo rol fisiológico se desconoce aún. En este caso, la CaMKII descrita está asociada al citoesqueleto y flagelo de epimastigotes de *T. cruzi* con un comportamiento bioquímico homólogo a su contraparte en mamíferos y con capacidad de unirse y ser activada por CaM homóloga

(Ogueta *et al.*, 1994). Las proteínas de unión a CaM se expresan diferencialmente durante los estadios del parásito (Orr *et al.*, 1992).

Esto sugiere que la CaMKII de epimastigotes de *T. cruzi* podría jugar un rol importante en eventos dependientes de  $Ca^{2+}$ , tales como la diferenciación morfológica del parásito o en eventos que controlen el movimiento flagelar (Ogueta *et al.*, 1994).

La CaM ha sido detectada y purificada en *T. brucei* (Ruben *et al.*, 1983; Ruben y Patton, 1985), en *T. cruzi* (Téllez-Iñón *et al.*, 1985) y en *Leishmania braziliensis* y *L. mexicana* (Benaim *et al.*, 1987).

También se encontró actividad de PKC en epimastigotes de *T. cruzi* (Gómez *et al.*, 1989). Esta proteína está asociada a microsomas y citosol, requiere  $Ca^{2+}$  y es estimulada por fosfatidilserina, DAG y ésteres de forbol e inhibida por polimixina B y staurosporina. Además, existen evidencias de su existencia en más de una forma. Su rol tampoco está definido. En *T. brucei*, se descubrió una enzima semejante a PKC (Keith *et al.*, 1990).

También fue posible identificar la existencia de una PLC asociada a membranas (Schenkman *et al.*, 1988) y de una vía de transducción de señales mediada por DAG e inositol fosfato que es activada por  $Ca^{2+}$  (Docampo & Pignataro, 1991).

#### Vía del óxido nítrico

A partir de extractos solubles de epimastigotes de *T. cruzi*, fue posible purificar parcialmente la óxido nítrico sintetasa, enzima encargada de catalizar la conversión de L-arginina en citrulina y óxido nítrico en presencia de NADPH. Esta enzima es activada por  $Ca^{2+}$ , CaM, entre otros. También se describió la presencia de una guanililciclase y receptores NMDA (subtipo de receptores para L-glutamato específico para N-metil D-aspartato (NMDA)). Por otro lado, existen evidencias que indican que la L-arginina y el NMDA aumentan la producción de óxido nítrico y los niveles de cGMP en epimastigotes (Paveto *et al.*, 1995).

En base a todas estas evidencias, fue posible plantear un sistema hipotético de transducción de señales en *T. cruzi* (Flawiá *et al.*, 1997) (figura 4).

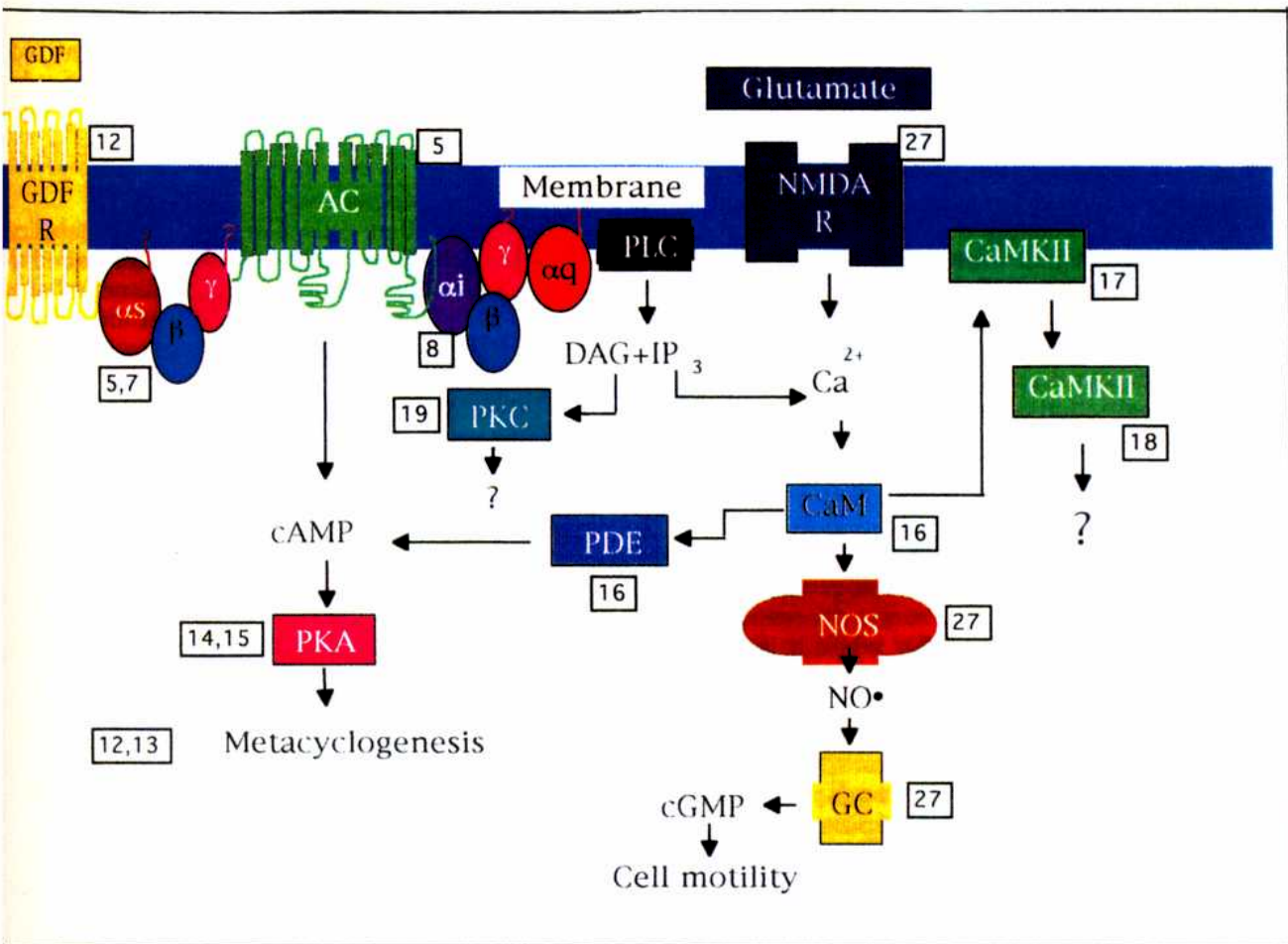


Figura 4- Mecanismos de transducción de señales en epimastigotes de *T. cruzi*. GDF: factor derivado de la globina; R: receptor; AC: adenililciclasa; PLC: fosfolipasa C; CaM: calmodulina; PKC: proteína quinasa C; CaMKII: proteína quinasa dependiente de CaM; NMDA: N-metyl-D-aspartato; NOS: óxido nítrico sintetasa; NO: óxido nítrico; GC: guanililciclasa (Flawiá *et al.*, 1997)

Por otra parte, han sido clonados varios genes que codifican para proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDK), grupo de quinasas que participan en la regulación del ciclo celular, en varios tripanosomátidos, entre ellos, *T. brucei*, *Crithidia fasciculata* y recientemente en *T. cruzi* (Mottram *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 1997 en prensa).

Las fosfatasa de proteínas se han descripto en tripanosomátidos africanos (Walter & Opperdoes, 1982). En *L. donovani* se describieron actividad de fosfatasa hacia varios sustratos fosforilados e inositol fosfatos (Das *et al.*, 1986). En *T. brucei rhodesiense* se clonó la subunidad catalítica de la fosfatasa de proteínas 1 y 2A, presentando 40-66% de homología con las fosfatasa de mamíferos (Erondu & Donelson, 1991).

#### 4- RAC quinasas

En el año 1991, 3 grupos de investigadores independientes lograron identificar en mamíferos, en forma simultánea, una proteína Ser/Thr quinasa cuyo dominio catalítico está estrechamente relacionado con las PKA y PKC por igual y a las cuales designaron RAC (Jones *et al.*, 1991), PKB (Coffer & Woodgett, 1991) o Akt (Bellacosa *et al.*, 1991). Jones *et al.* (1991), fue el primero en identificar un clon de cDNA al que denominó RAC (PK relacionadas con PKA y PKC) por análisis de una biblioteca de cDNA derivada de las líneas celulares humanas MCF-7 y W138 bajo condiciones de baja rigurosidad usando como sonda un fragmento de DNA de 500 pb, que codifica la subunidad catalítica de la PKA.

Coffer y Woodgett (1991) a través de la técnica de PCR y usando oligonucleótidos degenerados diseñados sobre las regiones conservadas entre Ser/Thr quinasas, amplificaron un fragmento de DNA mediante el cual lograron identificar el clon llamado PKB a través del "screening" de una biblioteca genómica de cerebro bovino.

Por otro lado, Akt fue identificado como un oncogen retroviral del virus AKT8 (virus transformante agudo aislado a partir de un linfoma de células T) en roedores (Bellacosa *et al.*, 1991) y posteriormente el c-Akt fue aislado a partir de una biblioteca de cDNA de timo murino. Este c-Akt resultó ser homólogo a PKE y RAC.

Estos clones homólogos aislados a partir de distintas especies de mamíferos, codifican para un dominio de Ser/Thr quinasas estrechamente relacionado con los dominios de PKA y PKC.

Al respecto, estudios comparativos realizados entre los dominios catalíticos de las RAC humanas y proteínas quinasas de las familias PKC, PKA, quinasa S6 y la proteína quinasa dependiente de cGMP permitieron establecer un dendograma a través del cual se deduce la relación filogenética entre estas proteínas.

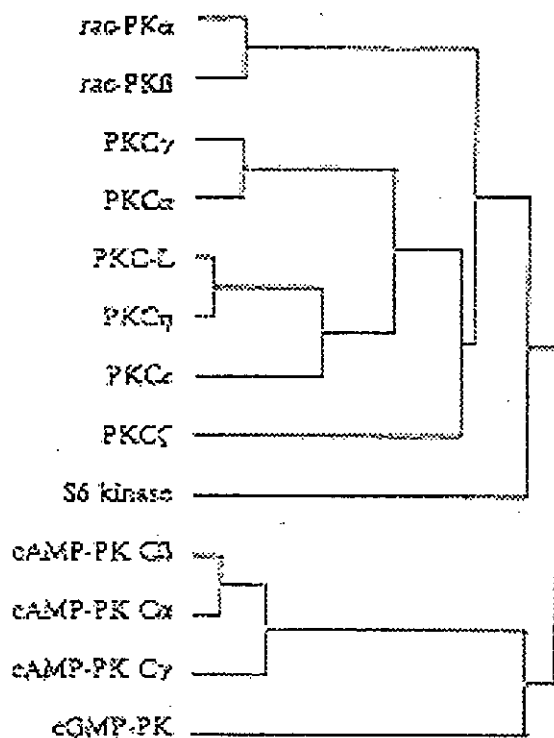


Figura 5- Relaciones por apareamiento entre los dominios catalíticos de las proteínas quinasas de la subfamilia de los segundos mensajeros. Los dominios catalíticos (de acuerdo a la definición de Hanks *et al.*, (1988)) de las proteínas quinasas indicadas en el dendograma, fueron utilizados en un alineamiento progresivo por apareamiento (Feinberg & Doolittle, 1987), usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) (PILEUP, GCG version 7.0). El dendograma representa este alineamiento por apareamiento donde la distancia horizontal es una medida de la relación entre las secuencias (Jones *et al.*, 1991)

Este dendograma demuestra que las RAC quinasas probablemente divergieron de la familia de las PKC antes de que ocurra la divergencia entre PKC y PKA (Jones *et al.*, 1991).

Así los clones constituyen un nuevo grupo de Ser/Thr quinasas, las RAC quinasas.

Posteriormente, otros grupos lograron identificar homólogos a estos genes en otros organismos: rata (Konishi *et al.*, 1994), *Drosophila melanogaster* (Andjelkovic *et al.*, 1995), *Dyctiostelium discoideum* (Haribabu & Dottin, 1991), *Entamoeba histolytica* (Que *et al.*, 1993), *Caenorhabditis elegans* (Waterston *et al.*, 1992).

En algunos casos, fue posible encontrar isoformas de esta proteína. En humanos y rata se encontraron 2 formas: RAC  $\alpha$  y  $\beta$ . Las 2 proteínas muestran 90% de homología entre sí y ambas se expresan en todos los tipos celulares ensayados, siendo en general, el nivel de expresión de  $\beta$  inferior al de  $\alpha$  (Jones *et al.*, 1991; Konishi *et al.*, 1994).

Estructuralmente, en la mayoría de las RAC quinasas identificadas, pero en particular, en mamíferos, *D. melanogaster* y *C. elegans*, la proteína puede dividirse en tres regiones:

- un dominio quinasa central que muestra un alto grado de homología a nivel de secuencia aminoacídica con los dominios catalíticos de PKC y PKA (75%/65% respectivamente).
- un dominio carboxilo terminal que aparentemente no presenta similitud con ninguna estructura proteica conocida.
- una región amino terminal con una secuencia que codifica para un dominio de homología a pleckstrina (PH) el cual, podría funcionar como un posible dominio regulatorio.

Su denominación se debe a que inicialmente fue encontrado en la pleckstrina, principal sustrato de la PKC en las plaquetas (Haslam *et al.*, 1993). Este dominio PH ha sido identificado en varias proteínas que participan en distintas vías de transducción de señales como proteínas quinasas, fosfolipasas y proteínas que se unen a GTP (Haslam *et al.*, 1993; Shaw *et al.*, 1993). Esto sugiere su probable función como dominio proteico modular que regularía de algún modo las interacciones proteína-proteína. Se sabe, que la estructura primaria de este dominio PH varía entre diferentes proteínas, no así su estructura terciaria; por otro lado, se encontró en esta secuencia homología con regiones de unión a lípidos (Yoon *et al.*, 1994).

Es importante aclarar, que en las proteínas RAC de *D. discoideum* y *E. histolytica*, los dominios amino terminales son altamente básicos pero no parecen tener homología con los dominios de pleckstrina.

Con respecto a la actividad biológica, poco se conoce acerca de su comportamiento a nivel bioquímico. Sin embargo, recientemente fue posible demostrar que las RAC quinasas humanas son activadas in vivo por insulina e IGF-1 a través de la fosforilación de la Thr308 y la Ser473 en el dominio carboxilo terminal y que este proceso de fosforilación puede prevenirse de varios modos:

- 1) por el agregado de inhibidores de PI3K como wortmanina (Alessi *et al.*, 1996).
- 2) por la expresión en una mutante negativa de PI3K (Kohn *et al.*, 1995).

3) el uso de mutantes para el receptor de PDGF que no pueden activar a la PI3K (Burgering & Coffey, 1995).

Esto indicaría que la actividad de las RAC quinasas estaría regulada por una quinasa, en este caso la PI3K, que mediaría su fosforilación.

A su vez, fue posible localizar a las RAC quinasas por delante de PI3K en la vía de transducción de señales (Franke *et al.*, 1995).

Los receptores Tyr quinasa de factores de crecimiento, activan varias vías de transducción de señales dependiendo del ligando y el tipo celular:

1- La vía inducida por la activación de la PLC que conduce a la activación de la PKC y de quinasas sensibles a  $Ca^{2+}/CaM$ .

2- La vía mediada por RAS que lleva a la activación de una cascada RAF1-MEK-ERK quinasas.

3- La vía inducida por la quinasa de fosfatidilinosítoles: PI3K. Esta quinasa fosforila los fosfoinosítoles en la tercera posición del anillo del inositol, generando PI(3)P, PI(3,4)P y PI(3,4,5)P. La función de estos lípidos fosforilados se desconocía hasta no hace mucho tiempo, pero se creía que podían cumplir función de segundos mensajeros pues no se encontró aún una PLC que sea capaz de clivar al grupo inositol fosforilado en tercera posición (Bos, 1995). De hecho, PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI(3,4,5)P<sub>3</sub> activan algunas subespecies de PKC *in vitro* (Nakanishi *et al.*, 1993; Moriya *et al.*, 1996).

Por lo tanto, los fosfoinosítoles directamente podrían actuar como activadores. De hecho, fue posible demostrar la interacción del dominio PH de las RAC con inositolfosfatos y la influencia de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> sobre la actividad RAC *in vitro* (Franke *et al.*, 1995) mientras que PI(3,4)P<sub>2</sub> reconocería este dominio PH en las proteínas (Harlam *et al.*, 1994).

A su vez, estudios realizados usando la Akt quinasa confirmaron que esta enzima era capaz de ser activada por PDGF, EGF, FGF, IGF-1 e insulina (Franke *et al.*, 1995; Cross *et al.*, 1995; Andjelkovic *et al.*, 1996; Burgering & Coffey, 1995; Kohn *et al.*, 1995).

Sin embargo, variantes de Akt que carecen de dominios PH también pueden ser activados por PDGF o insulina en diferentes tipos celulares cuando son dirigidas a la membrana a través del agregado de una señal de miristoilación, donde serían fosforiladas y así activadas. De este modo, se propone que los dominios PH bajo determinadas condiciones, jugarían un rol en el transporte de la Akt a la membrana (Kohn *et al.*, 1996).



Todos estos datos permitieron plantear un modelo hipotético de acción de esta nueva familia de proteínas quinasas en mamíferos (Marte y Downward, 1997) (figura 6).

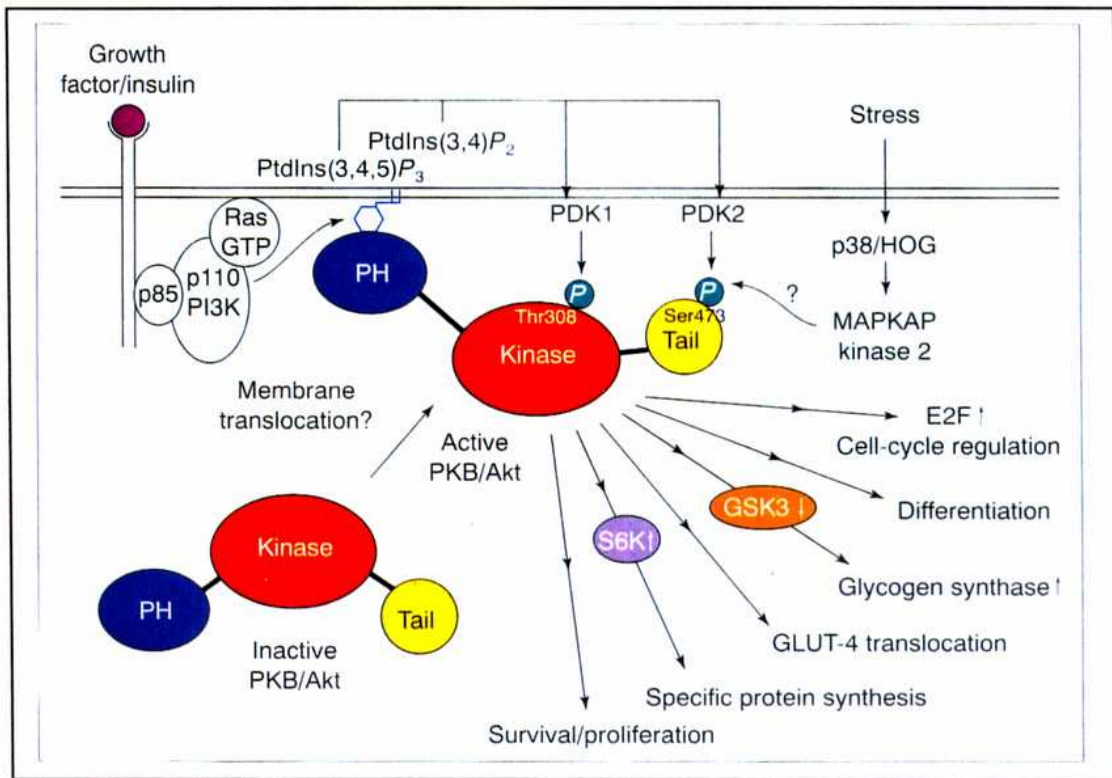


Figura 6 - La activación de la Akt promovida por un factor de crecimiento requiere de la PI3 quinasa (Marte y Downward, 1997).

En él, se propone que la unión de un factor de crecimiento a su respectivo receptor, promueve la activación de la PI3K como consecuencia de la autofosforilación previa del receptor Tyr quinasa.

La PI3K en la membrana transforma PI(4,5)P<sub>2</sub> en PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. En este caso, Akt o PKB sería transportada a la membrana, se uniría a los fosfolípidos de la membrana a través de su dominio PH, sufriría un cambio conformacional, sería fosforilada y así activada.

Al respecto, se postula que PIP<sub>3</sub> activa una quinasa que fosforila a RAC o PKB (RAC-PKK) (Andjelkovic *et al.*, 1996). Esta quinasa ha sido recientemente caracterizada como la PDK1 (PIP<sub>3</sub>-dependent PK1), siendo responsable de la fosforilación en la Thr308 (Alessi *et al.*, 1997).

Posteriormente, la PKB sería liberada de la membrana para que fosforile así sus sustratos específicos, entre los cuales hasta ahora se ha identificado a la glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK3) como sustrato fisiológico de la Akt quinasa (Cross *et al.*, 1995). Posteriormente, sería inactivada por defosforilación, por la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A).

En otros organismos como *D. discoideum*, estas enzimas regularían el crecimiento o la diferenciación, pues la expresión de los genes RAC varían con el desarrollo, observándose 2 especies de mRNA diferentes (Haribabu & Dottin, 1991).

En *E. histolytica* se pudo comprobar que la expresión del gen RAC es unas 4 veces superior en amebas patógenas con respecto a amebas no patógenas (Que *et al.*, 1993).

En *D. melanogaster*, la RAC quinasa (DRAC PK) está codificada por un solo gen que codifica para 2 polipéptidos, cuya expresión estaría regulada maternalmente y cigóticamente durante el desarrollo cumpliendo un rol en la embriogénesis, período durante el cual presenta mayor nivel de expresión (Andjelkovic *et al.*, 1995).

## *OBJETIVOS*

## Objetivos de trabajo

Debido a que los tripanosomátidos constituyen un grupo de organismos de considerable importancia médica y económica y además presentan características únicas que los distinguen de otros seres vivos, resulta interesante poder estudiar que ocurre a nivel de los sistemas de transducción de señales en ellos.

Como se mencionó en la introducción, poco se sabe acerca de los roles que cumplen las quinasas que han sido identificadas hasta ahora en diferentes parásitos pero en particular, en *T. cruzi*.

Sin embargo, las similitudes encontradas con sus homólogos en mamíferos nos permiten de algún modo plantear un rol para algunas de las proteínas quinasas identificadas.

Otro punto de interés, es que hasta el momento solo se han clonado en *T. cruzi*, dos genes que codifican para quinasas dependientes de ciclinas o CDK, pero no se han logrado clonar los genes que codifican para otras quinasas que ya han sido identificadas bioquímicamente.

A su vez, es importante destacar la reciente identificación de un nuevo grupo de Ser/Thr quinasas que corresponde a una nueva subfamilia de quinasas llamadas RAC o PKB, cuya principal característica radica en la homología que existe a nivel de su secuencia aminoacídica con PKA y PKC por igual. Estas proteínas han sido identificadas en mamíferos, *D. melanogaster*, *C. elegans* y *E. histolytica* pero no se han detectado aún en ningún tripanosomátido. Por lo tanto, nos hemos propuesto clonar el o los genes que codifican para esta nueva proteína quirasa en *T. cruzi*, para su posterior caracterización a nivel molecular y bioquímico y si es posible, dilucidar su posible rol in vivo.

Para tal fin, se llevó a cabo una estrategia muy utilizada actualmente que consiste en la identificación de genes que codifican para diferentes proteínas quinasas usando oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de dominios conservados existentes en las regiones catalíticas de todas las proteínas quinasas, y su utilización en reacciones de PCR usando DNA de *T. cruzi* como templado.

Una vez amplificados los fragmentos correspondientes a las secuencias codificantes para la enzima buscada, la estrategia a seguir fue:

- Clonado y secuenciación completa del gen identificado.

- Comparación de la secuencia con otras proteínas quinasas conocidas y clasificación dentro de una familia o grupo de quinasas en particular.
- Expresión de la proteína que codifica este gen en forma recombinante.
- Caracterización bioquímica de la proteína recombinante.
- Obtención de anticuerpos policlonales.
- Estudios de inmunolocalización.
- Estudios de expresión diferencial en diferentes estadios del parásito teniendo en cuenta la estrecha correlación que existe entre los procesos de diferenciación celular y los mecanismos de fosforilación y defcsforilación de proteínas.

## *MATERIALES Y METODOS*

## Materiales y métodos

### 1. Células y medios de cultivo

Parásitos: Epimastigotes de *T. cruzi* se cultivaron a 28 °C en un medio BHT (por litro: infusión de cerebro-corazón: 33 g; Triptosa: 3 g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 32 g; KCl: 0.4 g; glucosa: 0.3 g; hemina: 20 mg; pH: 7.2-7.4) adicionado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado previamente a 56 °C durante 45 min, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Cazzulo *et al.*, 1985). La cepa de *T. cruzi* Tulahuén 2 (Tul 2) fue cedida por la Dra. Elsa. L. Segura, Instituto Mario Fatała Chabén, Bs. As., Argentina.

Bacterias: Para los experimentos de clonado se usaron las cepas *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) y XL1 MRF' (Stratagene).

Para el screening de la biblioteca genómica de *T. cruzi* se usó la cepa *E. coli* Y1090.

La biblioteca genómica se construyó en el fago *lambda gt11*.

Para la expresión de la proteína recombinante se usó la cepa *E. coli* BL26 (DE3) (Novagen).

Las bacterias fueron crecidas en medio LB: NaCl 0.5%, Triptona 1%, extracto de levadura 0.5% o en medio LB suplementado con MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

## Métodos

### 2. Preparación de DNA genómico de *T. cruzi*

1 g de parásitos lavados se resuspendieron en 10 ml de solución I (Tris-HCl 10 mM (pH 7.6), EDTA 100 mM (pH 8.0), NaCl 100 mM). Se agregó 1 ml de SDS 10 % y se mezcló suavemente. Luego se agregó RNasa A (10 mg/ml) a concentración final 0.1 mg/ml y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente.

Se agregó proteinasa K (20 mg/ml) a concentración final 50 µg/ml y se incubó a 45 °C toda la noche.

Luego se realizaron 3 extracciones con un volumen de fenol (pH 7.0), 3 extracciones con fenol/cloroformo (1:1) y 2 extracciones con

cloroformo/alcohol isoamílico (1:1). Se centrifugó la fase acuosa a 13000 rpm durante 1 h para precipitar el DNA del kinetoplasto.

Al sobrenadante se le agregó acetato de sodio 0,3 M y etanol (2,5 volúmenes), se precipitó toda la noche a -20 °C y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 h a 4 °C.

El DNA se resuspendió en solución II (Tris-HCl 10 mM (pH 7.6), EDTA 1 mM (pH 8.0)) y se determinó su concentración por absorbancia a 280 nm.

### 3. Preparación de RNA de *T. cruzi*

1 g de parásitos se centrifugaron y lisaron por el agregado de 1 ml de Trizol Reagent (Gibco BRL). Las células resuspendidas en Trizol se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Luego se agregaron 0.2 ml de cloroformo, se agitó por 15 s y se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 15 min a 4 °C. Luego se centrifugó, la fase superior se trasladó a un nuevo tubo y el RNA se precipitó por el agregado de 0.5 ml de isopropanol. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 12000 g por 5 min a 4 °C.

El RNA precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75% y se centrifugó a 7500 g durante 5 min a 4 °C.

El pellet de RNA se secó y resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (inhibidor de RNAsas).

El RNA fue utilizado para las reacciones de síntesis de cDNA y para los experimentos de Northern blot.

### 4. Preparación de cDNA

Se incubaron 5 µg de RNA total con 1 ml de oligodT (Gibco BRL) en un volumen de 13 µl a 70 °C por 10 min. La mezcla se colocó en hielo y se agregaron los siguientes reactivos: 2 µl de buffer de síntesis 10x (Tris-HCl 200 mM (pH 8.4), KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, BSA (1mg/ml)), 1 µl dNTP's



100 mM, 2  $\mu$ l DTT 100 mM, 1  $\mu$ l Superscript II transcriptasa reversa (200 U/ml) (Gibco BRL).

Se incubó a temperatura ambiente por 10 min y luego a 42 °C por 50 min. Se detuvo la reacción por calentamiento a 70 °C durante 15 min. Finalmente se agregó 1  $\mu$ l de RNasa H (Gibco BRL) y se incubó a 37 °C por 20 min. Para las reacciones de PCR se utilizaron 2  $\mu$ l de esta reacción.

## 5. Procedimientos con DNA

Las sondas se marcaron usando el kit Prime A Gene Labeling System (Promega). El DNA doble cadena se secuenció usando Sequenase version 2.0 (USB) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y por secuenciación automática utilizando el ALF Express TM DNA Sequencer (Pharmacia). Las reacciones de secuencia, en este caso, se llevaron a cabo de acuerdo al Autoread kit, Rapid Annealing Method usando un oligonucleótido marcado Cy5 (Pharmacia).

Los insertos de los fagos recombinantes se clonaron usando el vector *pBluescript CSK (+)* (Stratagene).

Los productos de las reacciones de PCR se clonaron usando el vector *pT7 Blue-Vector kit* (Novagen) (vector T).

Para la expresión de la proteína en forma recombinante se utilizó el vector de expresión *pET 22 b+* (Novagen).

Los experimentos de Southern y Northern blot se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos por Ausubel *et al.*, (1994).

## 6. Reacciones de PCR

Para llevar a cabo las reacciones de PCR se utilizó como templado DNA genómico o cDNA. El templado fue calentado a 95 °C por 5 min en un volumen final de 45  $\mu$ l conteniendo dNTP's 250 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM y 5  $\mu$ g de cada oligonucleótido. Al cabo de los 5 min a 95 °C se agregaron 2,5 U de Taq polimerasa (Perkin Elmer) o Vent R DNA polimerasa (Biolabs) y se realizaron 30 ciclos.

La temperatura de hibridización utilizada fue de 50 °C y la extensión se realizó a 72 °C por 2 min.

Al finalizar los 30 ciclos se realizó una extensión final a 72 °C durante 10 min y los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio (10 mg/ml).

Secuencia de los oligonucleótidos utilizados :

Tcs: ATHATGGTTYGGNCCNGAYAARTG

Tcas: TCCARTCYTCNGGYTT

Mexon: AACTAACGGTATTATTGATA

N1: TGACACAATAAAGGGGTGACTG

Pksense: GGAACGCCATATGTTGTGCTACTGG

NdeI

Pk antisense: CGCAAGCCTTAGCAGGACCCATTGTC

HindIII

siendo H : T/C/A ; Y : T/C ; N : A/C/T/G ; R : A/G.

## 7. Análisis de la biblioteca genómica

Una colonia de la cepa *E. coli* Y1090 se transfirió a 50 ml de medio LB suplementado con maltosa 0.2% (v/v) y MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Se creció toda la noche a 37 °C con agitación. Las células se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min. El precipitado se resuspendió en 25 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM hasta una OD a 600 nm de 0.5 .

0.6 ml de células se inocularon con 1 ml de una dilución apropiada de fagos (20000 ufp/ml) y se incubaron a 37 °C durante 15 min para permitir la adsorción de los fagos a las células. Luego, se agregaron 7 ml de top agarosa (medio LB en 0.7% agarosa) precalentado a 42 °C y se plaqueó sobre cajas de Petri que contenían medio LB en 1.5 % agar. Se incubó a 37 °C por 8 h. Transcurrido ese tiempo, las cajas se enfriaron a 4 °C por 2 h. Se transfirieron los fagos a filtros de nitrocelulosa, por duplicado y el DNA adsorbido fue desnaturalizado sumergiendo los filtros en solución I (NaCl

1.5 M, NaOH 0.5 M) por 2 min, se neutralizó con solución II (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M (pH 8.0)) por 5 min y se lavó en solución III (Tris-HCl 0.2 M (pH 7.5), SSC 2x) por 30 s.

Posteriormente, los filtros se hornearon a 80 °C por 2 h.

### 7.1. Prehibridización

Los filtros de nitrocelulosa fueron prehibridizados a 42 °C durante 2-3 h en 60 ml de solución de prehibridización (SSC 6x, Denhardt's 5x, SDS 0.5%, formamida 50%, DNA de espermatozoos de salmón 100 µg/ml).

### 7.2. Hibridización

El fragmento de DNA correspondiente a 310 bases del gen Pkfc se marcó radiactivamente por el método de random priming usando [<sup>32</sup>P]-dCTP. La sonda radioactiva se calentó a 100 °C por 10 min y se agregó a los filtros en 30 ml de solución de prehibridización. La incubación se realizó a 42 °C durante toda la noche.

### 7.3. Lavados

Los filtros se lavaron con una solución de lavado (SSC 0.1x, SDS 0.2%) a 65 °C 3 veces durante 30 min y se expusieron con una placa radiográfica Kodak X-Omat AR durante 24 h a -80 °C.

Las placas radiográficas se revelaron y se aislaron los fagos positivos. Se sometieron a 3 ciclos de purificación siguiendo el mismo procedimiento.

Una vez aislados los fagos de interés, se preparó un lisado en medio líquido de los fagos, por incubación de 0.5 ml de células Y1090 crecidas en medio LB suplementado con maltosa 0.2 % y MgSO<sub>4</sub>

10 mM, con 30 µl de fagos eluidos de la agarosa. Se incubaron a 37 °C por 20 min y se inocularon 50 ml de medio LB suplementado con MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

Posteriormente, se incubó a 37 °C durante 6-7 h hasta obtener lisis total.

Los lisados se centrifugaron a 8000 g por 10 min para remover los restos celulares y 10 ml del sobrenadante fueron utilizados para el aislamiento de DNA genómico de los fagos recombinantes utilizando el Wizard Lambda

Preps DNA Purification System (Promega). El DNA de los fagos positivos fue digerido con la enzima EcoRI (Biolabs) para liberar los insertos y sus tamaños fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 1%.

## 8. Expresión de la PKTc recombinante

### 8.1. Construcción del plásmido de expresión

Un fragmento correspondiente a la secuencia nucleotídica completa del gen *pktc* fue amplificado por PCR usando como templado DNA genómico del fago 7 (fago positivo cuyo inserto lleva la secuencia del gen completa) y 2 oligonucleótidos: Pk sense (Pks) y Pk antisense (Pkas) en cuyos extremos 5' se agregaron secuencias de reconocimiento para el corte con 2 enzimas de restricción: Nde I en el oligo Pks y Hind III en el oligo Pkas, con el fin de facilitar el clonado del gen en el vector de expresión.

Luego de obtener el producto de PCR, este fue digerido con las enzimas Nde I y Hind III por 3 h a 37 °C, al igual que el vector de expresión *pET 22b+* (Novagen) para su posterior ligación llevada a cabo durante 12 h a 16 °C. Con esta construcción se transformaron células *E. coli* XL1 MRF' y se analizaron los clones recombinantes.

Posteriormente, el plásmido con la construcción [*pktc* : *pET22b+*] fue secuenciado parcialmente para confirmar que el gen se hallaba clonado en el marco de lectura correcto.

Esta construcción, fue utilizada para transformar células de la cepa *E. coli* BL26 (DE3), las cuales se plaquearon en medio LB agar suplementado con ampicilina (100 µg/ml) para la selección de los clones recombinantes. Cuatro de las colonias obtenidas (clones 1, 2, 3, 4) fueron aisladas y utilizadas para realizar la inducción.

### 8.2. Inducción de la expresión de la PKTc recombinante

Una colonia correspondiente al clon 2 se transfirió a 1 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se creció a 37 °C toda la noche.

Al día siguiente, 1 ml de este cultivo se usó para inocular 5 ml de medio LB-ampicilina y se incubó durante 1 h a 37 °C.

Posteriormente, se agregó al cultivo, 45 µl de una solución de IPTG 0.1 M (concentración final 1 mM) y se incubó durante 3 h a 37 °C con agitación.

Luego de la inducción, las células se centrifugaron a 6500 rpm por 5 min y el precipitado se resuspendió en 500 µl de solución Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), EDTA 2 mM (pH 8.0) y se sonicaron en un *Modifier Cell disruptor W140* 3 veces por 30 s cada pulso, en hielo. Se centrifugó a 11000 rpm por 5 min y se obtuvieron 2 fracciones: soluble e insoluble.

Estas fracciones se analizaron por electroforesis en geles 10% de SDS-PAGE y tinción con Coomassie Blue.

### 8.3. Purificación de cuerpos de inclusión

El protocolo de inducción utilizado es idéntico al anteriormente descrito con la diferencia que en este caso se partió de un cultivo de 20 ml de células BL26 (DE3) transformadas con la construcción [pktc : *pET22b+*]. Luego de centrifugar las células a 6500 rpm por 5 min, fueron resuspendidas en 4 ml de "Binding buffer" (imidazol 5 mM, NaCl 0.5 M, Tris-HCl 20 mM (pH 7.9), PMSF 10 mM).

Las células fueron sonicadas con 3 pulsos de 30 s cada uno en hielo, se centrifugaron a 13000 rpm por 15 min y el precipitado que contiene los cuerpos de inclusión y restos celulares fue resuspendido en 2 ml de "Binding buffer". Se repitió el proceso de sonicación y centrifugación nuevamente.

El precipitado se resuspendió en 4 ml de "Binding buffer" con urea 6 M. Se incubó en hielo durante 1 h para lograr la disolución completa de la proteína y se centrifugó durante 40 min a 15000 rpm. El sobrenadante se utilizó para la posterior purificación de la proteína.

### 8.4. Cromatografía en columna de afinidad

El sobrenadante del material solubilizado se sembró en una columna de ácido iminodiacético (2,5 ml) (Sigma) que tiene acoplados cationes Ni<sup>2+</sup> y

que fue previamente equilibrada en "Binding buffer" con urea 6 M. La columna fue lavada con 2 volúmenes de buffer de lavado I (imidazol 10 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7.9), urea 6 M), 2 volúmenes de buffer de lavado II (imidazol 15 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7.9), urea 6 M) y 2 volúmenes de buffer de lavado III (imidazol 20 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7.9), urea 6 M). La elución se realizó con 6 volúmenes de buffer de elución (imidazol 300 mM, NaCl 0,25 M, Tris-HCl 10 mM (pH 7.9), urea 6 M). La proteína eluida fue procesada con el fin de remover el agente desnaturante y permitir así el replegamiento y la reconstitución de la actividad biológica, por diálisis seriada durante 12 h a 4 °C realizando 3 cambios sucesivos de buffer para permitir la remoción gradual de la urea (A: Tris-HCl 10 mM (pH 7.9), urea 4 M; B: Tris-HCl 10 mM (pH 7.9), urea 2 M; C: Tris-HCl 10 mM (pH 7.9)).

Posteriormente, la proteína se concentró con polietilenglicol 8000 y se midió la concentración de proteínas.

## 8.5. Cromatografía en columna de Mono Q

Se utilizó una columna Mono Q HR5/5 (Pharmacia) corrida a un flujo de 1 ml/min en un equipo de HPLC con monitoreo continuo a 280 nm. La fracción de PKTc renaturalizada se sembró en la columna equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) y se eluyó con un gradiente de NaCl (0 a 0.5 M) en el mismo buffer durante 40 min aproximadamente.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por electroforesis en geles 10% SDS-PAGE.

Aquellas fracciones en las que eluyó la proteína se juntaron y guardaron a -20 °C.

## 9. Producción de anticuerpos

Con el fin de obtener anticuerpos contra la PKTc se utilizó una preparación parcialmente purificada, en este caso las fracciones obtenidas de la Mono Q 300 µg de proteína soluble se inyectaron en un conejo con adyuvante de Freund completo por vía intradérmica.

Luego de 20 días se inyectaron otros 300 µg de proteína en adyuvante incompleto de Freund vía subcutánea y finalmente al cabo de 20 días se realizó una tercera inyección con 150 µg de proteína. Al cabo de 10 días se realizó el sangrado del conejo.

El suero obtenido fue preadsorbido con un extracto crudo de *E. coli* BL26 (DE3) de acuerdo a protocolo de Sambrook *et al.*, (1989).

El suero preadsorbido fue titulado usando diluciones 1:250, 1:500 y 1:1000 en experimentos de Western blot.

## 10. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

Se utilizaron geles 10% de poliacrilamida-SDS (8 x 10 x 0.1 cm) con sistema de buffer discontinuo.

Los geles se fijaron con metanol/ácido acético/agua (50:10:40), luego se tiñeron con Coomassie Blue R-250 (USB) al 0.1% en la misma solución y se destiñeron en la solución de fijación.

Para transferir las proteínas, se corrieron las muestras en SDS-PAGE 10% y luego se transfirieron en un aparato de electrotransferencia semiseca *Semiphor tm TE77* (Hoeffer). El buffer de transferencia usado es igual al buffer de electroforesis con el agregado de 15% metanol y se transfirió durante 45 min a 80 mA (10 V iniciales) a una membrana de PVDF Immobilon-P (Sigma). La membrana se tiñó con solución de Ponceau S en ácido acético 0.1% durante 1 min, se lavó con ácido acético 0.1% y finalmente se enjuagó con agua destilada.

## 11. Western Blot

Los filtros de PVDF con las proteínas transferidas se enjuagaron en TBS (Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM) y luego se bloquearon durante 1 h en BSA 5% en TBS. Las membranas se lavaron 2 veces durante 5 min en TBST (Tween 0.05% en TBS).

Posteriormente, se incubaron con el primer anticuerpo anti FKTC (en la dilución correspondiente) en TBST durante 1 h y se lavaron en TBST una vez durante 15 min y 4 veces durante 5 min.

Luego se incubaron en TBST al que se agregó el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (HRP-labeled segundo anticuerpo; dilución: 1:6000) y se incubó durante 1 h.

Se repitieron los lavados y el revelado se realizó por incubación de la membrana con una mezcla de reactivo quimioluminiscente luminol y reactivo oxidante en una relación 1:1 (Dupont NEN) durante 1 min y se puso a autorradiografiar durante 1 min.

## 12. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó según el método de Lowry *et al.* (1951) y usando albúmina sérica bovina (BSA) como standard.

## 13. Ensayos bioquímicos

### 13.1. Medición de actividad quinasa in vitro

El ensayo de actividad quinasa se realizó en la mezcla de reacción constituida por 20  $\mu$ l de [Hepes 50 mM (pH 7.5),  $MnCl_2$  10 mM,  $MgCl_2$  10mM, DTT 1mM,  $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{-ATP}$  1,5  $\mu$ M ( $2 \times 10^4$  cpm/pmol)], sustrato aceptor 30  $\mu$ g y enzima en un volumen final de 60  $\mu$ l y posterior incubación a 30 °C durante 15 min. Al finalizar la incubación, 40  $\mu$ l se colocaron sobre un papel de fosfocelulosa Whatmann P81 (2 x 2 cm) y se realizaron 3 lavados en hielo durante 10 min en una solución de ácido fosfórico 75 mM. Los papeles se secaron y contaron en solución centelleadora (tolueno/PPO/POPOP) en contador de centelleo. Las mediciones se hicieron por duplicado.

Para los ensayos de autofosforilación, se omitió el agregado del sustrato a la mezcla de reacción.



## 13.2. Análisis de fosfoaminoácidos

### A- Hidrólisis ácida

Los sustratos (histona IIAS o PKTc) fueron fosforilados de acuerdo a la reacción descrita en 13.1.

Se precipitaron con ácido tricloroacético 20%. El precipitado se lavó con acetona fría, se centrifugó, resuspendió en 1 ml de HCl 5 N y se incubó a 110 °C durante 90 min. Luego se llevó a seco y se lavó varias veces con agua para resuspenderlo finalmente en 100 µl de agua.

Las muestras fueron analizadas por cromatografía en papel Whatmann 1 junto con los estándares de P-Ser y P-Thr (30 µg en cada caso) utilizando los siguientes solventes: acetato de etilo/piridina/ ácido acético/agua (5:5:1:3).

La determinación de radioactividad se realizó cortando los cromatogramas en tiras de 1 cm de ancho. Cada tira fue sumergida en líquido de centelleo (tolueno/PPO/POPOP) y la radioactividad contada en contador de centelleo.

Los estándares de P-aminoácidos se revelaron usando una solución de ninhidrina en aerosol y calentando la tira de papel a 65 °C por 5 min.

### B- Determinación de la labilidad de la unión aminoácido-fosfato bajo condiciones alcalinas suaves

Se siguió el protocolo descrito por Martensen, 1984.

Los sustratos fosforilados se trataron con 1 volumen de NaOH 1 N y se incubaron a 37 °C. Se sacaron alícuotas de 50 µl a tiempos 0, 10, 20 y 30 min a las cuales se les agregó 50 µl de HCl 1 N y se precipitaron en ácido tricloroacético 20%.

Los pellets se solubilizaron en 0.5 ml de Protosol, se calentó a 100 °C por 1 min, se agregaron 3 ml de la solución centelleadora (tolueno/PPO/PCPOP) y se contó en un contador de centelleo.

#### 14- Obtención de extractos totales de *T. cruzi*

0.2 g de parásitos se rompieron previamente por congelado y descongelado y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de buffer A (Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), Tritón X-100 0.5 %, inhibidores de proteasas: pepstatina 1  $\mu$ M, TPCK 1 mM, E-64 10  $\mu$ M, PMSF 1 mM, leupeptina 10  $\mu$ M, TLCK 0,5 mM) y se incubaron en hielo durante 1 h. Posteriormente, se centrifugaron a 50000 g por 30 min. Las fracciones obtenidas (citósolica y particulada) se corrieron en un gel 10% SDS-PAGE y se transfirieron a PVDF.

#### 15- Fraccionamiento subcelular

Se siguió protocolo descrito por Cazzulo *et al.*, 1989.

1 g de epimastigotes de *T. cruzi* se lavaron con buffer B (sacarosa 0.32 M, Tris-HCl 25 mM (pH 7.6), EDTA 1 mM, KCl 4 mM, inhibidores de proteasas) y se centrifugaron a 7000 rpm por 10 min.

Posteriormente, se mezclaron 1,5 g de carburo de silicio/1 g de células y se homogeneizaron suavemente con mortero en frío durante 3 min. Se resuspendieron en buffer B en un volumen final de 10 ml y se centrifugó a 500 g por 3 min. El precipitado se lavó 3 veces con buffer B y el sobrenadante fue sometido a una centrifugación diferencial a 1100 g por 10 min, 5000 g por 10 min, 14500 g por 10 min y 105000 g por 1 h obteniendo las correspondientes fracciones: nuclear (N), gránulos grandes (LG), gránulos pequeños (SG), microsomal (M) y fracción soluble (S).

Se determinó la concentración de proteínas totales para cada fracción y se separaron por electroforesis en gel 10% SDS-PAGE para posteriormente ser transferidas a una membrana de PVDF.

#### 16- Tratamiento con carbonato de sodio

Se siguió protocolo descrito por Fujiki *et al.*, 1982.

Fracciones LG y SG con igual cantidad de proteínas totales (10  $\mu$ g) se resuspendieron en 100  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM (pH 11.0) y se incubaron en frío durante 30 min. Se centrifugaron a 50000 rpm por 1 h. Las fracciones

precipitado y soluble se corrieron en un gel 10% SDS-PAGE y se transfirieron para Western blot.

#### 17- Partición en Tritón X-114/agua

10 µg de proteínas correspondientes a las fracciones LG y SG se mezclaron con 480 µl de solución salina (buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7.6), NaCl 0,15 M y 2-mercaptoetanol 5 mM) y 10 µl de Tritón X-114. La mezcla se incubó a 0 °C durante 5 min hasta obtener una suspensión homogénea. Luego la temperatura se elevó a 37 °C por 5 min, se centrifugó a baja velocidad y se extrajo la fase superior con la cual se realizó una segunda extracción.

Ambas fases se precipitaron con acetona y se corrieron en un gel 10% SDS-PAGE.

#### 18- Tratamiento con hidroxilamina

Se siguió protocolo descrito por Pepperberg *et al.*, 1995.

La fracción SG (135 µl) fue resuspendida en buffer C (sacarosa 40%, Tris 10 mM pH 7.9, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 20 mM, hidroxilamina 1 M, inhibidores de proteasas), se incubó a 37 °C por 30 min y se ultracentrifugó a 121000 g por 10 min. El precipitado se lavó 3 veces y se resuspendió en buffer sin 2-mercaptoetanol.

Las fracciones soluble y precipitado se corrieron en un gel 10% SDS-PAGE.

## *RESULTADOS*

# 1. Caracterización molecular

## 1.1. Clonado y secuenciación del gen de la PKTc de *T. cruzi*

### 1.1.1 PCR con oligonucleótidos degenerados

Las proteínas quinasas en la gran mayoría de los organismos, contienen en la región catalítica, varios dominios aminoacídicos altamente conservados (Hanks & Hunter, 1995).

Por lo tanto, se diseñaron oligonucleótidos degenerados sobre las secuencias conservadas de los subdominios II y VIb del dominio catalítico de diferentes proteínas quinasas (figura 7).

#### Secuencias peptídicas

AREKSTDKV primer Tcs (oligonucleótido sense)

LKPENIV primer Tcas (oligonucleótido antisense)

Dichos oligonucleótidos degenerados fueron utilizados para llevar a cabo reacciones de PCR usando como templado DNA genómico de *T. cruzi*.

Como resultado de esta reacción se obtuvieron 3 fragmentos (1, 2 y 3) de 310, 360 y 550 bases respectivamente (figura 6 b).

Estos fragmentos fueron clonados en el vector T y secuenciados. Dichas secuencias fueron traducidas y comparadas con un banco de secuencias de proteínas. La secuencia aminoacídica del fragmento 1 resultó tener un alto grado de homología con los dominios catalíticos de otras proteínas quinasas.

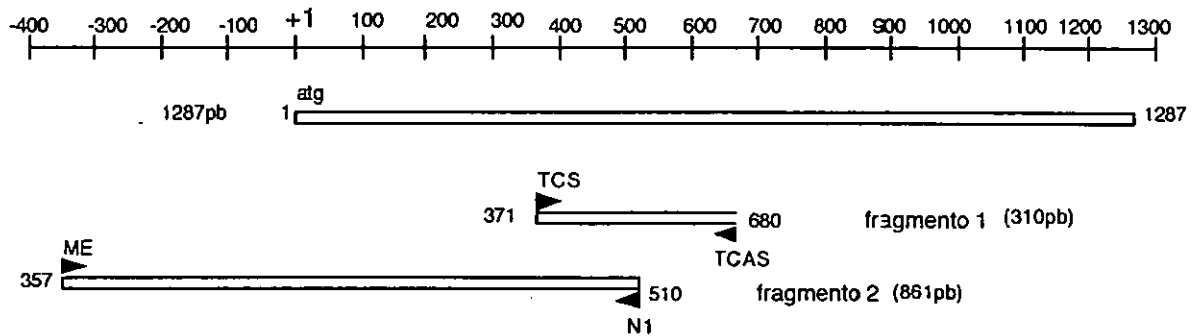
Tabla I- Comparación de secuencias entre fragmento 1 y base de datos (BLAST search)

	Homología
Ser/Thr quinasa RAC homolog ( <i>E. histolytica</i> )	60%
PK2 ( <i>D. discoideum</i> )	64%
Ser/Thr quinasa ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	65%
Ser/Thr quinasa RAC homolog ( <i>D. discoideum</i> )	66%

A continuación, se diseñó un oligonucleótido exacto (N1) sobre la secuencia nucleotídica del fragmento 1 para ser utilizado en reacciones de PCR, con el objetivo de obtener el extremo 5' del gen usando como templado cDNA de *T. cruzi*. Esto es posible debido a que todos los tripanosomátidos comparten una secuencia de 39 nucleótidos llamada miniexón que se encuentra en el extremo 5' de los RNA mensajeros como resultado del proceso de transplicing (Laird, 1989). Esto nos permitió diseñar sobre la secuencia del miniexón, el otro oligonucleótido usado (ME) (figura 6 a).

Como resultado se obtuvo un fragmento de 861 bases que también fue clonado y secuenciado totalmente, resultando corresponder a 357 bases de la región 5' no codificante y 506 bases 5' codificantes del gen, que a su vez contenían parte del fragmento 1 (figura 6 a).

A -



B -

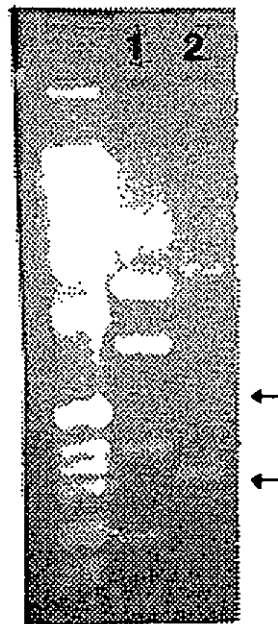


Figura 6- Reacciones de PCR.

A) La base +1 corresponde a la A del codón de iniciación ATG. Con flechas se indican las posiciones de los oligonucleótidos usados para las reacciones de PCR. 130 bases del fragmento 1 están contenidas en el fragmento 2.

B) Electroforesis en gel de agarosa 2%. Calle 1: Marcador de masa molecular (kb), calle 2: productos obtenidos por amplificación de DNA genómico de *T. cruzi* con los oligonucleótidos degenerados.

### 1.1.2. Screening de una biblioteca genómica de *T. cruzi*

Con el objetivo de obtener la secuencia nucleotídica completa del gen se realizó el screening de una biblioteca genómica de *T. cruzi* en el fago *lambda gt11*. Se usó como sonda el fragmento 1 (310 bases), el cual se marcó radiactivamente con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP (ver materiales y métodos).

Luego de 3 ciclos de purificación se obtuvieron 11 fagos positivos independientes.

De dichos fagos se preparó DNA total y sus insertos fueron liberados por digestión con la enzima EcoRI. De los 11 fagos iniciales solo 6 resultaron tener insertos de diferentes tamaños.

Se decidió seguir trabajando con uno de ellos (fago 7) pues su inserto resultó ser el de mayor tamaño (3900 pb). Este fragmento se subclonó en el vector *pBluescript C SK(+)* y se secuenció.

Como resultado, se logró obtener la secuencia completa del gen, la cual posee un único marco de lectura abierto de 1287 pb que correspondería a una proteína de 428 aminoácidos de 48,5 kDa y un PI de 4,98 (figura 7).

En dicha secuencia nucleotídica pueden identificarse un 1 potencial codón de iniciación de la traducción a 357 bases del miniexón y un codón de terminación stop en el mismo marco de lectura.

Al igual que en otros genes de *T. cruzi*, no se encontraron intrones en el marco de lectura abierto del gen.

A este gen se lo denominó *pktc* y su número de acceso al Genbank es U63742.





## 1.2. Análisis de la secuencia aminoacídica de PKTc

### 1.2.1 Homología con otras proteínas quinasas

El resultado del análisis de la secuencia aminoacídica nos permite confirmar que esta proteína es una quinasa, perteneciente a la familia de las Ser/Thr quinasas, pues posee una región de aproximadamente 270 aminoácidos homóloga al dominio catalítico de las proteínas quinasas eucarióticas, ya que contiene los 11 subdominios conservados presentes en los dominios catalíticos de todas las proteínas quinasas (figura 8 b). Estos incluyen:

- el motivo Gly-X-Gly-X-X-Gly, el loop de Gly ubicado en el subdominio I. En este caso, la tercer Gly es reemplazada por un residuo de Ser como en otras quinasas conocidas (Hanks, 1988).
- La existencia de un Lys en el subdominio II que junto con el loop de Gly conforman el sitio de unión de ATP.
- En los dominios VI y VIII se encuentran las secuencias consenso típicas que permiten clasificar a esta quinasa dentro del grupo de las Ser/Thr quinasas. Estas secuencias son: DLKPEN (227-232), DFG (245-247) y APE (269-271).

Por otro lado, de la comparación de esta secuencia con una base de datos (BLAST Search) surge que tiene un considerable grado de homología con un grupo relativamente nuevo de quinasas, las RAC quinasas, PKB o Akt (quinasas relacionadas con PKA y PKC) (Jones *et al.*, 1991; Coffey & Woodgett, 1991; Bellacosa *et al.*, 1991) (Tabla II (a,b) y figura 8 a).

Tabla IIa - Homología entre secuencias aminoacídicas totales de PKTc y diferentes RAC kinasas

Rac quinastas	Homología (%)
Ser/Thr RAC quinasa ( <i>D. discoideum</i> )	72
Proteína quinasa 2 ( <i>D. discoideum</i> )	72
Ser/Thr quinasa sgk (rata)	69
PkB ( <i>Homo sapiens</i> )	64
Ser/Thr quinasa YPK2 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	57

Si comparamos la secuencia del dominio catalítico (aminoácidos 98-359) de la PKTc con los dominios catalíticos de PKA y PKC observamos un grado de homología similar con ambas subfamilias del mismo modo que lo que ocurre con otras RAC quinastas.

Tabla IIb - Homología entre los dominios catalíticos de algunas PKA/PKC y PKTc

PKA	Homología (%)
C-PKA cAMP dep ( <i>Gonyaulax polyedra</i> )	63
C-PKA cAMP dep ( <i>Chinese hamster</i> )	58
C-PKA ( <i>Leishmania major</i> )	52
<b>PKC</b>	
PKC ( <i>D. melanogaster</i> )	58
PKC $\theta$ (ratón)	56
PKC $\gamma$ (ratón)	54

La PKTc posee 97 aminoácidos río arriba (extremo N terminal) y 69 aminoácidos río abajo (extremo C terminal) del potencial dominio catalítico.

El dominio C terminal mostró tener mayor grado de homología con los extremos C terminales de PKC que de PKA. Sin embargo, el dominio N-terminal no mostró homología alguna con secuencias regulatorias presentes en otras quinasas o dominios de pleckstrina aparentemente característicos de las RAC quinasas.

El análisis del perfil de hidropatía indica que esta proteína es netamente hidrofílica y con baja probabilidad de insertarse en la membrana por sí misma (figura 9).





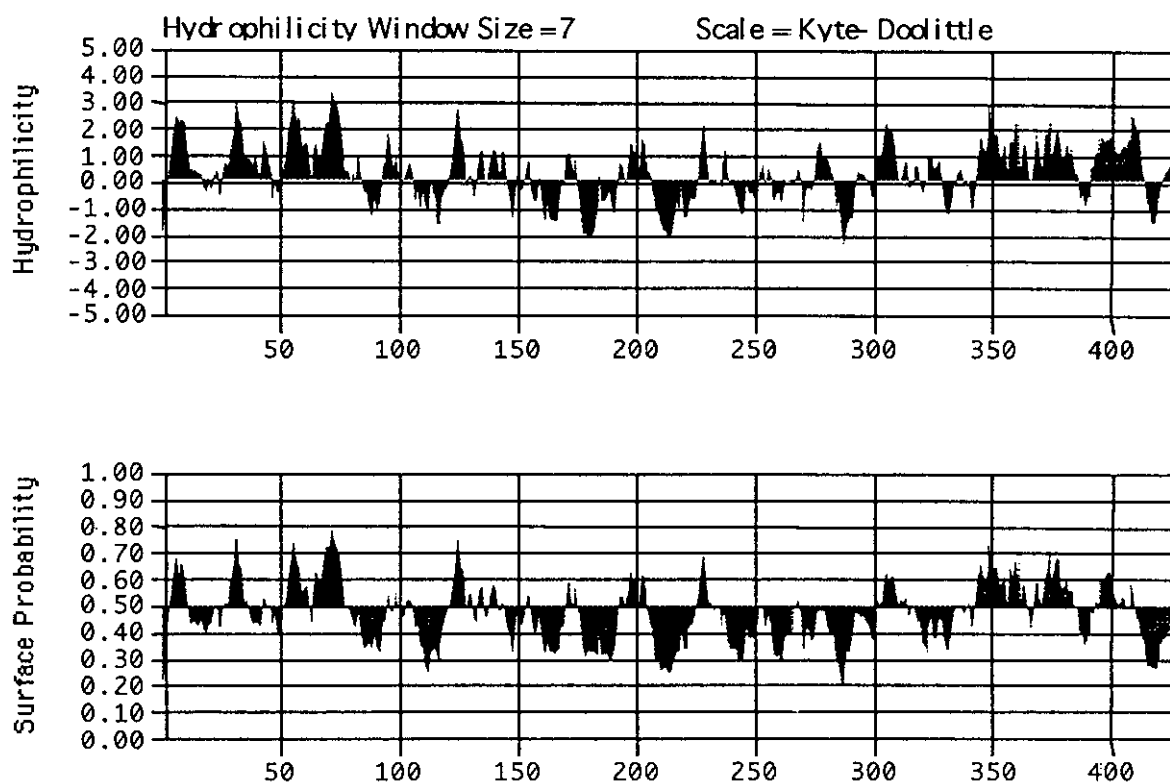


Figura 9- a) Perfil de hidropatía (Kyte-Doolittle); B) Perfil de aminoácidos más expuestos en la superficie de PKTc.

### 1.3. Análisis por Southern blot

DNA genómico de *T. cruzi* fue digerido con varias enzimas de restricción que cortan dentro del gen en un sólo sitio (Cla I, Sph I, Bgl I y EcoR I) y fuera del gen (Pst I, Nde I y Hind III) e hibridizado a alta rigurosidad con una sonda que contiene la secuencia del gen entero.

Como resultado, se obtuvo con cada enzima el patrón de bandas esperado (2 bandas para enzimas con un solo sitio de corte en el gen, 1 banda para enzimas que no cortan dentro del gen) suponiendo que el gen sea copia única (figura 10 a,b).

El mismo resultado se obtiene cuando DNA genómico de *T. cruzi* fue digerido en forma parcial (1, 5, 10, 20, 30, 60, 360 min) esta vez con una enzima que corta por fuera del gen (Hind III) y se realizó un experimento de Southern blot (figura 10 c).

Nuevamente, se obtiene una única banda que aumenta su intensidad en función del tiempo. Esto confirma que el gen es copia única y que no presenta disposición en tandem (disposición característica de muchos genes en *T. cruzi*).

A

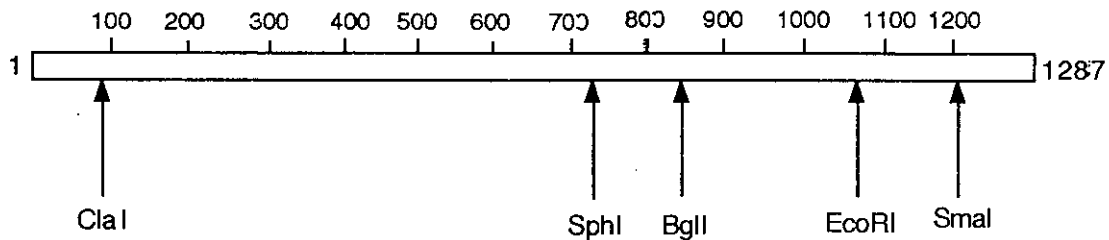
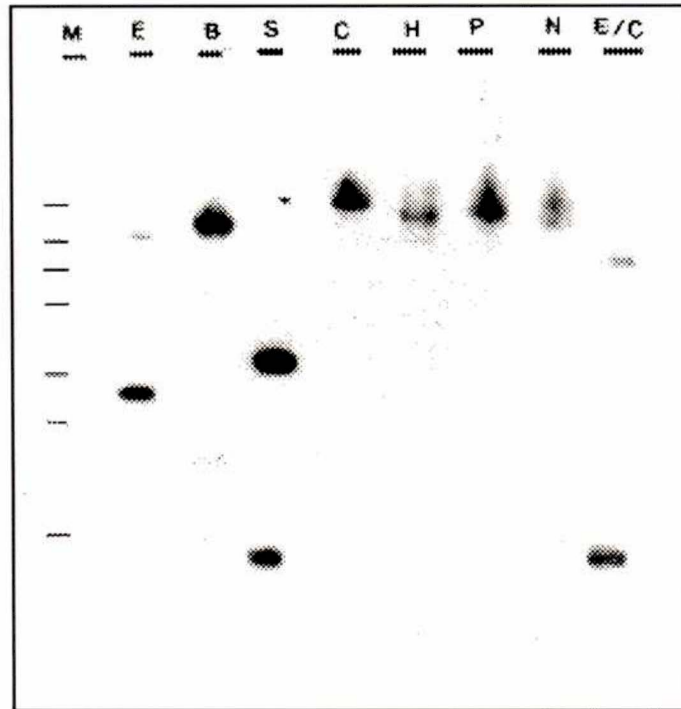


Figura 10- A) Mapa de restricción del gen *pkc*



B -



C -

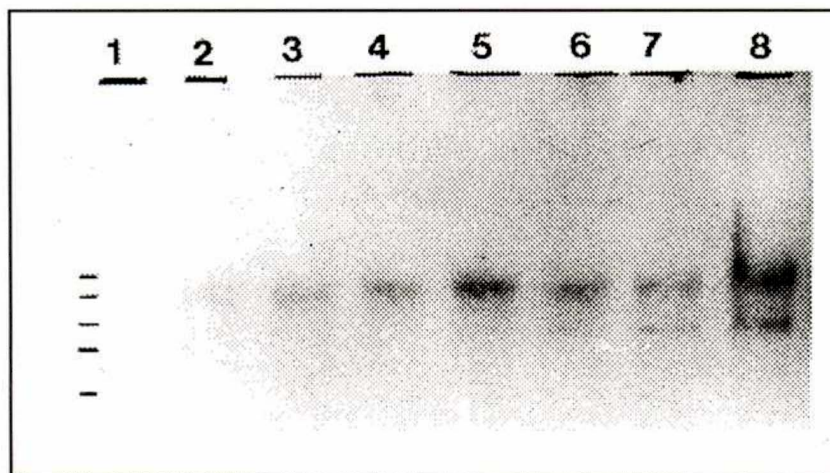


Figura 10-Análisis por Southern blot de DNA genómico de *T. cruzi*

B) DNA genómico de *T. cruzi* (8 µg) fue digerido con las enzimas indicadas, separados los fragmentos en una electroforesis en gel de agarosa 0.8%, transferido a membrana de nylon e hibridizado con una sonda correspondiente a la secuencia completa del gen *pkc* marcada con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP. E: EcoR I, B: Bgl I, Sp: Sph I, C: Cla I, H: Hind III, P: Pst I, N: Nde I, E/C: EcoR I-Cla I; M: marcadores de masa molecular (kb)

C) Digestión parcial de DNA genómico *T. cruzi* con la enzima Hind III. Los tiempos de digestión fueron: 1) Marcador de masa molecular (kb), 2) 1 min, 3) 5 min, 4) 10 min, 5) 20 min, 6) 30 min, 7) 60 min, 8) 360 min.

#### 1.4. Análisis de la expresión del gen *pktc* - Northern blot

RNA total aislado a partir de epimastigotes de *T. cruzi* fue hibridizado con la misma sonda usada en el experimento de Southern blot en iguales condiciones de rigurosidad. Como resultado se obtiene una única banda de 1700 pb lo cual sugiere la existencia de un único mRNA maduro (figura 11 a)

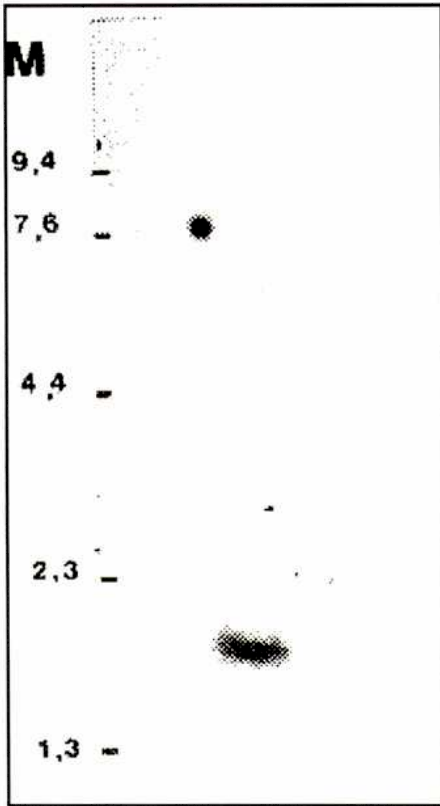
De las 1700 pb, 1287 corresponden a la zona de código, 383 pb forman los extremos 5' y 3' no codificantes.

También se realizaron experimentos de Northern blot para determinar si existe alguna diferencia en los niveles de expresión de *pktc* durante las distintas fases de la curva de crecimiento.

Con tal fin, RNA total aislado a partir de epimastigotes de *T. cruzi* en fases de reposo (lag), exponencial y estacionaria se hibridizó usando 1) la sonda del gen completo y 2) 800 bases del gen de la actina (como control de expresión de un gen constitutivo).

Como resultado, se obtuvo que no hay diferencias en la expresión de este gen a lo largo de la curva de crecimiento (figura 11 b). Resultados posteriores obtenidos por experimentos de Western blot usando extractos totales de epimastigotes en las tres fases de la curva de crecimiento corroboran este resultado (figura 12).

A-



B-

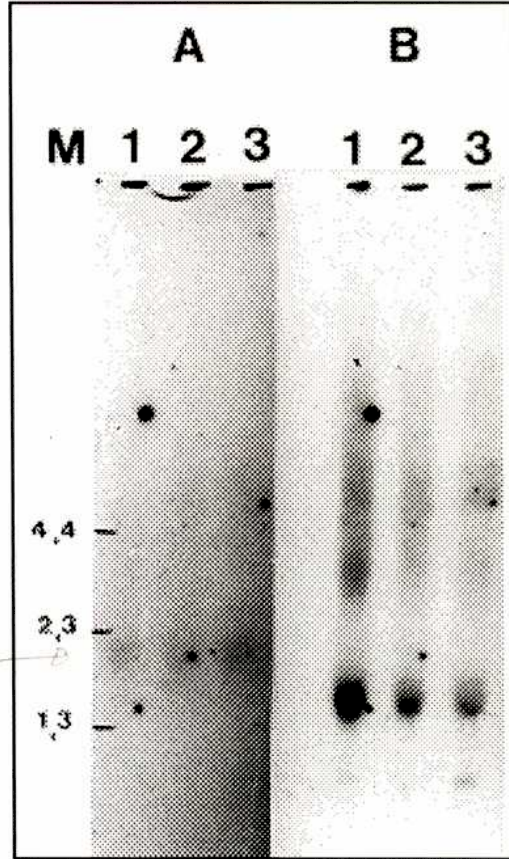


Figura 11- A) RNA total de epimastigotes *T. cruzi* fue separado en gel de agarosa/formaldehído 1,4%, transferido a membrana de nylon e hibridizado con la sonda correspondiente al gen *pkc* entero. M: marcador de PM (kb)

B) RNA total de epimastigotes *T. cruzi* (15  $\mu$ g por calle) perteneciente a las 3 fases de la curva de crecimiento (fases de reposo, exponencial y estacionaria) fue fraccionado, transferido e hibridizado usando, A: la misma sonda que en A) y B: una sonda correspondiente a un fragmento de 800 bases del gen de actina de *T. cruzi*. Calle 1 : marcadores de PM (kb); calle 2: RNA fase de reposo, calle 3: RNA fase exponencial, calle 4: RNA fase estacionaria.

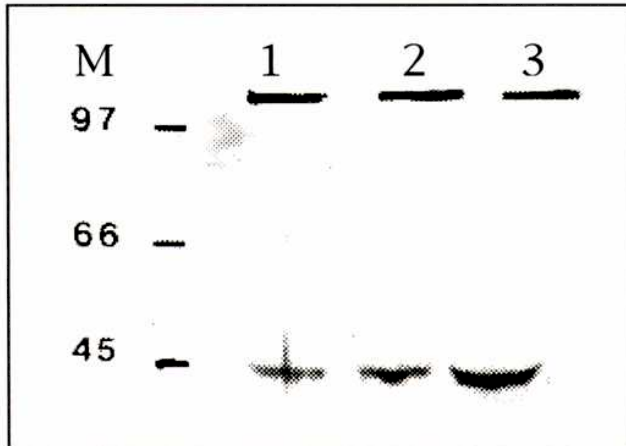


Figura 12- Western blot

Extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi* (100 µg de proteína por calle) correspondientes a los parásitos en las 3 fases de la curva de crecimiento (repose, exponencial, estacionaria) se separaron en un gel 10% SDS-PAGE, transfirieron a Inmobilon e incubaron con anticuerpo anti PKTc (dilución 1:1000)

Calle M: marcadores de masa molecular (kDa), calle 2: extracto total fase de repose, calle 3: extracto total fase exponencial, calle 4 : extracto total fase estacionaria.

## 1.5 . Expresión de la PKTc en forma recombinante

Con el fin de poder caracterizar bioquímicamente a la PKTc y posteriormente obtener anticuerpos policlonales anti PKTc, se expresó a la proteína en forma recombinante.

Por lo tanto, la secuencia del gen completa (1287 pb) fue amplificada por PCR usando un par de oligonucleótidos diseñados sobre los extremos 5' y 3' del gen, los cuales llevan en sus extremos 5', sitios de restricción para permitir el clonado del gen en el vector de expresión *Pet22b+* .

Este vector contiene :

- el promotor T7lac que es reconocido por la T7 RNA polimerasa de la bacteria y que a su vez lleva el gen que codifica para el represor lac, lo cual lo convierte en un promotor inducible por IPTG
- el operador lac y el terminador T7
- el gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa (confiere resistencia a ampicilina)
- un "polylinker" que permite el clonado del gen en el marco de lectura adecuado
- una secuencia His-tag, (río abajo del sitio de clonado) que consiste en una secuencia de 6-10 histidinas que son agregadas al extremo C terminal de la proteína recombinante y que permite la purificación de la proteína por cromatografía en una columna de afinidad que posee cationes  $Ni^{2+}$  acoplados

El mapa de clonado se muestra en la figura 13 .

Posteriormente, la cepa de *E. coli* BL25 (DE3) fue transformada con dicha construcción. El DNA plasmídico aislado de las bacterias recombinantes fue analizado por secuenciación para asegurar el clonado del gen en el marco de lectura correcto.

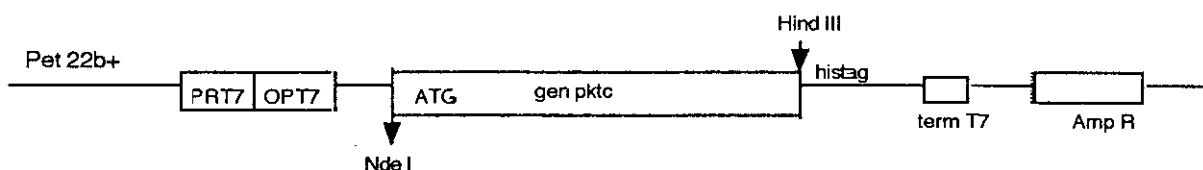


Figura 13- Mapa de clonado del gen *pktc* en el vector de expresión *Pet 22b+*.  
PRT7: promotor T7; OPT7: operador T7; TERM T7: terminador T7; Amp R: resistencia a ampicilina

### 1.5.1. Inducción de la expresión del gen *pkc*

La expresión de PKTc se indujo en las bacterias recombinantes con IPTG 1 mM (ver materiales y métodos).

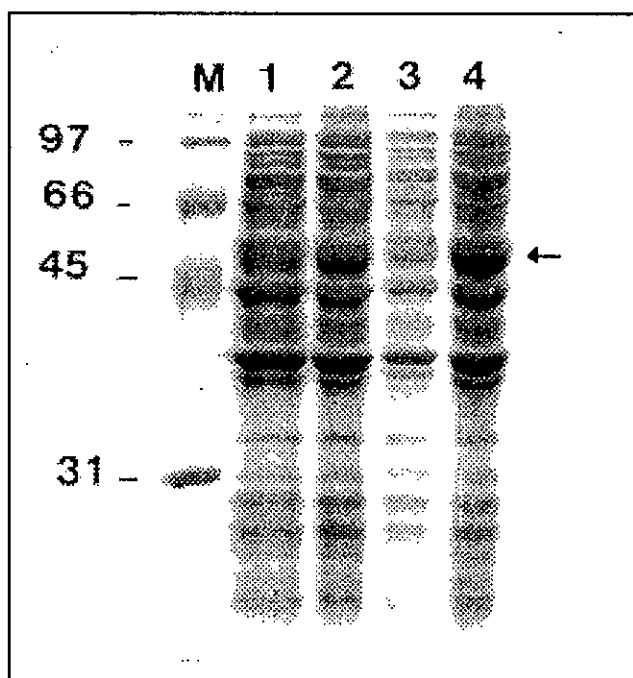
Posteriormente las bacterias fueron lisadas por sonicación y el contenido proteico de las fracciones solubles (sobrenadante) e insoluble (pellet) fue analizado por SDS-PAGE (figura 14 a).

Del gel se deduce que más del 90% de la proteína recombinante se sobrepresó en forma insoluble como cuerpos de inclusión. Además, la proteína expresada tiene un tamaño de 47 kDa, el cual concuerda aproximadamente con el PM calculado a partir de la secuencia aminoacídica (48,5 kDa).

Intentos en obtener la proteína en forma soluble se realizaron variando en este caso la temperatura de inducción.

Se sabe que la temperatura es uno de los factores físicos que influyen en la formación de inclusiones citoplasmáticas (Schem, 1989).

Por lo tanto se realizó la inducción de la expresión a 30 °C en lugar de 37 °C. En ambos casos se observa que la mayor parte de la PKTc recombinante se encuentra en forma de cuerpos de inclusión.



### 1.5.2. Purificación de la PKTc recombinante

Se sabe que el tratamiento de los cuerpos de inclusión con agentes caotrópicos o detergentes solubiliza el contenido proteico (Bandem *et al.*, 1991).

Por lo tanto, la fracción insoluble que contiene a la PKTc en cuerpos de inclusión, se solubilizó en buffer con urea 6 M y se la sometió a una cromatografía de afinidad usando una columna que contiene un soporte con cationes Ni<sup>2+</sup> acoplados (ver materiales y métodos).

La proteína eluyó de la columna con 300 mM imidazol con un índice de pureza del 90% aproximadamente (figura 14 b).

El esquema de purificación se detalla en la figura 15.

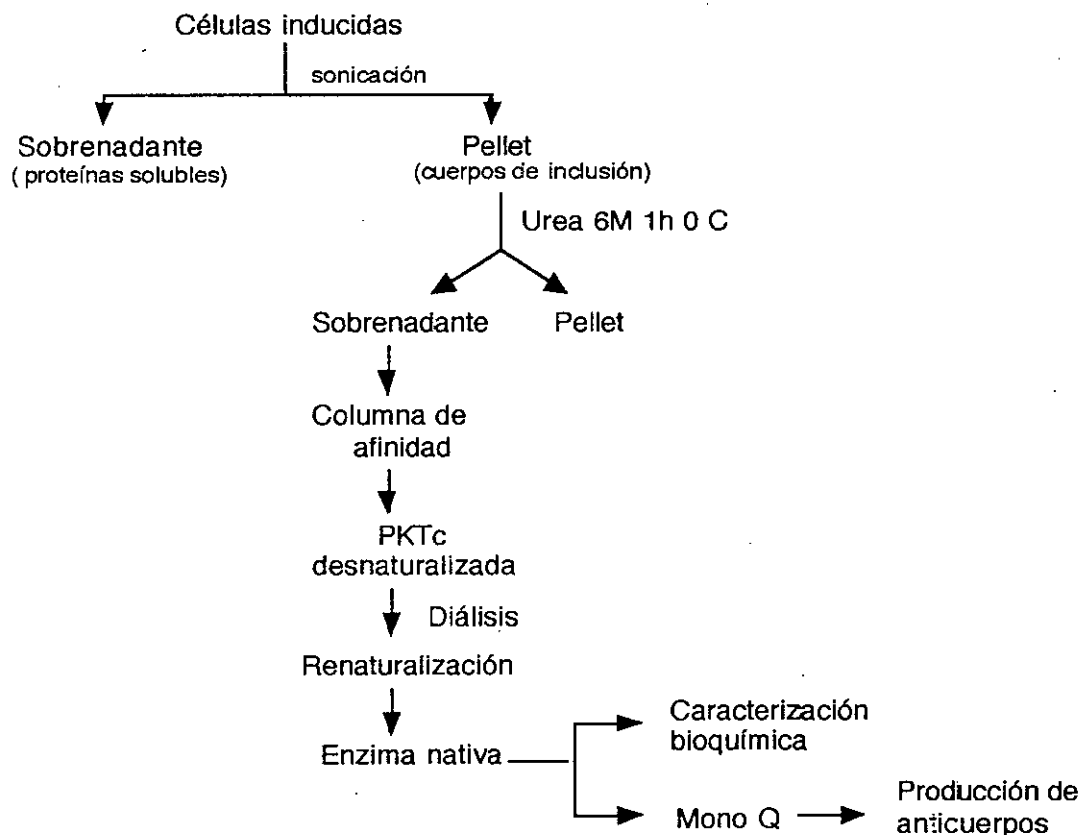


Figura 15- Esquema de purificación de la PKTc recombinante

### 1.5.3. Renaturalización de la PKTc

Usualmente luego de lograr la solubilización de las proteínas contenidas en cuerpos de inclusión es necesario eliminar el agente desnaturante para lograr el replegamiento de la proteína a su forma nativa, recuperando así su actividad biológica.

Por lo tanto, el eluido de la columna de afinidad fue sometido a un proceso de diálisis durante 12 h realizando 3 cambios sucesivos del buffer de diálisis (1- buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), urea 4 M, 2- buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), urea 2 M, 3- buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.0)) para permitir así la remoción gradual de la urea.

Finalizada la diálisis, la proteína renaturalizada fue concentrada y utilizada para:

- a) caracterización bioquímica
- b) producción de anticuerpos

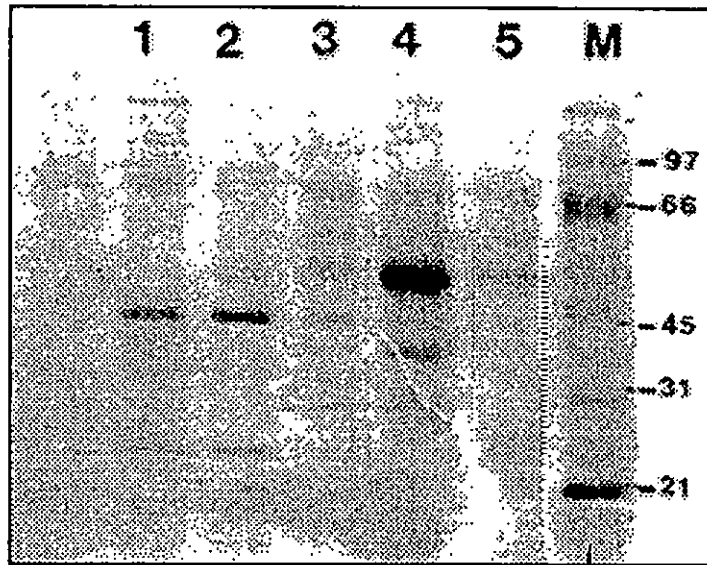
En el caso b), debido a que la PKTc purificada mostró estar contaminada con otras proteínas, se la sometió a un paso de purificación, por una cromatografía en columna de Mono Q.

La columna se equilibró con buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) y la elución se realizó con un gradiente lineal de NaCl 0-0.5 M en el mismo buffer. Las fracciones colectadas se analizaron por SDS-PAGE (figura 14 c).

Las fracciones con mayor grado de pureza se juntaron, se midió su concentración de proteínas y se utilizaron para la producción de anticuerpos policlonales anti PKTc tal como se describe en materiales y métodos.



B -



C -

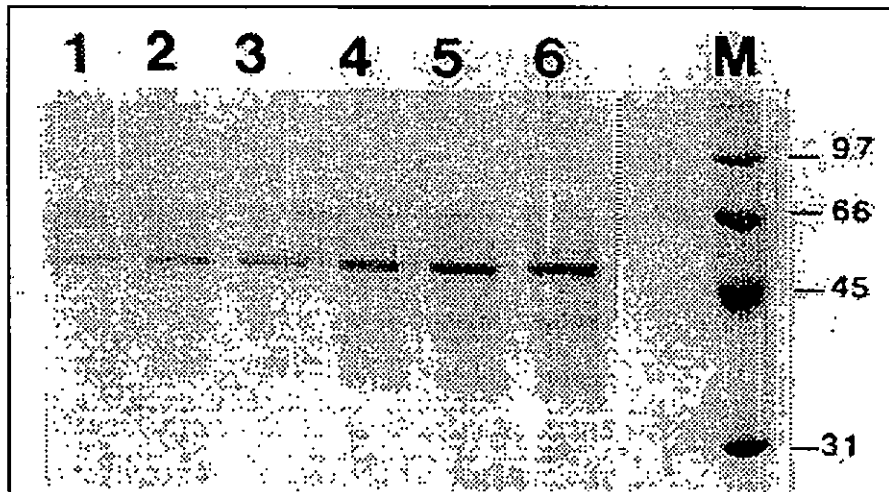


Figura 14-B) Electroforesis en gel de poliacrilamida 10% con SDS de las fracciones obtenidas luego del paso de purificación por cromatografía de afinidad, teñido por Coomassie blue. Calle 1 y 2: lavados; calle 3: elución con imidazol 100 mM; calle 4: elución con imidazol 300 mM; calle 5: elución con imidazol 500 mM; M: marcadores de masa molecular (kDa)

C) Electroforesis en gel de poliacrilamida 10% con SDS de las fracciones eluidas de la columna de Mono Q, teñido por Coomassie blue. Calles 1, 2, 3, 4, 5, 6: PKTc; M: marcadores de masa molecular (kDa).

## 1.6 .Identificación de la actividad quinasa

Con el objetivo de confirmar la actividad quinasa de PKTc y a su vez, verificar de este modo si el replegamiento fue eficiente, se procedió a realizar el ensayo de actividad usando como sustrato aceptor de fosfatos, la histona IIAS y ATP como dador de grupos fosfato (ver materiales y métodos). La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 30 °C.

Los resultados (tabla III) reflejan que la proteína tiene actividad de proteína quinasa luego del replegamiento.

Tabla III- Medición de actividad kinasa

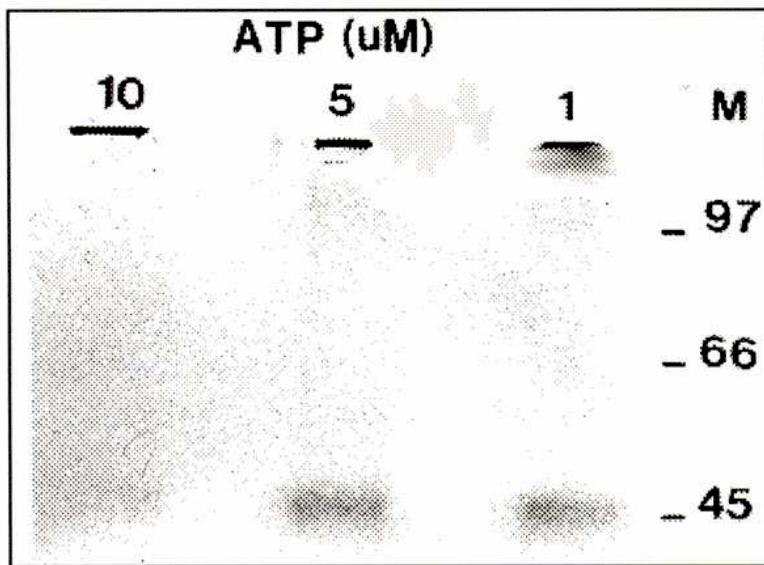
	ACTIVIDAD (cpm)
Histona IIAS	5783 (*)
AutoP	2833

El ensayo de actividad se realizó tal como se describe en materiales y métodos. La autofosforilación se midió omitiendo el agregado del sustrato aceptor en el ensayo de reacción. (\*)El valor de actividad obtenido para la reacción sin kinasa (1500 cpm) ha sido restado previamente.

(Nota: 1000 cpm equivalen a 0.002 pmoles P<sup>32</sup> transferidos/min)

El valor de actividad obtenido en ausencia de histona IIAS nos demuestra que la enzima es a su vez capaz de autofosforilarse, propiedad que presentan la mayoría de las proteínas kinasas (figura 16 a). Esta propiedad en la PKTc, se evidenciaría únicamente cuando la proteína se encuentra en ausencia de un sustrato exógeno. La presencia del aceptor de fosfatos exógeno, hace que la proteína ejerza su capacidad fosforilante sobre él, y no sobre sí misma. Esto quedó demostrado cuando la PKTc se incubó sola y en presencia de diferentes sustratos exógenos (figura 16 b).

a-



b-

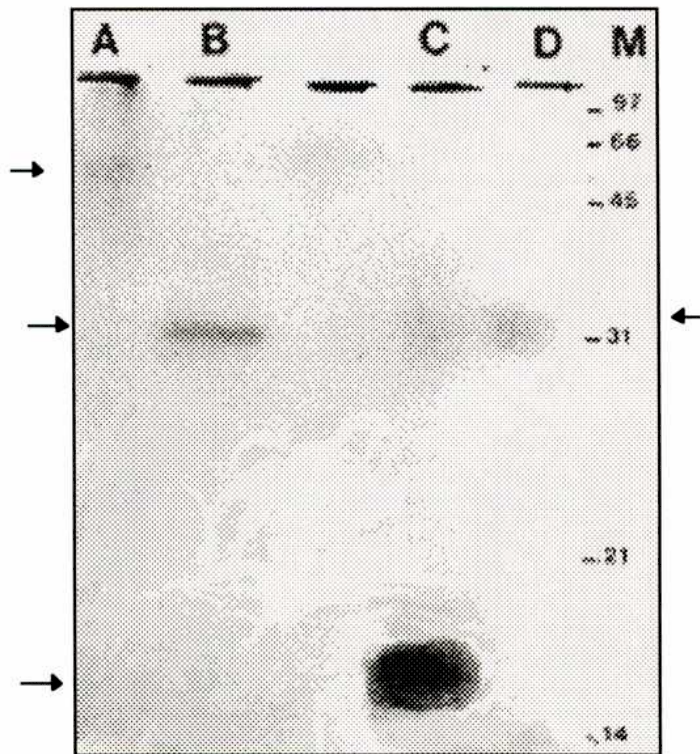


Figura 16- Ensayo de autofosforilación

A) PKTc sola (sin el agregado de un sustrato exógeno), se incubó con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  - ATP y concentraciones crecientes de ATP no radioactivo (1, 5, 10 uM) y se analizó en un gel 10% SDS-PAGE. Luego se secó y se autorradiografió.

B) PKTc se incubó sola o en presencia de diferentes sustratos exógenos con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP y se analizaron los productos de reacción en un gel 10% SDS-PAGE. Posteriormente, se autorradiografió el gel.

Calle A: PKTc sola, calle B: caseína, calle C: histona IIAS, calle D: histona IIIS, M: marcadores de masa molecular (kDa).

## 2. Caracterización bioquímica

Determinación de algunas propiedades bioquímicas de la PKTc recombinante

### 2.1. Especificidad de sustrato

Se probaron varios sustratos potenciales en ensayos de actividad usando PKTc recombinante (figura 17).

Los valores de fosforilación se expresaron en relación con el valor de actividad para la histona IIAS, sustrato con el cual se obtuvieron máximos valores de actividad.

Caseína y protamina se fosforilan en menor proporción al igual que kemptido (péptido sintético específico para la PKA) y GS (péptido sintético específico para la PKC), mientras que histona H1 y BSA demostraron ser sustratos muy pobres.

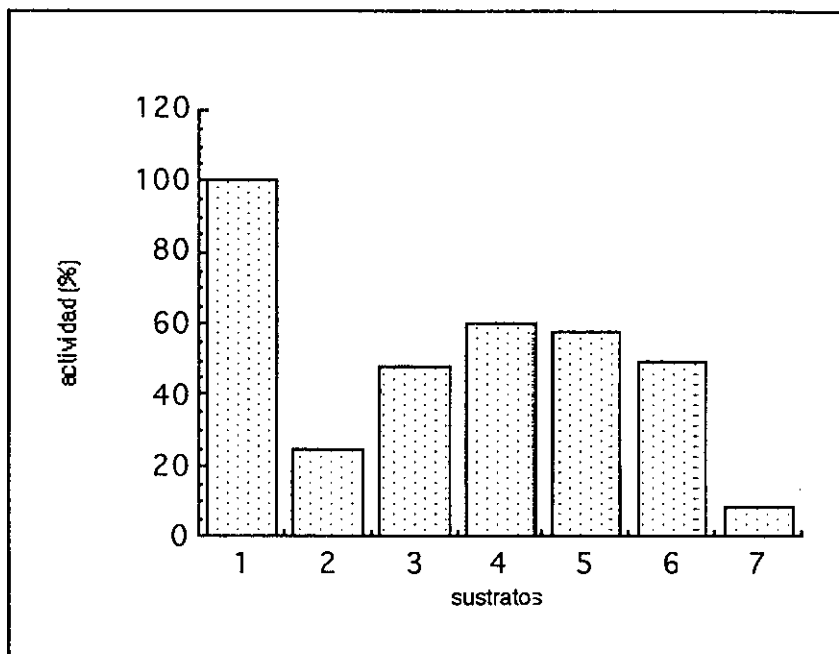


Figura 17- Especificidad de sustrato La actividad PKTc se midió en presencia de diferentes sustratos exógenos. 1: histona IIAS; 2: histona H1; 3: caseína; 4: protamina; 5: kemptido; 6: GS; 7: BSA

## 2.2. Requerimiento de cationes

El  $Mn^{2+}$  resultó ser el catión divalente necesario para la actividad de la enzima (figura 18 a). En el gráfico se observa que la enzima carece de actividad en presencia de  $Mg^{2+}$  10 mM (línea 3) pero presenta actividad en presencia de  $Mn^{2+}$  10 mM (línea 2).

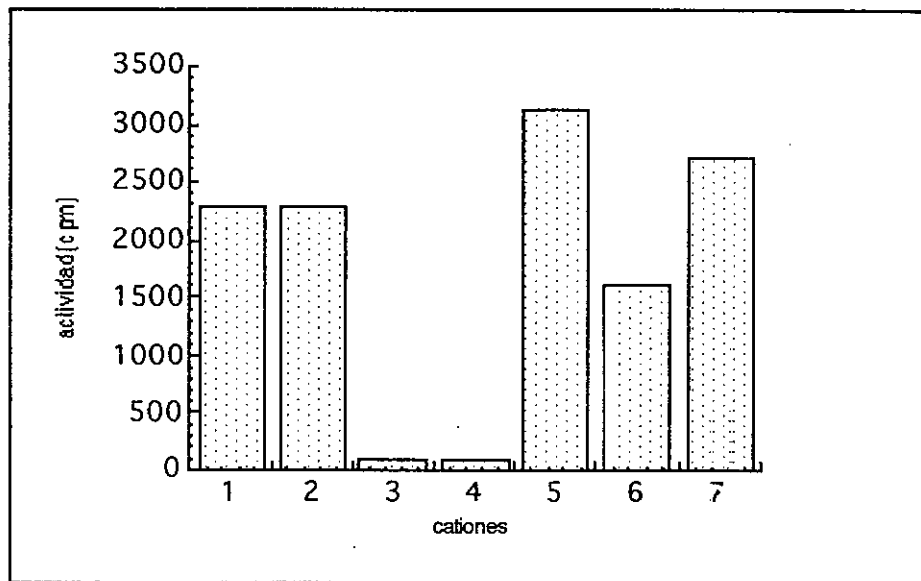
Estos datos se confirman con los resultados obtenidos cuando se midió actividad en presencia de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  a distintas concentraciones (figura 18 b y c). Nuevamente, vemos que al medir actividad en presencia de  $Mg^{2+}$  a concentración constante (10 mM) y cantidades crecientes de  $Mn^{2+}$ , la enzima mostró valores de actividad entre 0 (en ausencia de  $Mn^{2+}$ ) y valores máximos a concentraciones de  $Mn^{2+}$  mayores de 1 mM. (figura 18 b)

Por otro lado, a concentración constante de  $Mn^{2+}$  y cantidades crecientes de  $Mg^{2+}$ , la PKTc alcanza su valor máximo de actividad en ausencia de  $Mg^{2+}$  y se mantiene constante en ese valor (línea 0, figura 18 c).

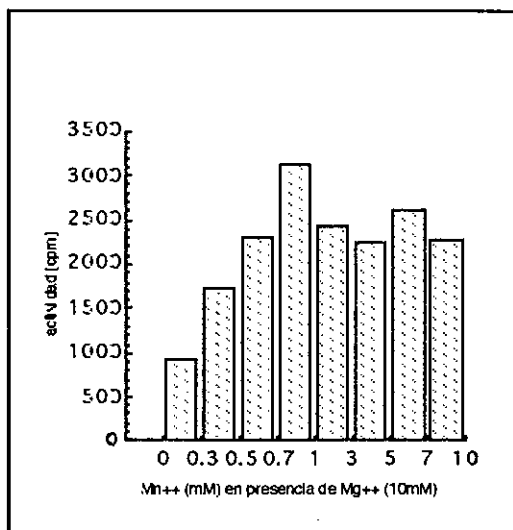
También se determinó si el  $Ca^{2+}$  posee algún efecto modulador sobre la actividad quinasa. Por lo tanto, se midió actividad en diferentes condiciones, tal como se muestra en la figura 18 a. En presencia de  $Ca^{2+}$  solamente, la enzima no tiene actividad (línea 4).

Sin embargo, en presencia de  $Mn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (línea 5) se observa un leve efecto estimulador con respecto a la actividad en iguales condiciones pero en ausencia de  $Ca^{2+}$  (línea 2), a diferencia de lo que ocurre en presencia de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (línea 6), donde el efecto estimulador es significativo con respecto a la actividad observada en presencia de  $Mg^{2+}$  únicamente (línea 3), obteniéndose valores de actividad similares a los observados en presencia de  $Mn^{2+}$  únicamente (línea 2).

A -



B-



C-

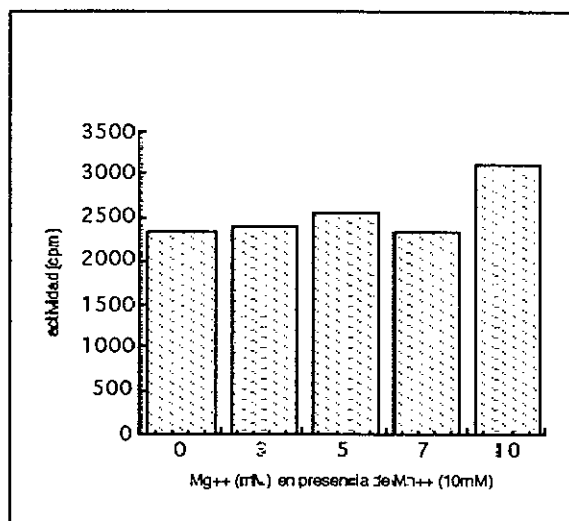


Figura 18- Requerimiento de cationes.

La actividad de PKTc se ensayó tal como se describe en materiales y métodos , variando los cationes y sus concentraciones en cada caso.

A- Efecto de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la actividad.

1) 10mM  $\text{Mg}^{2+}$  / 10mM  $\text{Mn}^{2+}$  ; 2) 10 mM  $\text{Mn}^{2+}$ ; 3) 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  ; 4) 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  ; 5) 10 mM  $\text{Mn}^{2+}$  / 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  ; 6) 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  / 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  ; 7) 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  / 10mM  $\text{Mn}^{2+}$  / 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

B- Medición de actividad a 10mM  $\text{Mg}^{2+}$  y 0 , 0.3, 0.5, 0.7, 1 , 3, 5, 7, y 10 mM  $\text{Mn}^{2+}$ .

C- Medición de actividad a 10mM  $\text{Mn}^{2+}$  y 0, 3, 5, 7 y 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ .

Nota: 10CC cpm equivalen a 0.002 pmoles de  $\text{P}^{32}$  incorporado/min

### 2.3. Efecto del pH y la temperatura

El valor óptimo de pH para la actividad quinasa se encuentra en el rango entre 6-8. La temperatura óptima es de 37 °C

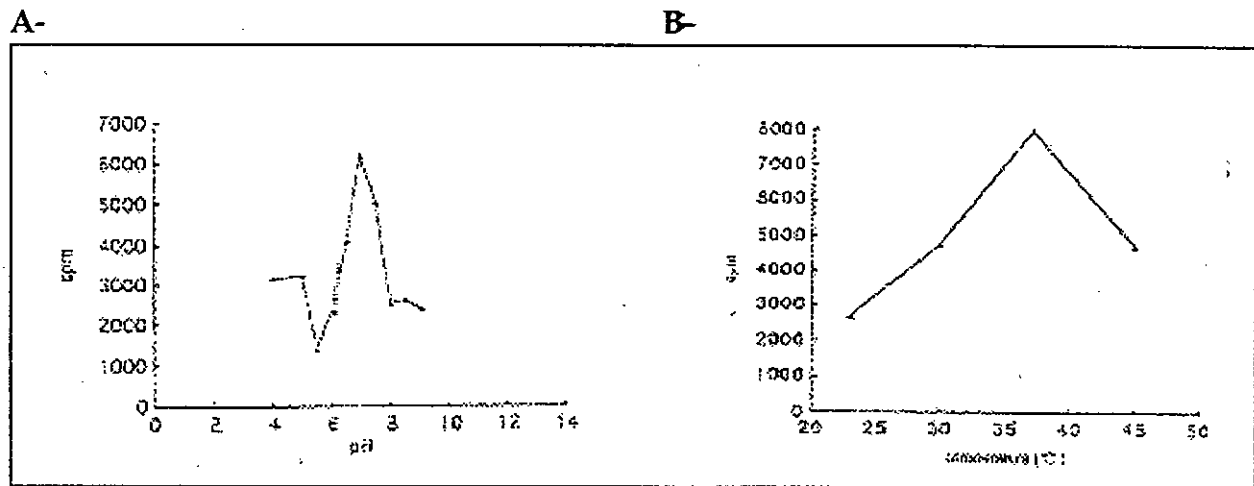


Figura 19 - Curva de pH y temperatura

A) pH. La actividad quinasa fue medida cambiando los buffers y el pH según el caso. Buffers usados : Acetato 50 mM pH 4,0 - 5,0, Tris-maleato 50 mM pH 5,5 - 6,0 - 6,5, Hepes-NaOH 50 mM pH 7,0 - 7,5, Tris-HCl 50 mM pH 8,0 - 8,5 - 9,0.

B) Temperatura. La actividad se midió a diferentes temperaturas: 23, 30, 37, 45 °C durante 15 min.

Nota: 1000 cpm equivalen a 0.002 pmoles de  $P^{32}$  incorporados/min.

## 2.4. Efecto de moduladores

Se estudió el efecto de varios moduladores de la actividad en diferentes proteínas quinasas :

- estimuladores

CaM (3,5  $\mu$ g) / Ca<sup>2+</sup> (concentraciones crecientes)

- inhibidores

PKI (inhibidor específico de PKA cAMP dependiente)

Staurosporina (inhibidor de amplio rango de Ser/Thr quinasas)

H7 y GF (inhibidores específicos de PKC)

El complejo Ca<sup>2+</sup>/CaM, no mostró tener algún efecto estimulador sobre la actividad (figura 20 a).

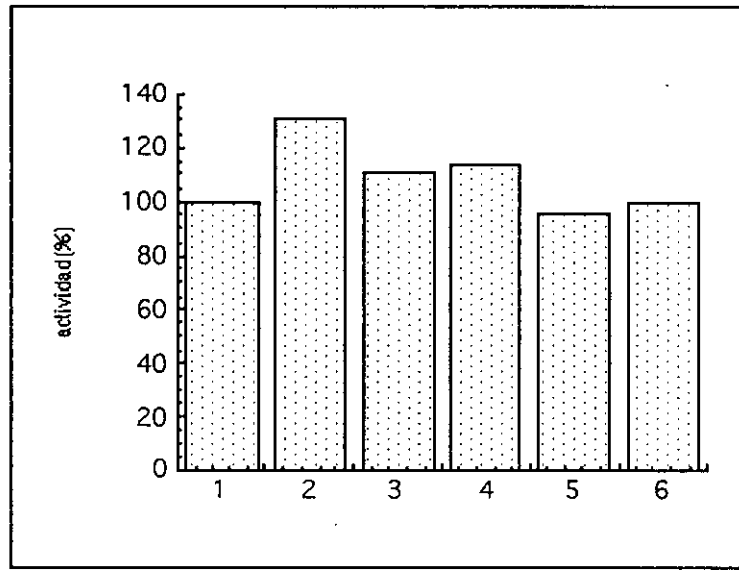
En cuanto al efecto de los inhibidores tanto PKI como la staurosporina logran inhibir la actividad entre un 30 y un 40%, a diferencia de H7 y GF los cuales no ejercen efecto inhibitorio (figura 20 b).

Los efectos inhibitorios no se consideran significativos en relación al efecto que ejercen estos inhibidores sobre sus sustratos específicos. La staurosporina inhibe la actividad de la PKC de *T. cruzi* (Gómez *et al.*, 1989) en un 40% a una concentración de 3 nM, a diferencia de la PKTc que para ser inhibida en igual proporción requiere de una concentración de inhibidor 6 veces mayor (20 nM).

Con respecto al PKI, su efecto es menor aún pues una concentración de 8,5 nM es necesaria para inhibir a la PKA porcina en un 30 % (Slice *et al.*, 1988) mientras que para obtener el mismo porcentaje de inhibición de la PKTc se requiere una concentración de inhibidor de 400 nM.



A-



B-

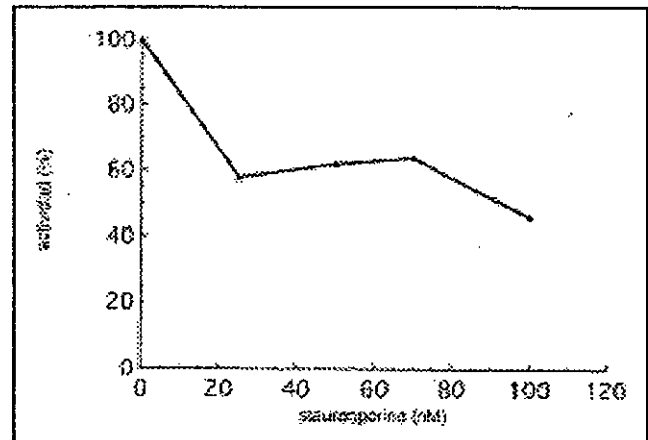
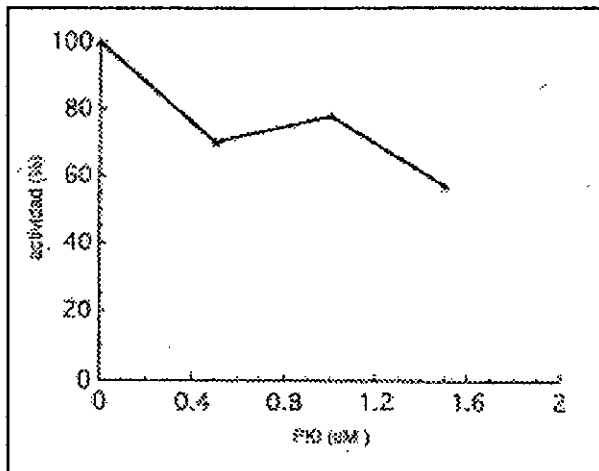


Figura 20 - Efecto de algunos moduladores.

A) Efecto del agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  (en diferentes concentraciones) y CaM (3,5  $\mu\text{g}$ ) sobre la actividad enzimática

1) Control sin  $\text{Ca}^{2+}$ / CaM; 2) 0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ / CaM; 3) 0.3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ / CaM; 4) 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM; 5) 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ / CaM; 6) 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ / CaM.

B) Efecto de algunos inhibidores sobre la actividad

PKI (Inhibidor de proteína quinasa A): 0 - 0,5 - 1 - 1,5  $\mu\text{M}$

Staurosporina : 25 - 50 - 75 - 100 nM

## 2.5. ATP como dador de fosfatos

Medición de la actividad en presencia de una cantidad constante de ATP marcado y concentraciones crecientes de GTP no radioactivo nos muestran que la enzima sólo es capaz de tomar fosfatos del ATP pues la cantidad de [<sup>32</sup>P] incorporado no disminuyó con el agregado de cantidades crecientes de GTP no radioactivo.

Tabla V . ATP usado como dador de fosfatos

Se midió actividad kinasa usando 1,5  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP ( $2 \times 10^4$  cpm/pmol) y cantidades crecientes de GTP no radioactivo.

GTP ( $\mu$ M)	actividad (cpm)
control	2052
0.5	2280
1	2228
1.5	2270
2	2003
3	1997
5	2009

## 2.6. Estudios cinéticos

Se examinó el efecto de la concentración del ATP (0.5, 1.5, 3.5, 5  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad quinasa y el  $K_m$  se calculó según el gráfico de las recíprocas ( $1/v$  vs.  $1/s$ ) (figura 21). El  $K_m$  calculado para el ATF es de 1,6  $\mu\text{M}$ . Las condiciones de ensayo fueron seleccionadas de tal manera que la actividad enzimática tuviera una dependencia lineal con el tiempo de incubación y la concentración de enzima .

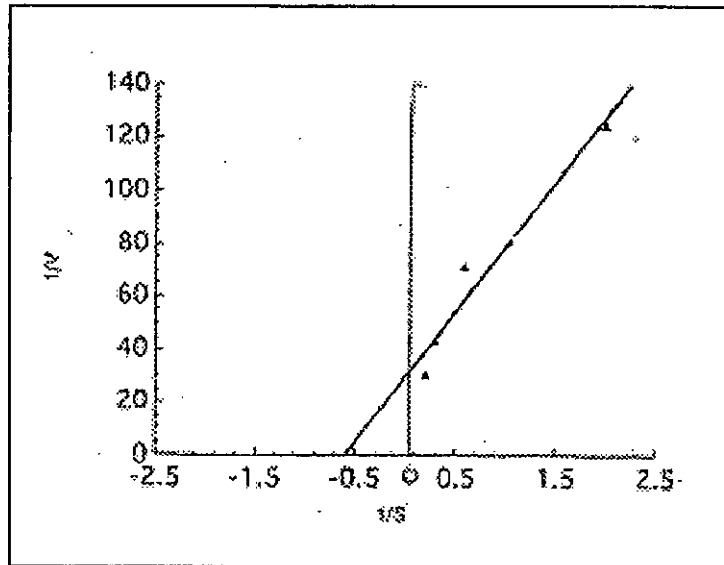


Figura 21- Cálculo del  $K_m$  para el ATP. Gráfico de Lineweaver- Burk ( $1/v$  vs.  $1/s$ ) de los datos cinéticos

El valor de  $K_m$  obtenido en este caso es inferior con respecto al  $K_m$  para el ATP calculado para otras proteínas quinasas de parásitos.

Ejemplos:

	Km ATP ( $\mu\text{M}$ )	
PK soluble ( <i>L. donovani</i> )	60	(Banerjee & Sarkar, 1990)
PKA ( <i>T. cruzi</i> )	40	(Ulloa <i>et al.</i> , 1988)
PK RAC homóloga ( <i>E.histolytica</i> )	80	(Que <i>et al.</i> , 1991)

## 2.7. Análisis de fosfoaminoácidos

Del análisis de la secuencia de la PKTc surge que esta proteína pertenecería al grupo de las Ser/Thr quinasas.

Para demostrarlo, se determinaron los aminoácidos que son fosforilados por esta enzima (Ser, Thr o Tyr) en función de una propiedad química que presentan las uniones P-Ser y P-Thr que las diferencia de las P-Tyr: la labilidad en medio básico (Martensen, 1984). Los resultados de la Tabla VI nos muestran que efectivamente la unión O-fosfato en este caso es del tipo P-Ser y/o P-Thr debido a su labilidad en medio básico.

Tabla VI- Estudio de la labilidad en medio básico de las uniones O-fosfato

tiempo (min)	cpm
0	1587
10	1130
20	777
30	295

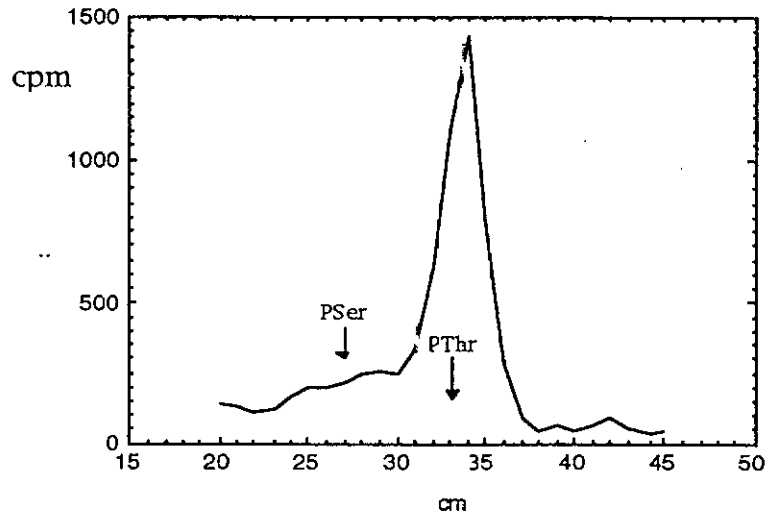
La histona H4S fosforilada, fue precipitada con ácido tricloroacético 20%. El pellet fue resuspendido en NaOH 1 N en hielo, e incubado a 37 °C. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos (0-10-20-30 min) y se neutralizaron con igual volumen de HCl 1 N. Se precipitó y contó la radiactividad (cpm) en el pellet.

Posteriormente, para determinar si la Thr y la Ser son fosforilados del mismo modo, los sustratos fosforilados fueron sometidos a una hidrólisis ácida y los productos separados por una cromatografía en papel junto con estándares de P-Ser y P-Thr (figura 22).

Como resultado, se observa que la PKTc fosforila únicamente Thr, aminoácido que también es fosforilado durante el proceso de autofosforilación.

No se detectan picos correspondientes a P-Ser en ningún caso.

A-



B-

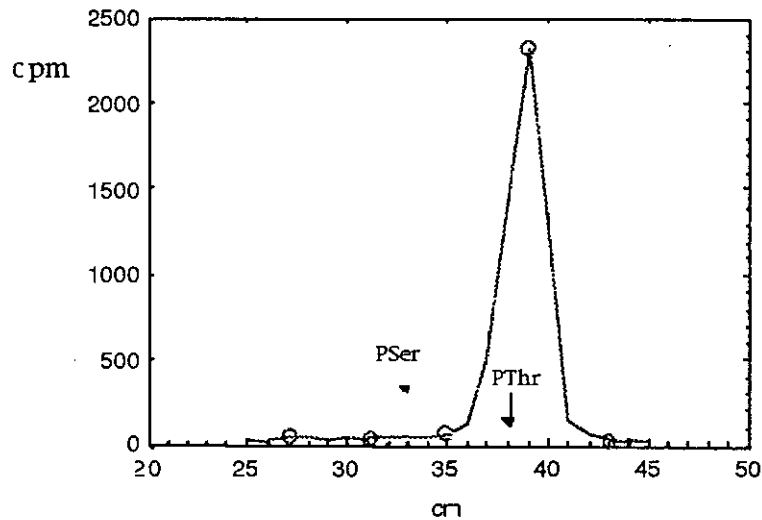


Figura 22- Cromatografía en papel.

La histona IIAS o la PKTc fueron fosforilados usando  $[g-^{32}P]$ -ATP y sometidos a una hidrólisis ácida fuerte durante 90 min a 100 °C. Las muestras se sembraron en papel Whatmann 1 y se resolvieron en los siguientes solventes: Acetato de etilo/piridina/ácido acético/agua (5:5:1:3).

Los marcadores P-Ser y P-Thr se revelaron con una solución de ninhidrina.

A: PKTc; B: histona IIAS.

### 3- Identificación de PKTc in vivo

#### 3.1. Inmunolocalización en un extracto crudo de *T. cruzi*

Epimastigotes de *T. cruzi* fueron congelados y descongelados 3 veces y resuspendidos en buffer A con inhibidores de proteasas y Tritón X-100 0,5% (ver materiales y métodos). Luego de incubar a 0 °C durante 30 min y centrifugar, se obtuvieron 2 fracciones: citosólica y particulada. Estas se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron a Inmobilon para realizar un Western blot, usando un anticuerpo policlonal antiPKTc.

Como se observa en la figura 23, el anticuerpo reconoce una proteína de 46 kDa (tamaño que se correlaciona aproximadamente con el de la proteína recombinante) en la fracción particulada, es decir, en la fracción de membranas. Este resultado indica que la PKTc está asociada a membranas.

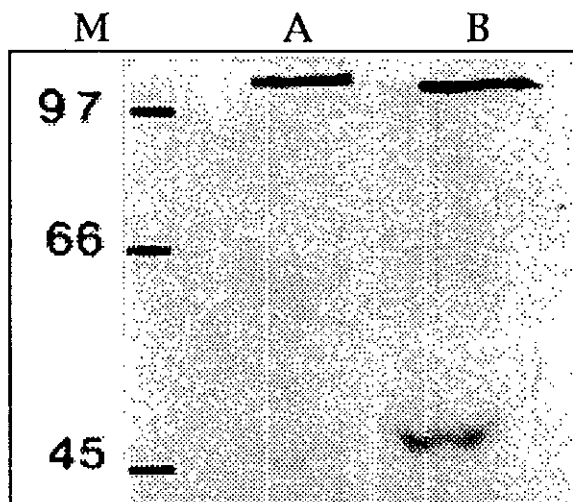


Figura 23- Western blot.

Epimastigotes de *T. cruzi* fueron incubados durante 1 h a 0 °C en buffer A con inhibidores de proteasas y Tritón X-100 0.5% y se ultracentifugaron por 10 min, obteniéndose dos fracciones: citosólica y particulada. Anticuerpo usado: anti PKTc (dilución 1:1000).

Calle A : fracción citosólica; calle B : fracción particulada; M: marcadores de masa molecular (kDa).

### 3.2. Localización subcelular

Para determinar la posible localización subcelular de la PKTc, epimastigotes de *T. cruzi* se rompieron con carburo de silicio (tal como se describe en materiales y métodos) y al lisado se lo sometió a una centrifugación diferencial a 1100, 5000, 14500 y 105000 g obteniendo así las siguientes fracciones:

nuclear, gránulos grandes, gránulos pequeños, microsomal y soluble. Estas fracciones fueron utilizadas en un Western blot.

Como resultado (figura 24) se observa que la PKTc se localiza en las fracciones correspondientes a gránulos pequeños y grandes (SG y LG). Estas fracciones están enriquecidas en distintas organelas como mitocondria, glicosomas, flagelo y restos de membrana plasmática.

Por lo tanto, este resultado sería una evidencia más de que la PKTc no es una proteína soluble sino que está asociada a membranas.

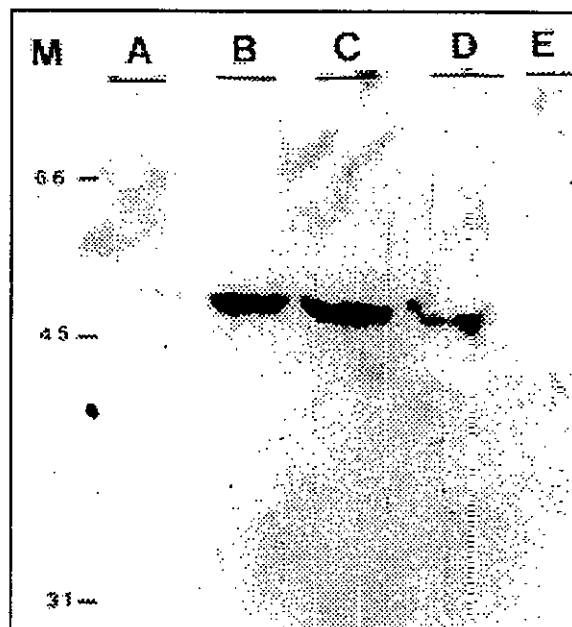


Figura 24- Localización subcelular. Análisis por Western blot

Epimastigotes de *T. cruzi* se rompieron con carburo de silicio y al lisado se lo sometió a una centrifugación diferencial (ver materiales y métodos). En cada calle se sembró igual cantidad de proteína (120 µg).

Calle A: fracción nuclear; calle B: gránulos grandes; calle C: gránulos pequeños; calle D: fracción microsomal; calle E: fracción soluble; M: marcadores de masa molecular (kDa).

#### 4-Characterización del tipo de anclaje de la PKTc a membrana

De acuerdo al perfil de hidropatía, esta proteína carece de dominios hidrofóbicos que puedan llegar a constituir potenciales dominios transmembrana (figura 9 a). Esto nos hace suponer que la proteína debería estar unida a membrana a través de algún tipo de ancla.

Estas "anclas" podrían estar constituidas por:

1) una proteína. Recientemente han sido descubiertas proteínas que funcionan como anclas para otras proteínas kinasas llamadas AKAP's (A kinase anchoring proteins) o RACK's (receptors for activated C kinases) (Mochly-Rosen, 1995).

2) un lípido (Casey, 1995).

3) una molécula de GPI (glicofosfatidilinositol), tipo de ancla muy común para varias proteínas de membrana en *T. cruzi*, como aquellas que pertenecen a la familia de superantígenos de superficie SAPA (Agusti et al., 1997)

Esta última posibilidad fue descartada, debido a la ausencia de un péptido señal en el extremo N-terminal de la PKTc que es una secuencia necesaria para que la proteína pueda entrar al EE y sufrir dicha modificación postraduccional.

##### 4.1. La PKTc no está asociada a una proteína de membrana

Las fracciones donde se inmunolocalizó a la proteína (gránulos grandes y gránulos pequeños) se resuspendieron en carbonato de sodio 100 mM (pH 11.0).

Se conoce en estas condiciones, que es posible lograr la separación de proteínas integrales de membrana de proteínas periféricas (Fujiki et al., 1982).



Luego de una incubación de 30 min en hielo se ultracentrifugó a 35000 g por 10 min y las fracciones obtenidas (pellet y sobrenadante) se analizaron por Western blot.

Como se observa en la figura 25, la proteína está presente en el pellet, lo cual indica que no estaría unida a la membrana a través de otra proteína.

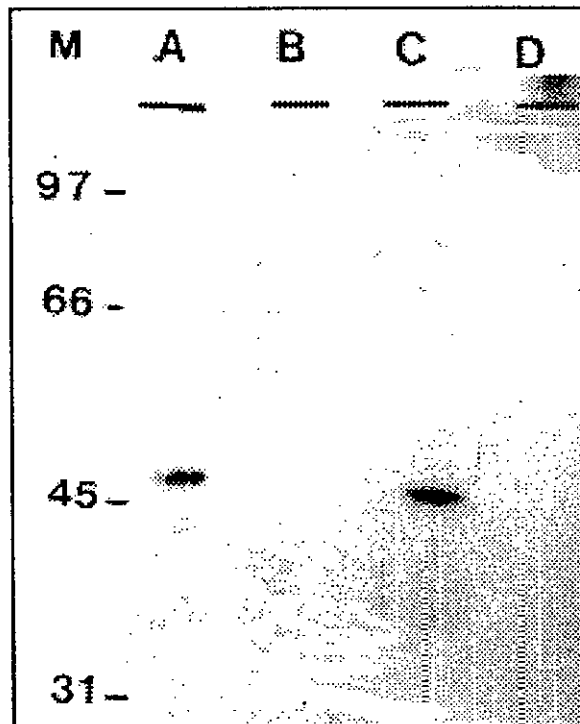


Figura 25 - PKTc no está asociada a otra proteína de membrana.

Las fracciones gránulos grandes y pequeños (LG y SG) se incubaron en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100mM (pH 11,0) y ultracentrifugaron (ver materiales y métodos). Las fracciones obtenidas se resolvieron en SDS-PAGE 10%, transfirieron a Inmobilon e incubaron con antiPKTc (dilución 1:1000).

Calle A: fracción insoluble SG; calle B: fracción soluble SG; calle C: fracción insoluble LG; calle D: fracción soluble LG; M: marcadores de masa molecular (kDa).

## 4.2. PKTc está unida a membrana a través de un ancla lipídica

Las fracciones LG y SG fueron, sometidas a una partición en Tritón X-114/agua (ver materiales y métodos).

Las fases acuosa y detergente se separaron en SDS-PAGE y se analizaron por Western blot (figura 26 a).

La PKTc se detectó en la fase detergente, lo cual indicaría que estaría unida a alguna molécula que le confiere carácter hidrofóbico, como un lípido.

Muchas proteínas quinasas o miembros de las cascadas de transducción de señales, sufren modificaciones postraduccionales, como prenilación, farnesilación, miristilación o palmitoilación (Gelb, 1997). En la mayoría de los casos estos lípidos acoplados cumplen función de anclas de membrana.

Determinados aminoácidos funcionan como blancos para la unión de distintos tipos de lípidos y estos lípidos estarían unidos covalentemente (Casey, 1995).

Las proteínas miristoiladas llevan en el extremo amino terminal, una molécula de ácido mirístico unida a través de una unión amida a una Gly ubicada en posición 2 con respecto a la Met inicial.

Durante la prenilación, 1 ó 2 lípidos isoprenoides (geranylgeraniol ó farnesyl) se unen a Cys (por uniones tioéter estables) ubicadas en una secuencia consenso particular (Cys-A-A-X-COOH).

En cambio, durante la palmitoilación, el ácido palmítico se une a residuos de Cys (sin un consenso definido) por uniones tioéster lábiles.

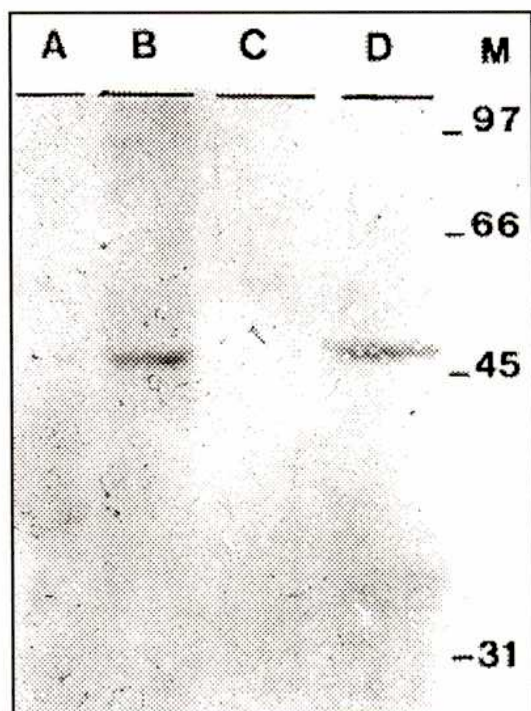
Del análisis de la secuencia aminoacídica se deduce que el ancla lipídica en la PKTc, podría estar constituida por una molécula de ácido palmítico, pues esta enzima posee 6 cisteínas que son sitios potenciales de palmitoilación.

Para comprobarlo se incubó a la fracción LG (gránulos grandes) en buffer C con hidroxilamina 1 M, a pH neutro (materiales y métodos), condiciones bajo las cuáles se logran hidrolizar solamente las uniones tioéster lábiles entre las cisteínas y el ácido palmítico, a diferencia de lo que ocurre con los O-ésteres, los cuáles sólo pueden ser hidrolizados a pH altamente básico (Pepperberg *et al.*, 1995).

Luego de la incubación durante 60 min en hielo y ultracentrifugar a 35000 g por 10 min, se obtienen dos fracciones (P y S) las cuales fueron separadas en SDS-PAGE..

El Western blot revela (figura 26 b) que gran parte de la PKTc está presente en la fracción soluble. Esto indicaría que en este caso el ancla lipídica estaría constituida por ácido palmítico.

A-



B-

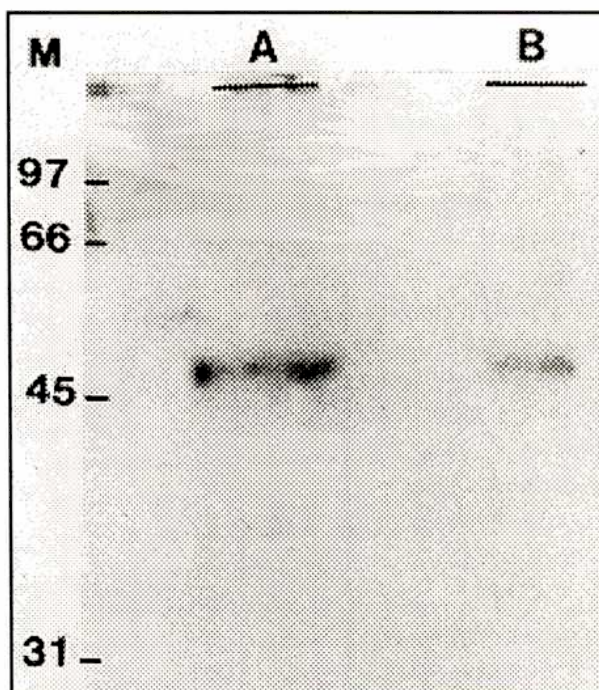


Figura 26-A) Partición Tritón X-114/agua. Las fracciones LG y SG fueron sometidas a una partición en Tritón X-114 / agua (ver materiales y métodos). Las fases acuosa y detergente de cada fracción se corrieron en un SDS-PAGE 10% y se realizó un Western blot. Anticuerpo usado: Anti PKTc (dilución 1:1000)  
 Calle A: fase acuosa SG; calle B: fase detergente SG; calle C: fase acuosa LG; calle D: fase detergente LG.

B) Tratamiento con hidroxilamina 1M. La fracción SG fue incubada en hidroxilamina 1M a pH neutro, ultracentrifugada, las fracciones obtenidas (pellet y sobrenadante) se resolvieron en SDS-PAGE 10% y se analizó por Western blot. Anticuerpo usado: anti PKTc (dilución 1:1000).  
 Calle A: sobrenadante; calle B: pellet.

## 5- Análisis de la expresión diferencial de la PKTc en los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*

Con el fin de investigar la expresión de la proteína durante el ciclo de vida del parásito, extractos totales de *T. cruzi* en los estadios de amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, fueron utilizados para un experimento de Western blot (figura 27).

La PkTc está presente en los tres estadios sin mostrar un patrón de expresión diferencial. Esto demuestra que esta proteína sería de carácter constitutivo.

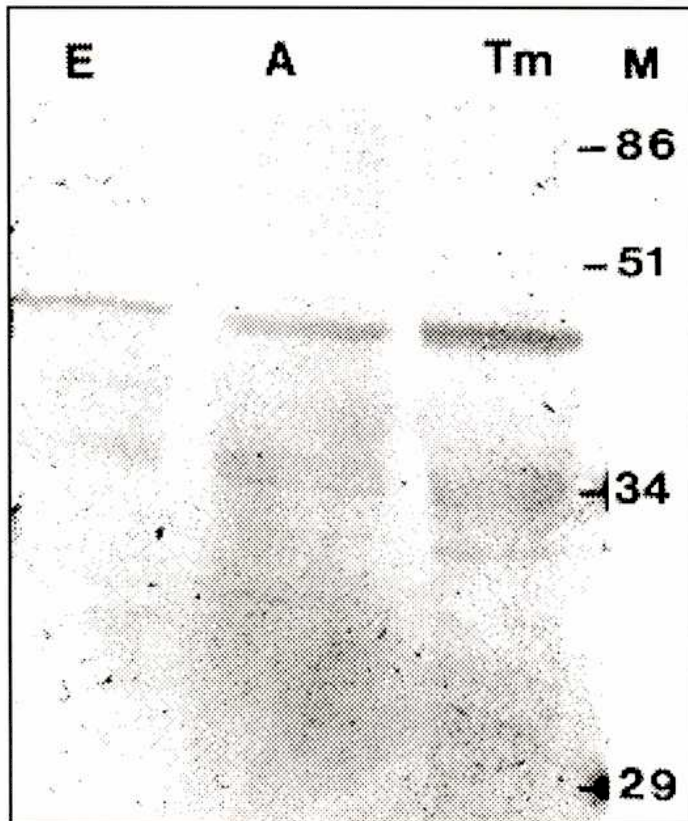


Figura 27- Western blot.

Extractos totales de *T. cruzi* en diferentes estadios del ciclo de vida.

Calle E : epimastigotes; calle A: amastigotes; calle Tm: tripomastigotes metacíclicos. En cada calle se sembró igual cantidad de proteína (100  $\mu$ g).

## *DISCUSSION*

## Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos afirmar que hemos identificado un nuevo tipo de Ser/Thr quinasa hasta ahora nunca detectada en algún tripanosomátido, que pertenecería a una familia relativamente nueva de proteínas quinasas llamadas RAC o PKB, tal como se describió en la introducción. La principal característica de este nuevo grupo de quinasas es la similitud de homología a nivel de la secuencia aminoacídica de su dominio catalítico, tanto con las PKA como con las PKC. En el caso de la proteína quinasa que nosotros detectamos en *T. cruzi*, a la cual denominamos PKTc, no parecería pertenecer a la familia de las PKC por las siguientes razones:

- Las PKC contienen secuencias ricas en Cys conservadas en la región regulatoria de la proteína, ausentes en la PkTc.
- PKC tiene una secuencia de pseudosustrato en el extremo amino terminal (X-X-Arg-Ala-Leu-X-X, donde X: aminoácidos básicos) (House & Kemp, 1987). No se encontró esta secuencia en PKTc.

Del mismo modo, parece improbable que PkTc represente algunas de las isoformas de las PKA, pues:

- La PKTc tiene un promedio de 100 aminoácidos en el extremo amino terminal que la diferencia de las PKA, que poseen un promedio de 42 aminoácidos en esta región, teniendo en cuenta que el tamaño de ambas PKs es similar (400 aminoácidos aproximadamente).
- el grado de homología entre los dominios catalíticos de las PKA es considerablemente alto (96-97%) con respecto al obtenido entre las PKA y PKTc (65%).

Otro motivo por el cual podemos clasificar a la PKTc en el grupo de las RAC quinasas es que no hemos podido inhibir su actividad significativamente con el agregado de inhibidores específicos para PKA (PKI) o para PKC (H7, staurosporina). Esto indicaría que su actividad parece ser diferente de la actividad PKA o PKC.

Al comparar la secuencia aminoacídica de la PKTc con la de otras proteínas quinasas descriptas, demostró tener máxima homología con una proteína

quinasa RAC homóloga de *D. discoideum*, organismo en el cual esta proteína está estrechamente asociada a la regulación del desarrollo (Haribabu & Dottin, 1991).

Una diferencia notable encontrada entre la secuencia aminoacídica de la PKTc y las secuencias de algunas RAC quinasas, en particular de humanos, *D. melanogaster* y *C. elegans*, es la ausencia en la región amino terminal de PKTc, de un dominio PH de homología a pleckstrina, el cual parecería constituir un dominio consenso en las regiones amino terminales de todas las proteínas de esta familia.

Sin embargo, analizando las secuencias amino terminales de las RAC quinasas encontradas en *D. discoideum* o *E. histolytica*, en estos organismos tampoco está presente este dominio PH.

Aunque no se le asignó aún un rol fisiológico determinado a esta región PH, se postuló que a través de él, las RAC quinasas de células de mamíferos se anclarían a la membrana plasmática, luego de determinar que este dominio era capaz de interactuar con los fosfolípidos de la membrana (Hemmings, 1997).

Este mecanismo sería el paso previo para la activación de las RAC quinasas. En el caso de la PKTc, es posible que el anclaje a la membrana este mediado por otro tipo de mecanismo, pues pudimos determinar que *in vivo*, esta proteína estaría unida a una membrana a través de un ancla lipídica, posiblemente ácido palmítico ya que pudo ser liberada de la membrana luego del tratamiento con hidroxilamina a pH neutro, mecanismo por el cual es posible clivar las uniones tioéster.

A su vez, si analizamos la secuencia proteica de la PKTc, es posible identificar 6 cisteínas, que constituyen potenciales sitios de palmitoilación, en particular, las 2 cisteínas ubicadas en la región carboxilo terminal.

El anclaje de esta proteína en particular, a la membrana a través de este mecanismo, como paso previo a la activación, no sería atípico pues existen varios ejemplos de proteínas quinasas que regulan sus estados de activación de acuerdo al grado de palmitoilación (Milligan *et al.*, 1995). Esto es posible debido a que la unión entre las moléculas de ácido palmítico y la proteína son uniones tioéster lábiles lo que le confiere la propiedad de ser reversibles, razón por la cual las células pueden controlar los estados de palmitoilación. La maquinaria molecular involucrada no ha sido identificada

aún pero existen evidencias de las enzimas que catalizan los procesos de acople y remoción del lípido (Casey, 1995).

Un ejemplo es lo que sucede con los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos acoplados a la proteína G. En este caso, la depalmitoilación del receptor se correlaciona con un desacople de la activación de la proteína G y un aumento de la fosforilación basal, resultando en una rápida desensibilización del receptor (Moffet *et al.*, 1993).

En contraste, la rodopsina, receptor acoplado también a proteína G, al encontrarse depalmitoilada estimula la activación de la proteína G (Morrison *et al.*, 1991).

La palmitoilación es un proceso que ocurre en organismos de distintos niveles de complejidad, desde virus y levaduras a células de mamíferos y humanos (Grand, 1989). En tripanosomátidos, hasta ahora sólo se ha identificado en *T. brucei* una proteína de unión a los microtúbulos que estaría palmitoilada (Schneider *et al.*, 1988).

Es importante destacar que este tipo de unión a membrana no ha sido descrito aún en ninguna proteína de *T. cruzi*. Se han encontrado anclas de GPI en proteínas de superficie como las proteínas de la familia de superantígenos de superficie SAPA (Agusti *et al.*, 1997).

Con respecto a lo que ocurre en relación a su expresión, y teniendo en cuenta la estrecha asociación de la expresión de estas proteínas con el desarrollo y la diferenciación en eucariotes inferiores como *D. discoideum* o *E. histolytica*, realizamos experimentos de Western blot para estudiar que ocurre en *T. cruzi*. Como resultado, pudimos determinar que PKTc está presente en todos los estadios del parásito sin mostrar un patrón de expresión diferencial, por lo que se deduce que sería una proteína de carácter constitutivo y que a diferencia de lo que ocurre en otros organismos esta enzima no estaría asociada a los procesos de diferenciación pero sería importante para la vida del parásito.

Con respecto a sus propiedades bioquímicas, uno de los rasgos característicos es que ninguno de los segundos mensajeros ensayados como  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}/CaM$  tuvieron efecto alguno sobre la actividad de la enzima. Esto, junto con el resultado obtenido luego del ensayo de diferentes inhibidores nos da la pauta de que la enzima debe formar parte de una vía



de transducción de señales particular. Esta vía ha sido dilucidada parcialmente para las RAC quinasas en células de mamíferos y en la cual los inositol fosfatos funcionarían como segundos mensajeros para algunas proteínas quinasas de la vía (Hemmings, 1997).

Otra característica interesante, es su dependencia de la presencia del  $Mn^{2+}$  para tener actividad, a diferencia de la gran mayoría de las proteínas quinasas descritas en general, y en particular en *T. cruzi*. que requieren  $Mg^{2+}$ . Está descrito que el ATP puede acoplarse tanto al catión  $Mg^{2+}$  como al catión  $Mn^{2+}$  para formar el complejo binario que posteriormente se unirá al dominio catalítico de la proteína.

Para poder corroborar si esto ocurre con la enzima *in vivo*, sería necesario purificar la proteína a partir del parásito.

Otras de las características bioquímicas que demostró tener PKTc :

- Es capaz de fosforilar en diferente grado, sustratos usados normalmente para ensayos de actividad quinasa, siendo la histona H4 el mejor sustrato.

- Aparentemente, es capaz de usar solamente ATP como dador de grupos fosfatos.

- Con respecto al tipo de aminoácidos que la PKTc es capaz de fosforilar en el sustrato aceptor, pudimos verificar a partir del análisis de su secuencia aminoacídica que sería específica para la fosforilación de Ser y Thr. Sin embargo, a través del análisis de los fosfoaminoácidos en los sustratos aceptores, pudimos solamente detectar fosfotreonina en todos los casos, lo cual parece demostrar su especificidad por el agregado de fosfatos a Thr únicamente.

- Es capaz de autofosforilarse. Esto quedó demostrado al incubar PKTc con  $[\gamma-^{32}P]$ -ATP en ausencia de un aceptor exógeno y el posterior análisis de los fosfoaminoácidos. Como resultado, observamos que la enzima se autofosforiló en residuos de Thr.

Esta propiedad intrínseca ha sido descrita para la mayoría de las proteínas quinasas.

No existe una regla general que determine su función pero se postula que la autofosforilación constituiría un mecanismo de regulación autóloga; esto es de autoactivación, como es el caso del receptor de insulina (Rosen *et al.*, 1983) o un mecanismo de control negativo.

En el caso de la PKTc, aparentemente la enzima se fosforila sólo en ausencia de sustrato exógeno.

Es importante aclarar que no existen suficientes antecedentes con respecto al comportamiento bioquímico de esta familia de quinasas, excepto para el caso de la proteína RAC homóloga de *E. histolytica*, enzima con la que comparte determinadas características bioquímicas como su dependencia de la presencia del catión  $Mn^{2+}$  para su actividad, los valores óptimos de pH y temperatura o el efecto de la presencia de determinados activadores e inhibidores (Que *et al.*, 1991)

Sin embargo, recientemente se ha propuesto la vía de transducción de señales de la cual formarían parte las RAC quinasas en mamíferos.

Este modelo propone que la unión de un factor de crecimiento a su respectivo receptor, promueve la activación de la PI3 quinasa como consecuencia de la autofosforilación del receptor Tyr quinasa. La PI3 quinasa en la membrana transforma PI(4,5)P2 en PI(3,4,5)P3. La PKB sería transportada a la membrana, se uniría a los fosfolípidos de la membrana a través de su dominio PH, sufriría un cambio conformacional y sería fosforilada por la quinasa PDK1, para posteriormente, ser liberada para fosforilar sus sustratos específicos.

Finalmente, se inactivaría por defosforilación, llevada a cabo por la fosfatasa de proteínas (PP2A) (Marte & Downward, 1997).

Por lo tanto, en función de estos datos sería interesante en el futuro, poder dilucidar si existe una vía de transducción similar en *T. cruzi*. Para ello, se realizarán experimentos con el objetivo de identificar los mecanismos de activación/desactivación de PKTc *in vivo* y el sistema de segundos mensajeros involucrado en su regulación. Estos resultados nos darán información de su rol *in vivo*.

## *BIBLIOGRAFIA*

- Agusti, R., Couto, A. S., Campetella, O. E., Frasch, A. C. C. y Lederkremer, R. M. (1997) *Glycobiology* 7, 731-735.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. y Hemmings, B. A. (1996) *EMBO. J.* 15, 6541-6551.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. y Cohen, P. (1997) *Cur. Biol.* 7, 261-269.
- Andjelkovic, M., Jones, P., Grossniklaus, U., Cron, P., Schier, A., Dick, M., Bilbe, G. y Hemmings, B. A. (1995) *J. Biol. Chem* 270, 4066-4075
- Andjelkovic, M., Jacobowicz, I., Cron, P., Ming, X., Han, J. W. y Hemmings, B. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 5699-5704.
- Ausubel, F. M., Bent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1994) *Currents Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Scns, Inc*; Vol. 1, capítulos 2.9, pág. 2.9.1-2.9.6; 4.9, pág. 4.9.1-4.9.8
- Banerjee, C. y Sarkar, D. (1992) *Mol. Biochem. Parasitol.* 52, 195-206.
- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P. y Tschlis, P. N. (1991) *Science* 254, 274-277.
- Benaim, G., Szago, V. y Cornivelli, L. (1987) *Acta. Cient. Venez.* 38, 289-291.
- Bos, J. L. (1995) *Trends Biol. Sci.* 20, 441-442.
- Brenner, Z. (1973) *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 347-380.
- Brown, L., Hines, J. C. y Ray, D.S. (1992) *Nucleic Acid Res.* 20, 5451-5456.
- Burgering, B. M. T. y Coffey, P. J. (1995) *Nature* 376, 599-602.
- Casey, P. J (1995) *Science* 268, 221-225.
- Cazzulo, J. J, Franke de Cazzulo, B. M, Engel, J. C. y Cannata, J. J. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 329-334.
- Coffey, P. J y Woodgett, J. R. (1991) *Eur. J. Biochem.* 201, 475-481.
- Collet, M. S., Purchio, A. F. y Erikson, R. L. (1980) *Nature* 285, 167-169.

- Coso, O. A., Díaz Añel, A., Martinetto, H., Muschietti, J. P., Kazanietz, M. G., Fraidenraich, D., Torres, H. N y Flawiá, M. M. (1992) *Biochem. J* 287, 443-446.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovic, M. y Hemmings, B. A. (1995) *Nature* 378, 785-789.
- Das, S., Saha, A .K., Renally, A. T., Glew, R. H., Dowling, J. N., Kajiyoshi, M. y Gottlieb, M. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 143-153.
- De Gunzburg, J., Franke, J. J, Kessin, R. H. y Veron, M. (1986) *EMBO J.* 2, 363-367.
- Docampo, R. y Pignataro, O. P. (1991) *Biochem. J.* 275, 407-411.
- Eisenchlos, C., Flawiá, M. M, Torruella, M. y Torres, H. (1986) *Biochem. J.* 236, 185-191.
- Ek, B., Weslermark, B., Wateson, A. y Heldin, C. H. (1982) *Nature* 295, 419-420.
- Erondy, N. E. y Donelson, J. E (1991) *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 303-314.
- Flawiá, M. M, Téllez-Iñon, M. T. y Torres, H. N. (1997) *Parasitology Today* 13, 30-33.
- Franke, T. F., Yang, S., Chan, T., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D., Kaplan, D. y Tschlis, P. N. (1995) *Cell* 81, 727-736.
- Frech, M., Andjelkovic, M., Ingley, E., Kishta-Redoy, K., Falck, J. R. y Hemmings, B. A. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 8474-8481.
- Fujiki, Y, Hubbard, A. L., Fowler, S. y Lazarow, P. B. (1982) *J. Cell. Biol* 93, 97-102.
- Gelb, M. H (1997) *Science* 275, 1750-1751.
- Gómez, M. L., Erijman, L., Arauzo, S., Torres, H. N. y Téllez-Iñon, M. T. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 101-108.
- Grand, R. J. A. (1989) *Biochem. J.* 258, 625-638.

- Hanks, S. K (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 388-392.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. y Hunter, T. (1988) *Science* 241 , 42-52
- Hanks, S. K., Hunter, T. (1995) *FASEB J.* 9, 576-596.
- Haribabu, B. y Dottin, R. P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 1115-1119.
- Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S. y Fesik, S. W. (1994) *Nature* 371, 168-170.
- Haslam, R. J., Koide, H. y Hemmings, B. A (1993) *Nature* 363, 309 -310.
- Hemmings, B. A. (1997) *Science* 275, 628-630.
- Hemmings, H. G., Nairn, A. C., McGuinness, T. L., Haganir, R. L. y Greengard, P. (1989) *FASEB J.* 3, 1583-1592.
- House, C. y Kemp, B. E. (1987) *Science* 238, 1726-1728.
- Hunter, T. y Sefton, B. M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1311-1315.
- Hunter, T. y Cooper, J. A. (1981) *Cell* 24, 741-752.
- Hunter, T. y Cooper, J. A. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* 54, 897-930.
- Jones, P., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F. y Hemmings, B. A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4171-4175.
- Jones, P., Jacobowicz, T. y Hemmings, B.A (1991) *Cell Regulation* 2, 1001-1009.
- Kasuga, M., Zick, Y., Blithe, D. L., Crettaz, M. y Kahn, C. R. (1982) *Nature* 298, 667-669.
- Keith, F., Hide, G. y Tait, A. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 430, 107-116.
- Kohn, A. D., Takeuchi, F. y Roth., R. A. (1996) *J. Biol. Chem* 271, 21920-21926.
- Konishi, H, Shinomura, T., Kuroda, S., Ono, Y. y Kikkawa, U. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 817-825.
- Laird, P. W (1989) *Trends Genet.* 5, 204-208.

- Lee, M. G. y Nurse, P. (1986) *Trends Genet.* 4, 287-290.
- Lee, M. G., Norbury, C. J., Spurr, N. K. y Nurse, P. (1988) *Nature* 333, 676-679.
- Lowry, O. H, Rosenbrough, N. J, Farr, A. L. y Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Marte, B. M. y Downward, J. (1997) *Trends Biochem. Sci.* 9, 355-358.
- Martensen, T. M (1984) *Meth. Enzymol.* 107, 3-22.
- Milligan, G., Parenti, M. y Magee, A. (1995) *Trends Biochem. Sci.* 20, 181-186.
- Mochly-Rosen, D. (1995) *Science* 268, 247-250.
- Moffet, S., Mouillac, B., Bonin, H. y Bouvier, M. (1993) *EMBO J.* 12, 349-356.
- Moriya, S., Kazlauskas, A., Akimoto, K., Hirai, S., Mizuno, K., Takinawa, T., Fukui, Y., Watanabe, Y., Ozaki, S. y Ohno, S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 151-155.
- Morrison, D. F., O'Brien, P. J. y Pepperberg, D. R. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 20118-20123.
- Mottram, J. C, Kinnaird, J., Shiels, B., Tait, A. y Batty, J. D (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 21044-21051.
- Nakanishi, H., Brewer, K. A. y Exton, J. H. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 13-15.
- Nairn, A. C., Hemmings, H. C. y Greengard, P. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* 54, 931-976.
- Nishizuka, Y. (1988) *Nature* 334, 661-665.
- Ogueta, S. B., Solari, A. y Téllez-Iñon, M. T. (1994) *FEBS Lett.* 337, 293-297.
- Orr, G. A., Tanowitz, H. B. y Wittner, M. (1992) *Exp. Parasitol.* 74, 127-133.

- Paveto, C., Pereira, C., Espinosa, J., Montagna, A. E., Farber, M., Flawiá, M. M. y Torres, H. N. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 16576-16579.
- Pepperberg, D. R., Morrison, D. F. y O'Brien. P. J (1995) *Meth. Enzymol.* 250, 348-361.
- Que, X, Samuelson, J. y Reed, S. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* 60, 1161-170.
- Rosen, O. M., Herrera, R., Olowe, Y., Petruzzelli, L. M. y Cobb, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3237-3240.
- Ruben, L., Egwagu, C. y Patton, C. L. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 758, 104-113.
- Ruben, L. y Patton, C. L. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 17, 331-341.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual . 2<sup>nd</sup> edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol 2, Cap.12, pág. 12.26.
- Shaw . G. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*195, 1145-1151.
- Schem (1989) *Biotechnology* 7, 1141-1147.
- Schenkman, S., Yoshida, N. y Cardoso de Almeida, M. L. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 29, 141-152.
- Schneider, A., Eichenberger, W. y Seebeck, T. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6472-6475.
- Shoji, S., Ericsson, L. H., Walsh, K. A., Fisher, E. H. y Titani, K. (1983) *Biochemistry.* 22, 3702-3709.
- Slice. L. W. y Taylor, S. S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 20940-20946.
- Stabel, S. y Parker, P. J. (1991) *Pharmac. Ther.* 51, 71-95.
- Taylor, S. S, Bubis, J, Toner-Webb, J., Solaswat, L. D, First, E. A., Buechler, J. A., Knighton, D.R. y Sodawski, J. (1988) *FASEB J.* 2, 2677-2685.



- Téllez-Iñon, M. T, Ulloa, R. M., Torruella, M. y Torres, H. N. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 17, 143-153.
- Tonner-Webb, J. y Taylor, S. S. (1987) *Biochemistry* 26, 7371-7378.
- Torruella, M., Flawiá, M. M., Eisenschlos, C., Molina y Vedia, L., Rubinstein, C. y Torres, H. N. (1986) *Biochem. J.* 234, 145-150.
- Uhler, M. D., Carmichael, D. F., Lee, D. C., Chrup, J. C., Krebs, E. G. y McKnight, G. S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1300-1304.
- Ulloa, R. M., Mesri, E., Esteva, M., Torres, H. N. y Téllez-Iñon, M. T (1988) *Biochem. J.* 255, 319-326.
- Voorheis, P. H. y Martin, R. B. (1982) *Eur. J. Biochem.* 123, 371-376.
- Walter, R. D. y Opperdoes, F. R. (1982) *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 287-295.
- Waterston, R., Martin, C., Craxton, M., Huynh, C., Coulson, A., Hillier, L., Durbin, R., Green, P., Shownkeen, R., Halloran, N., Hawkins, T., Wilson, R., Berks, M., Du, Z., Thomas, K., Thierry Mieg, J. y Sulston, J. (1992) *Nature Genetics* 1, 114-123.
- White, M. F. y Kahn, C. R. (1986) *Enzymes 3rd Ed.* 17, 247-310.
- Yoon, H. S., Hajduk, P. J., Petros, A. M., Olejniczk, E. T., Meadows, R. P. y Fesik, S. W. (1994) *Nature* 369, 672-675.
- Zingales, B., Carmiol, C., Abrahamsohn, P. A. y Colli, W. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 550, 233-244.