

Tesis de Posgrado

Identificación y caracterización de enzimas involucradas en la regulación de los niveles de AMPc en *Trypanosoma cruzi*

D'Angelo, Maximiliano A.

2003

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

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

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

Cita tipo APA:

D'Angelo, Maximiliano A. (2003). Identificación y caracterización de enzimas involucradas en la regulación de los niveles de AMPc en *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3565_DAngelo.pdf

Cita tipo Chicago:

D'Angelo, Maximiliano A.. "Identificación y caracterización de enzimas involucradas en la regulación de los niveles de AMPc en *Trypanosoma cruzi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3565_DAngelo.pdf

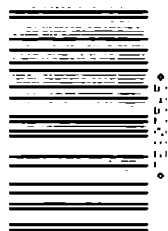
EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



TESIS
CS. QUIMICAS
3565
D'Angelo
Maximiliano A.



03565

**ad de Buenos Aires
ncias Exactas y Naturales**

**Identificación y Caracterización de Enzimas
Involucradas en la Regulación de los Niveles de
AMPc en *Trypanosoma cruzi*.**

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

Autor: Maximiliano A. D'Angelo

Director: Dra. Mirtha M. Flawiá

**Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética
y Biología Molecular
(INGEBI)**



65

2003

A mis familias, D'Angelo y Raíces, y especialmente a Oscar porque aunque hoy no estés, estás!

Agradecimientos

En primer lugar no tengo palabras suficientes para agradecer a mis padres, Ricardo y Ana. Gracias por todo!, por el apoyo! por al amor!, por la paciencia!, por siempre darme fuerzas para seguir adelante!, por los consejos!, por los viajes! Y principalmente por todo lo que me inculcaron!. Sin todo lo que me ustedes me dieron nada de esto hubiese sido posible. Los quiero tanto!! Desde lo mas profundo de mi corazón GRACIAS MA!, GRACIAS PA!, por ser los mejores padres que pude haber tenido!!!!!!

A mis hermanas Lore y Luji, por todos los momentos, las risas, las charlas, el apoyo y porque las quiero mucho. A Lo, por todos los años que vivimos juntos, los mates y los estudios compartidos, y por tantas madrugadas! A Lu, porque cambiaste mi vida, porque siempre vas a ser mi hermanita menor, por entendernos tanto y por todo lo que compartimos desde que naciste!

A mis abuelas! Gracias Perla por todo el amor que siempre nos das, gracias por las tortas, las comidas, los reglaos, el apoyo y por siempre mostrarme lo importante que es la familia. Y gracias Olga, que aunque hoy no estas acá, me dejaste mucho y siempre estas dentro de mi.

A mi familia adoptiva, los Raíces! por haberme brindado un segundo hogar y haberme tratado como si siempre hubiese sido parte de la familia, por todo el cariño, los mimos y el apoyo. A Ana, mi segunda mamá, por cuidarnos tanto!, por hacernos cosas ricas!, por ser tan dulce!, por estar cada vez que te necesitamos y porque te quiero mucho!, gracias!!

A Oscar, que lamentablemente hoy no estas, pero si estas y siempre estarás. Por todo tu apoyo! por interesarte tanto en lo que hacemos!, por los cuentos! los chistes!, por toda la alegría que te caracterizó siempre!, por hacernos siempre felices! por cocinarnos! ayudarnos!, enseñarnos! Y por sobre todo por haber construido una familia tan hermosa! Por todo lo que de vos aprendí gracias!!

A Mari!, a Mari..... que difícil agradecerte todo lo que quiero agradecerte. Por ser mi otra hermanita menor! por todos y cada uno de los momentos compartidos!, por los cumpleaños! los viajes!, por tu alegría! tu paciencia!, tu dulzura!, por cuidarnos tanto! por querernos tanto!. Por eso y por una infinidad de cosas más, gracias!. Te quiero mucho cuñadita!

Al panza!, por ser como un hermano!, por ser tan increíblemente buen tipo! por ser tan generoso!, por las hermosas palabras en la que se basa tu vocabulario! por tu alegría! tu sinceridad! Por todos los momentos compartidos y los que vendrán!!, por hacer tan feliz a Mari y a toda la familia Raíces. Por todo gracias! Y también gracias a todos los Russinyol por ser iguales a vos!, Gracias Seba, Vicki, Mumi y Pupi!

A Mar mi amor!, por haberme dado la oportunidad de conocer y ser parte de esta familia.

Gracias a Mirtha y al Doc, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por haber confiado en mí. Gracias por el apoyo y la libertad que me brindaron. Gracias por el viaje y por todo lo que aprendí en este tiempo.

Gracias al CONICET por haberme permitido realizar este trabajo.

Gracias a todos mis cumpas del lab. Gracias a Joaquín, por haberme iniciado en la ciencia, por todo lo que me enseñaste y por todo lo que aun compartimos. Gracias por el asilo en San Diego y por toda la onda! A Andre mi segunda maestra! Por la ciclasa! Las enseñanzas!, la buena onda!, la dulzura! Y la simpleza que te caracteriza!. Gracias a Cris!, la mama del laboratorio, por tus canciones! Tu alegría! por las tortas, las comidas, el Tía María!, y por siempre estar dispuesta a ayudarme con todo! A Claudio y a Guille!, por todo lo que compartimos!, los congresos, las charlas, las noches, los bailes, y todo lo que vivimos juntos en estos años. A Santi, por todo tu apoyo! por lo que aprendimos juntos!, por la ayuda en el trabajo!, gracias peluca! A Cata!, por los mates, y la alegría. A Lobo! por toda la buena onda, y a los mas nuevos, a Berti!, por tus inventos!, y tu buena disposición para todo!, a Bardo!, por estar tan loco, y a Ale, por suavizar a Bert!! Finalmente a los que se fueron, gracias Albert!, por todo lo que todavía compartimos!, gracias Marisa!, por toda tu ayuda y dulzura!, gracias por haberme dado tanto a pesar del poco tiempo que compartimos!

A los chicos de al lado!!!, Gracias, a la Tere, por la infinidad de cosas que me brindó! Gracias por los reactivos!, las pepas!, el café!, las charlas científicas!, y por siempre interesarse por mi trabajo! Gracias a la Betty!, que ya se fue pero está tan cerca como siempre!, gracias por tus risas!, tu alegría!, tu increíble buena onda!, tus consejos cuando estabas en el lab!, y por sobre todo por bancarte al loquito de Joaco!. Gracias a Mar!, por el incontable apoyo que me brindaste!, por estar siempre dispuesta a ayudarme!, y por tenerme tanta paciencia! Gracias a Manu, a Seba, a Nico, a Pablo y a Fede!, por cada momento, cada risa! Gracias Manu, por todas las charlas!, las ondas!, las noches!, el apoyo!, los bajoneros!, y por preocuparte tanto por nosotros!. Gracias Seba por se tan buen amigo!, por ayudarnos tanto en cada momento!, por tu alegría! tus payasadas!, y por cuidar tanto a Mar! Gracias Nico!, por ser tan macanudo! Por estar siempre listo!, por hacer reír a Marce y porque aunque te hagas el mala onda tenés la mejor! A Pablo! Por los chistes cordobeses!, el buen humor!, y las veces que nos alimentaste a todos! A Fede por los buenos momentos aunque nos conozcamos poco. Gracias al Gaita!, por los momentos y las cosas que nos enseñaste! Y a Rita!, por el apoyo y la buena predisposición!

Gracias a los otros integrantes del INGEBI con quienes compartí tantas cosas. Gracias Evelyn!, por las risas!, las salidas!, los congresos!, y todo lo que compartimos. Gracias Ken, por los consejos!, y las mañanas de Favaloro! Gracias Gabi!, por siempre darme una mano cuando la necesite y por todos las clases juntos! Gracias Marta!, por toda la ayuda!, y la buena onda! Gracias Jorge y Horacio!, porque siempre me ayudaron cuando lo necesité!, gracias por estar siempre ahí! Gracias a Fer por todos los consejos. Gracias Irma y Mariano por ayudarme tanto en todo. Gracias Mari y Francisco, por ser de las mejores personas que conocí en mi vida!, gracias por lo que hacen por nosotros!, y por el resto del mundo! Gracias Gladis, por tanta ayuda. Gracias José y Mario por siempre estar alegres y abrirme la puerta toooooooooooooooooos los fines de semana que no tuve tarjeta! Gracias Mala!, estar siempre alegre! Gracias Laura, Diego, Sonia, Hernán, Tom, Diego, Elena, Carla y a Mari Gallo, por todas las cosas que compartimos.

También quiero agradecer al Dr. Birnbaumer por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y a Jeff Reece por todo lo que me enseñó y lo que con él compartí.

Gracias Leo por toda tu ayuda! Por las jeringas que te rompí y por ayudarme siempre. Y gracias Ursu, por ser tan hija de tu papá! Gracias por tu dulzura, por siempre preocuparte por nosotros y por los momentos compartidos con vos y con Ian.

A mis amigos!, con los que compartí la experiencia porteña, por haberme preguntado y haberse interesado siempre por mi trabajo. Gracias Juan, Soto, Palo, Cholo, Poro, Berto, Chango, Jero, Gerva, Gonza, Cabe (aparecé!!!) y gracias chileno master de las letras! Al Negro, Victor, Juan y Marco, con los que compartí mis años de estudio en Córdoba y a los que se quedaron en Neuquén Wichi, Teto, Guille, Pablo, Tiba, Marga, los hermanos Macana, por todos los asados las risas, las noches, las vacaciones, gracias por todas las cosas que aprendimos juntos desde chiquitos!!!!. Gracias Marquito y Ana por todo!!! Gracias paisanos neuquinos!!!!

Gracias Paul!, por estar siempre a nuestro lado, por ser tan comprensiva y tan linda persona!. Y gracias Vicky, Sergio, Lali,, Rama, Lau, Seba, Jose, Fabi, Eve, Vester, Vani y a Mari y Lucas por todo lo que compartimos!, por Highlands, por las cenas, los bowlings, los cumpleaños, gracias por tanta diversión y por ser lo que fueron conmigo. Gracias a todos!! Y brindo por los que vienen!!

Por último, pero más importante, quiero agradecerte a vos!, a mi mitad!, a mi amor!, a mi sol!, a vos Mar por haberme ayudado a llegar hasta acá! Por haberme apoyado en cada momento!, por haber compartido mis mejores y mis peores días!, por haberme mimado!, por haberme cuidado!, por haberme cocinado!, por enseñarme lo que es amor!, y por haber aprendido a convivir juntos!. Por todos los viajes, las vacaciones, las risas, las lagrimas, los regalos, las cenas!, POR TODAS LAS FOOOOTOS!!!! Gracias otra vez por haberme introducido en tu familia, y por querer a la mía!. Gracias por la ayuda que me brindaste durante estos años!, por leer mis informes!, los papers!, por interesarte por mi trabajo y ayudarme cada vez que te necesite!. Gracias por ser lo mejor de mi vida!!! Gracias por ser mi amor!!!!. TE AMO!.

y si me olvide de alguien, mil perdones y gracias....

RESUMEN Y PUBLICACIONES

Resumen

En este trabajo se caracterizó la adenilil ciclasa TczAC. Se determinó que el gen que codifica para esta enzima se encuentra altamente conservado con los genes de adenilil ciclasas identificados en otros tripanosomátidos, es parte de una familia multigénica y se expresa en todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. Se determinó que el producto de este gen es una enzima funcional capaz de complementar una cepa de levaduras carente de actividad adenilil ciclasa. Esta enzima es específica para AMPc, presenta una mayor actividad en presencia de Mn^{+2} que de Mg^{+2} y es inhibida por Zn^{+2} y el inhibidor del sitio P, 2'-deoxy-3'AMP. Por otro lado, el Ca^{+2} estimula la actividad de la misma manera independiente de calmodulina.

Utilizando la técnica de doble híbrido en levaduras se demostró que TczAC dimeriza a través de su dominio catalítico y se identificaron 13 clones capaces de interaccionar específicamente con la misma. En particular se analizó la interacción de TczAC con el clon correspondiente a la proteína de flagelo paraflagellar rod.

Asimismo, TczAC fue expresada en una cepa mutante de levaduras *S. pombe*. Los resultados obtenidos con estos experimentos sugieren que este sistema de expresión podría ser de gran utilidad para la búsqueda de inhibidores específicos.

Por otra parte, se identificó y caracterizó el gen *TczPDE* que codifica para la primer fosfodiesterasa de AMPc de *T. cruzi*. Se determinó que este gen es parte de una familia multigénica y codifica para una proteína que presenta un posible péptido señal, dos dominios GAF de unión a GMPc y un dominio catalítico altamente conservado. La funcionalidad de esta proteína se confirmó por ensayos de complementación en levaduras carentes de actividad fosfodiesterasa. En dichas levaduras TczPDE se encontró asociada a la fracción particulada, mostró una alta afinidad por el AMPc y no fue capaz de hidrolizar GMPc.

Por ensayos de Western blot se confirmó la asociación de TczPDE a la membrana de las levaduras y se observó que esta se encuentra fuertemente asociada a la misma.

La localización subcelular de TczPDE en *T. cruzi* se estudió por fraccionamiento subcelular e inmunolocalización. Estos experimentos demostraron que TczPDE se encuentra localizada en la membrana plasmática del parásito y concentrada en el flagelo.

Palabras clave: Adenilil ciclasa, Fosfodiesterasa, Calcio, Flagelo, Trypanosoma

In this work we have characterized TczAC adenylyl cyclase. The gene encodes an enzyme which is highly conserved with the adenylyl cyclase genes identified in other trypanosomatids, is part of a multigene family and is expressed in all the stages of *T. cruzi* life cycle. The product of this gene is a functional enzyme that can complement a yeast strain deficient in adenylyl cyclase activity. The enzyme is specific for cAMP, has a higher activity in the presence of Mn^{+2} instead of Mg^{+2} , and is inhibited by Zn^{+2} and the P-site inhibitor, 2'-deoxy-3' AMP. On the other hand, Ca^{+2} stimulates its activity in a calmodulin independent manner.

Using the yeast two-hybrid technique it was demonstrated that TczAC dimerizes through its catalytic domains, and 13 clones that interact with this protein were identified. In particular, the interaction of TczAC with the flagellar protein paraflagellar rod was analyzed.

Besides, TczAC was expressed in a *S. pombe* mutant strain. The results obtain in these experiments suggest that this expression system could be useful for the identification of specific inhibitors.

Apart from that, the gene TczPDE that codes for the first cAMP phosphodiesterase of *T. cruzi* was identified and characterized. It was found that this gene is part of a mutligene family and encodes a protein that presents a putative signal peptide, two GAF domains for cGMP binding and a highly conserved catalytic domain. The functionality of this protein was confirmed by complementation assays in yeasts lacking phosphodiesterase activity. In these yeasts TczPDE was found to be associated to the particulate fraction, showed a high affinity for cAMP and was not able to hydrolyze cGMP.

By Western blot analysis, the association of TczPDE to the yeast membrane was confirmed, and it was observed that this enzyme is strongly associated to it.

The subcellular localization of TczPDE in *T. cruzi* was studied by subcellular fractionation and immunolocalization. These experiments demonstrated that TczPDE is localized in the plasma membrane of the parasite and concentrated in the flagellum.

Key words: Adenylyl cyclase, Phosphodiesterase, Calcium, Flagellum, Trypanosoma

Publicaciones del período de tesis

- 1- Espinosa J, Martinetto H, Portal D, **D'Angelo M**, Torres HN, Flawiá MM. Factors from *Trypanosoma cruzi* Interacting with AP-1 Sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1999; **46**, 516-521.
- 2- Djikeng A, Ferreira L, **D'Angelo M**, Dolezal P, Lamb T, Murta S, Triggs V, Ulbert S, Villarino A, Renzi S, Ullu E, Tschudi C. Characterization of a candidate *Trypanosoma brucei* U1 small nuclear RNA gene. *Mol Biochem Parasitol* 2001; **113**, 109-115
- 3- **D'Angelo M**, Montagna A, Sanguineti S, Torres HN, Flawiá, MM. A novel calcium-stimulated adenylyl cyclase from *Trypanosoma cruzi* that interacts with the structural flagellar protein paraflagellar rod. *J Biol Chem.* 2002; **277**, 35025-35034.
- 4- **D'Angelo M**, Sanguineti S, Reece J, Birnbaumer L, Torres HN, Flawiá MM. Identification and characterization of a membrane cAMP-specific phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi* associated to the flagellum. Enviado a publicar.

ÍNDICE GENERAL

• Índice general	1
• Abreviaturas	7
• Introducción	9
1- Adenosín-monofosfato cíclico (AMPc)	9
2- Adenilil ciclasas	14
2.1- Clase I	14
2.1.1- Características y estructura	14
2.1.2- Mecanismo catalítico	17
2.1.3- Regulación	18
2.2- Clase II	19
2.3- Clase III	20
2.4- Clase IV	21
3- Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos	22
3.1- Clase I	23
3.1.1- Familias y estructura	23
3.1.2- Regulación	24
3.1.3- Localización subcelular	26
3.1.4- Inducción de la actividad PDE y función homeostática	27
3.1.5- Fosfodiesterasas y enfermedad	28
3.2- Clase II	29
3.3- Clase III	30
4- Calcio	31
5- Compartimentalización de las señales de Ca^{+2} y AMPc	35
6- <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
6.1- Tripanosomátidos	40
6.2- Enfermedad de Chagas	41
6.3- Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	45
6.4- Transducción de señales en <i>T. cruzi</i>	47
6.4.1- AMPc en <i>T. cruzi</i>	50
6.4.1.1- Adenilil ciclasas en <i>T. cruzi</i>	51

6.4.1.2- Fosfodiesterasas de AMPc en <i>T. cruzi</i>	53
6.4.1.3- Efectores de AMPc en <i>T. cruzi</i>	56
6.4.2- Calcio en <i>T. cruzi</i>	56
• Datos preliminares	59
• Objetivos	60
• Materiales y Métodos	61
Materiales	61
1- Cepas de bacterias <i>E. coli</i>	61
2- Cepas de levaduras	61
3- Cepas de parásitos	62
4- Medios de cultivos	62
4.1- Cultivo de bacterias	62
4.2- Cultivo de levaduras	62
4.3- Cultivo de parásitos	63
5- Soluciones generales	63
5.1- Soluciones empleadas en técnicas de ADN y ARN	63
5.2- Soluciones empleadas en técnicas de proteínas	64
5.3- Soluciones empleadas en técnicas de levaduras	65
6- Oligonucleótidos (5'→3')	65
6.1- Identificación de <i>TczPDE</i>	66
6.2- Secuenciación de <i>TczPDE</i>	66
6.3- Amplificación de sondas	66
6.4- RT-PCR	67
6.5- Expresión en bacterias	67
6.5.1- Paraflagellar rod	67
6.5.2- <i>TczPDE</i>	67
6.6- Complementación en levaduras	67
6.7- Ensayo de doble híbrido	67
6.8- Expresión en <i>S. pombe</i>	68
7- Vectores	68
8- Anticuerpos	68
9- Bibliotecas de <i>T. cruzi</i>	69

10- Sondas	69
10.1- <i>TczAC</i>	69
10.2- <i>TczPDE</i>	69
Métodos	70
1- Métodos de ADN y ARN	70
1.1- Electroforesis de ADN	70
1.2- Corte con enzimas de restricción	70
1.3- Amplificaciones por PCR	70
1.4- Purificación y precipitación de ácidos nucleicos	71
1.5- Cuantificación de ácidos nucleicos	71
1.6- Purificación de fragmentos de ADN de geles	71
1.7 Subclonado en pGEM-Teasy	72
1.8- Reacciones de ligación	72
1.9- Marcación de sondas radioactivas	72
1.10- Purificación de plásmidos	73
1.11- Secuenciación y análisis de secuencias	74
2- Clonado del gen <i>TczPDE</i>	75
2.1- Obtención de la sonda	75
2.2- Rastreo de bibliotecas genómica	76
2.3- Purificación de ADN de fagos	77
3- Caracterización molecular de genes identificados	78
3.1- Extracción de ADN genómico	78
3.2- Ensayos de Southern Blot	78
3.3- Electroforesis en geles de campos pulsantes (PFGE)	79
3.3.1- Preparación de bloques	79
3.3.2-. Separación de cromosomas <i>T. cruzi</i> por PFGE	79
3.4-Extracción de ARN total	80
3.5- Electroforesis de ARN	80
3.6- Ensayos de Northern Blot	80
3.7- Transcripción Reversa	81
4- Técnicas con bacterias	81
4.1- Preparación y transformación de bacterias competentes	81

4.2- Expresión de proteínas recombinantes	83
4.3- Purificación de proteínas recombinantes	83
4.3.1- Purificación de cuerpos de inclusión	83
4.3.2- Renaturalización de proteínas recombinantes	84
4.3.3 Purificación de la proteína recombinante en resinas de amilosa	84
4.4- Obtención de Anticuerpos	85
5- Técnicas con levaduras	86
5.1- <i>S. cerevisiae</i>	86
5.1.1- Transformación	86
5.1.1.2- Gran Escala	86
5.1.2- Complementación	87
5.1.2.1- TczAC	87
5.1.2.2- TczPDE	88
5.1.3- Preparación de extractos proteicos	88
5.1.4- Lavado de membranas	88
5.1.5- Ensayo de doble híbrido en levaduras	89
5.1.5.1 Ensayo de dimerización	89
5.1.5.2 Rastreo de la biblioteca de expresión de <i>T. cruzi</i>	90
5.1.5.3- Interacción con paraflagellar rod	90
5.1.6- Medición de actividad β -galactosidasa	91
5.1.7- Minipreparación de plásmidos de levaduras	92
5.1.8- Extracto soluble de levaduras	92
5.2 <i>S. pombe</i>	93
5.2.1 Transformación	93
6- Técnicas con parásitos	94
6.1- Cultivo	94
6.2- Preparación de extractos	94
6.3- Fraccionamiento subcelular	94
6.4- Inmunolocalización	94
6.5- Tratamientos	95
7- Técnicas de proteínas	96
7.1- Cuantificación de proteínas	96
7.2- Electroforesis de proteínas	96
7.3- Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie Blue	96

7.4- Ensayos de Western Blot	97
8- Ensayos bioquímicas	97
8.1- Ensayos de actividad adenilil ciclasa	97
8.2- Ensayos de actividad fosfodiesterasa	98
• Resultados	99
Modulo I	99
1- Análisis molecular del gen <i>TczAC</i>	99
2- Organización genómica y transcripción de <i>TczAC</i> en <i>T. cruzi</i>	104
3- Caracterización bioquímica de TczAC	106
3.1- Complementación y propiedades bioquímicas	106
3.2- Estimulación por Ca^{+2}	110
4- Expresión de <i>TczAC</i> en distintos estadios del ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	115
5- Dimerización del dominio catalítico de TczAC	116
6- Identificación de proteínas que interactúan con el dominio catalítico de TczAC	122
6.1- Análisis de la interacción entre TczAC y la proteína paraflagellar rod	124
6.2- Expresión de paraflagellar rod en <i>E. coli</i>	126
7- Obtención de un sistema para la búsqueda de inhibidores específicos de TczAC en <i>Sacchamomyces pombe</i>	128
Módulo II	133
8- Clonado y caracterización de la fosfodiesterasa de AMPc TczPDE	133
8.1- Análisis molecular del gen <i>TczPDE</i>	134
8.2- Organización genómica y expresión de <i>TczPDE</i>	136
9- Ensayos de complementación en levaduras deficientes de fosfodiesterasas de AMPc	138
10- Expresión de TczPDE en <i>E. coli</i> y obtención de un antisuero específico contra TczPDE	140
11- Asociación de TczPDE a membranas de las levaduras transformadas	142
12- Caracterización bioquímica de TczPDE	143
13- Fraccionamiento subcelular de TczPDE en <i>T. cruzi</i>	145
14- Inmunolocalización de TczPDE en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	147

• Discusión	150
Modulo I	150
Modulo II	155
• Conclusiones	158
• Bibliografía	160

Abreviaturas

A	Ampers
aa	Aminoácido
AC	Adenilil ciclase
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN copia
AKAP	Proteína de anclaje de PKA
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
BrEt	Bromuro de etidio
CaBPs	Proteínas de unión a calcio
CAM	Calmodulina
CAMKII	Quinasa de proteínas dependiente de CAM
CGP	Proteína turquesa fluorescente
CNGC	Canales regulados por nucleótidos cíclicos
dNTPs	2'-deoxinucleósido 5'-trifosfatos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Etilenglicol-bis (β -amino-etileter)-N,N,N', N'-tetraacético
EHNA	Eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil) adenosín-hidrocloruro
Fsk	Forskolina
GDF	Péptido derivado de la globina
GEF	Factor intercambiador de GTP
GFP	Proteína verde fluorescente
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
INF- γ	Interferon gama
IPTG	Isopropil- β -D-thiogalactopiranosido

kDa	KiloDaltons
kpb	Kilo pares de bases
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baja densidad
M	Molar
ml	Mililitro
nm	Nanómetros
nt	Nucleótido
OMS	Organización mundial de la salud
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactosidasa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAR	Paraflagellar rod
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
PEG	Polietilenglicol
PFGE	Electroforesis en geles de campo pulsante
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorato
PKA	Quinasa de proteínas dependiente de AMPc
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TLCK	N ^α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona
Tris	2-amino-2-hidroximetil 1,3 propanodiol
ufp	unidades formadoras de playas de lisis
UTR	No codificante
UV	Ultravioleta
V	Volts
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido.
YGP	Proteína amarilla fluorescente
μ J	MicroJoule
μ l	Microlitro
5'-FOA	Ácido 5'-fluoro-orático

INTRODUCCIÓN

Introducción

1- Adenosín-monofosfato cíclico (AMPc)

El AMPc fue identificado por Sutherland y Rall en 1957. Su descubrimiento no fue por azar sino dentro de un marco conceptual claramente definido y sirvió como base para comprender cómo la información es transmitida dentro de las células. Sobre la hipótesis de que las hormonas podían trabajar a un nivel molecular Sutherland construyó un sistema de estudio libre células en donde hormonas de función conocida podían regular la glucogenólisis. A partir de este sistema purificó una molécula pequeña y termoestable capaz de activar la glucógeno fosforilasa. Esta molécula fue posteriormente identificada como el 3',5'-adenosín monofosfato cíclico o AMPc. Este descubrimiento dio lugar al nacimiento del término segundo mensajero, utilizado desde entonces para identificar pequeñas moléculas generadas intracelularmente tras una estimulación y capaces de regular eventos celulares.

A pesar de haber pasado más de 40 años desde su descubrimiento, y que este segundo mensajero ha tenido siempre un papel central en la transducción de señales en las células, continuamente se siguen identificando nuevas funciones y componentes de su vía de señalización, evidenciando la alta complejidad de su regulación y mecanismo de acción (Figura 1). Se ha determinado que el AMPc es producido en respuesta a una gran variedad de estímulos extracelulares, que van desde estímulos hormonales y neurotransmisores hasta cambios en la concentración de nutrientes, osmolaridad, pH y temperatura. De la misma manera, se han identificado numerosos procesos celulares regulados por este segundo mensajero, entre los cuales se encuentran la diferenciación, la división celular, el crecimiento, y el movimiento celular, la respuesta a nutrientes, la percepción sensorial, la resistencia a virus, la apoptosis, e incluso se ha demostrado que el mismo puede actuar como una señal extracelular en algunas bacterias y protozoos.

Si bien la mayoría de los componentes principales del camino de transducción de señales mediadas por AMPc se encuentran ampliamente caracterizados (Figura 1), recientemente se han identificado un gran número de isoformas de las enzimas involucradas en la síntesis, degradación y transmisión de los efectos de este segundo

mensajero. Estas enzimas proveen un sofisticado sistema que permite la organización de esta vía de señalización en compartimientos intracelulares, la integración con otras vías de señalización, y el control de la cinética y características de la respuesta mediada por AMPc, permitiendo así una gran versatilidad de respuesta.

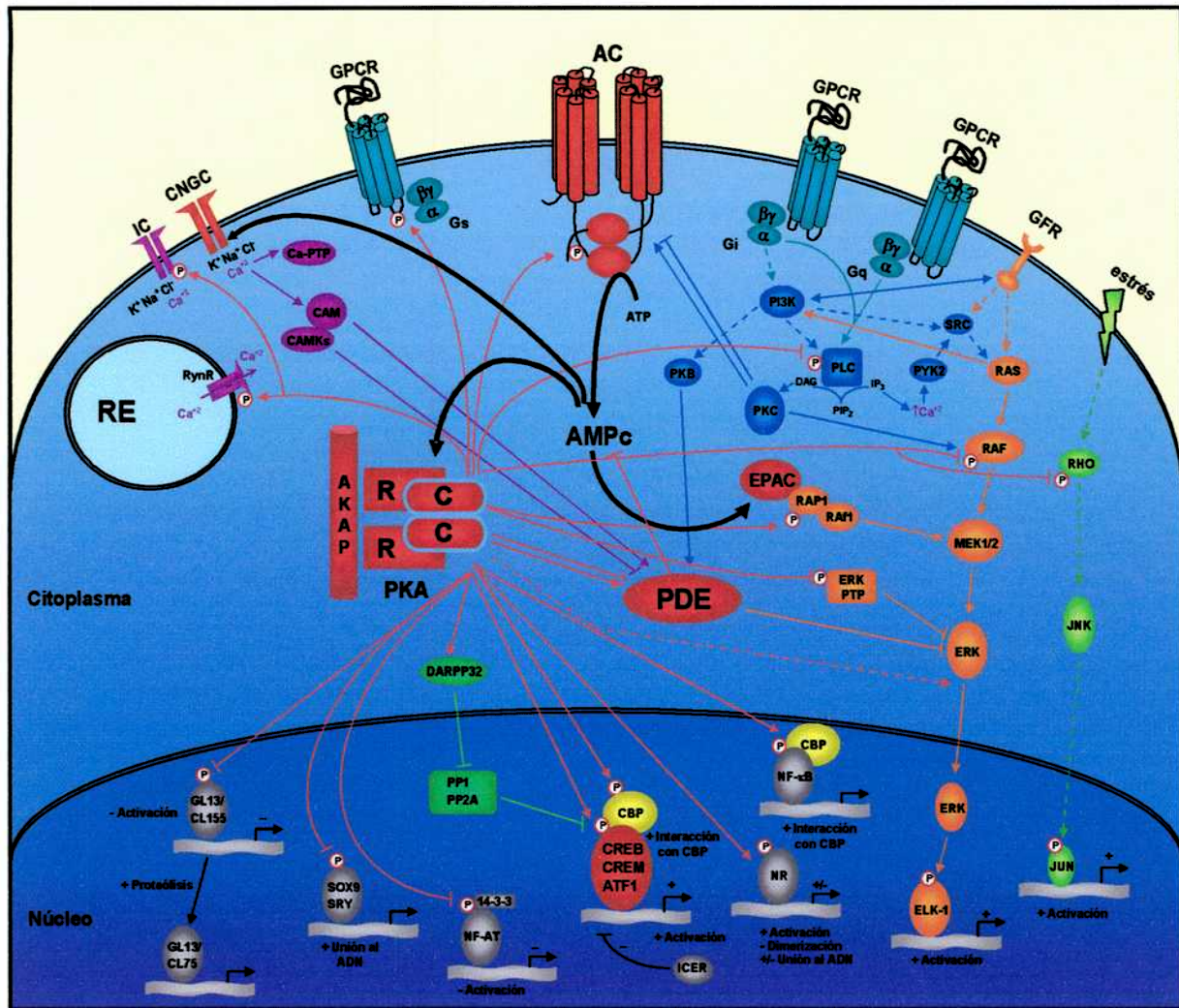


Figura 1. Señalización mediada por AMPc. IC, canales iónicos, CNGC, canales regulados por nucleótidos cíclicos, RE, retículo endoplasmático, RynR, receptor de rianodina, Ca-PTP, fosfatasa dependiente de calcio, CAM, calmodulina, CAMKs, quinasas dependientes de calmodulina, PDE, fosfodiesterasa, AC, adenilil ciclase, PKA, quinasa de proteínas A, AKAP, proteína de anclaje de PKA, PP1, fosfatasa de proteínas tipo 1, PP2A, fosfatasa de proteínas tipo 2A, GFR, receptores de factores de crecimiento, CBP, proteína de unión a CREB, CREB proteína de unión a CRE, CRE, elemento de respuesta a AMPc.

Los niveles intracelulares de AMPc son controlados a través de su síntesis y degradación por las enzimas adenilil ciclasas y fosfodiesterasas de AMPc respectivamente (Figura 2).

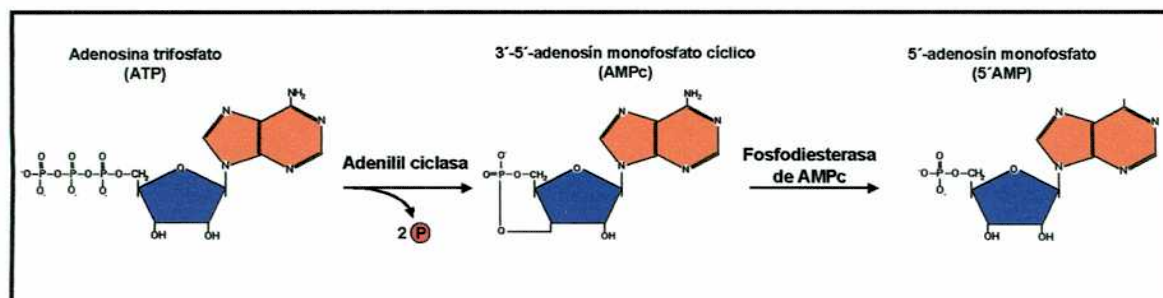


Figura 2. Síntesis y degradación del AMPc.

Por otro lado, este segundo mensajero ejerce su función a través efectores específicos. Tres blancos principales de AMPc han sido identificados: la quinasa de proteínas dependiente de AMPc (PKA), la proteína intercambiadora de GTP dependiente de AMPc (cAMP-GEF o EPAC) y los canales iónicos regulados por este nucleótido (GNGC; Fimia y Sassone-corsi, 2001)

La PKA es considerada el principal efector del AMPc. Esta enzima es un complejo tetramérico formado por dos subunidades catalíticas (C) con actividad quinasa de serina/treonina y dos subunidades regulatorias (R; Figura 3A). La PKA se activa cuando dos moléculas de AMPc se unen a cada una de las subunidades regulatorias y producen la disociación de las subunidades catalíticas. Una vez disociada, una parte de las subunidades catalíticas permanece en el citoplasma mientras que otra es translocada dentro del núcleo (Figura 3A; Fimia y Sassone-corsi, 2001; Colledge y Scott., 1999; Meinkoth y col., 1993).

En el citoplasma, las subunidades C fosforilan un gran número de sustratos entre los cuales se encuentran componentes de misma la vía de AMPc. Fosforilando receptores, adenilil ciclasas y fosfodiesterasas, esta enzima produce un aumento o una disminución de la señal de AMPc dependiendo del tipo celular (Figura 3A; Fimia y Sassone-corsi, 2001).

En el núcleo, las subunidades C fosforilan y regulan la actividad de factores de transcripción, modulando así la expresión de genes. Los factores de transcripción CREB, CREM y ATF1 fueron los primeros identificados de ser fosforilados por PKA en respuesta a AMPc. Estos factores pueden regular la expresión de genes uniéndose a secuencias específicas de ADN denominadas elementos de respuesta a AMPc o secuencias CRE (Figura 3A; Lalli y Sassone-corsi., 1994; De Cesare y col., 1999; Sassone-corsi, 1998).

Además de regular la actividad de PKA, el AMPc se une y regula directamente la actividad de canales iónicos. Estos canales generalmente no son muy selectivos y permiten el pasaje de Ca^{+2} , Na^{+} y K^{+} (Kaupp y Seifert, 2002; Kramer y Molokanova., 2001; Dzeja y col., 1999). La entrada de Ca^{+2} a través de estos canales es particularmente interesante debido a que es independiente de cambios en el voltaje de la membrana y une la vía de señalización por AMPc con la homeostasis de Ca^{+2} . Una vez dentro de la célula el Ca^{+2} estimula la actividad de la calmodulina (CAM) y de las quinasas de proteínas dependientes de calmodulina (CAMK) las cuales a su vez modulan la acción del AMPc regulando la actividad de las adenilil ciclasas y fosfodiesterasas de AMPc (Figura 3B; Kaupp y Seifert, 2002; Kramer y Molokanova., 2001; Dzeja y col., 1999).

Finalmente, el AMPc puede actuar regulando la actividad de factores intercambiadores de GTP, GEF. Estos factores, denominados cAMP-GEF o EPACs (*Exchange Protein Activated by cAMP*), presentan dos dominios estructurales: 1) un dominio de unión a AMPc amino-terminal y 2) un dominio intercambiador de GTP (GEF) carboxilo-terminal perteneciente a la superfamilia de las proteínas Ras. La unión del segundo mensajero a estas proteínas les permite actuar como intercambiadores de GTP de la proteína Rap1 modulando así la vía de señalización mediada por MAPKs de una manera independiente de la PKA (Figura 3C; de Rooij y col., 1998; Kawasaki y col., 1998; Stork y Schmitt, 2002).

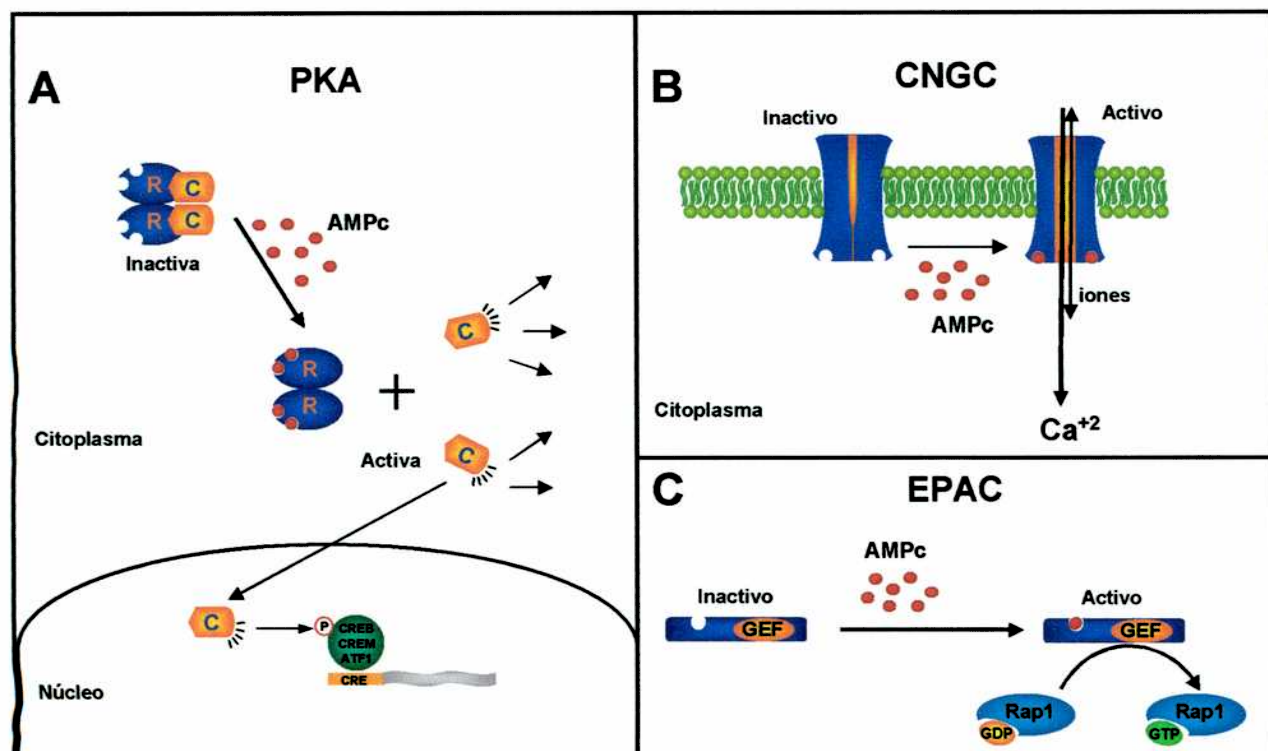


Figura 3. Efectores del AMPc. A, Mecanismo de acción de la quinasa de proteínas A (PKA). R subunidad regulatoria, C subunidad catalítica. B, Mecanismo de acción de los canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos (CNGC). C, Mecanismo de acción de las proteínas intercambiadoras de GTP regulados por AMPc (cAMP-GEF o EPAC)

2- Adenilil ciclasas

Las adenilil ciclasas son enzimas que juegan un papel crucial en la señalización mediada por AMPc, catalizando la síntesis de este segundo mensajero a partir de ATP en respuesta a distintos estímulos extracelulares.

Basándose en su topología las adenilil ciclasas se pueden agrupar en cuatro clases (Tang y Gilman, 1992; Bieger y Essen, 2001).

Clase I: Incluye todas las adenilil ciclasas de membrana descritas en mamíferos y también las de otros organismos como *Drosophila dunce* y *Dictyostelium discoideum*.

Clase II: Incluye una adenilil ciclasa descrita en *D. discoideum* y las adenilil ciclasas de protozoos.

Clase III: Incluye las adenilil ciclasas periféricas de membrana de hongos y de *Escherichia coli*.

Clase IV: Incluye las adenilil ciclasas solubles de bacterias y una de mamíferos.

2.1- Clase I

2.1.1- Características y estructura

De todas la adenilil ciclasas descritas, las de clase I de mamíferos han sido las más ampliamente caracterizadas. Todas las enzimas de esta familia responden a ligandos extracelulares a través de la interacción con proteínas G heterotriméricas. La unión de un ligando a un receptor de siete pasos transmembrana induce un cambio conformacional en el receptor que le permite actuar como un intercambiador de GTP (GEF) facilitando el intercambio de GDP por GTP en la subunidad alfa de la proteína G. La unión de GTP a la subunidad $G\alpha$ disminuye su afinidad por la subunidades $G\beta\gamma$ e

induce su disociación de las mismas. Una vez disociada, la subunidad alfa puede estimular ($G_{\alpha s}$) o inhibir ($G_{\alpha i}$) la actividad de la adenilil ciclasa (Figura 4). La regulación a través de proteínas G permite una gran amplificación de la señal extracelular ya que un solo receptor activado puede difundir por la membrana plasmática y activar un gran número de proteínas G cada una de las cuales activará una adenilil ciclasa (Simonds, 1999; Lagnado, 2002; Patel y col., 2001).

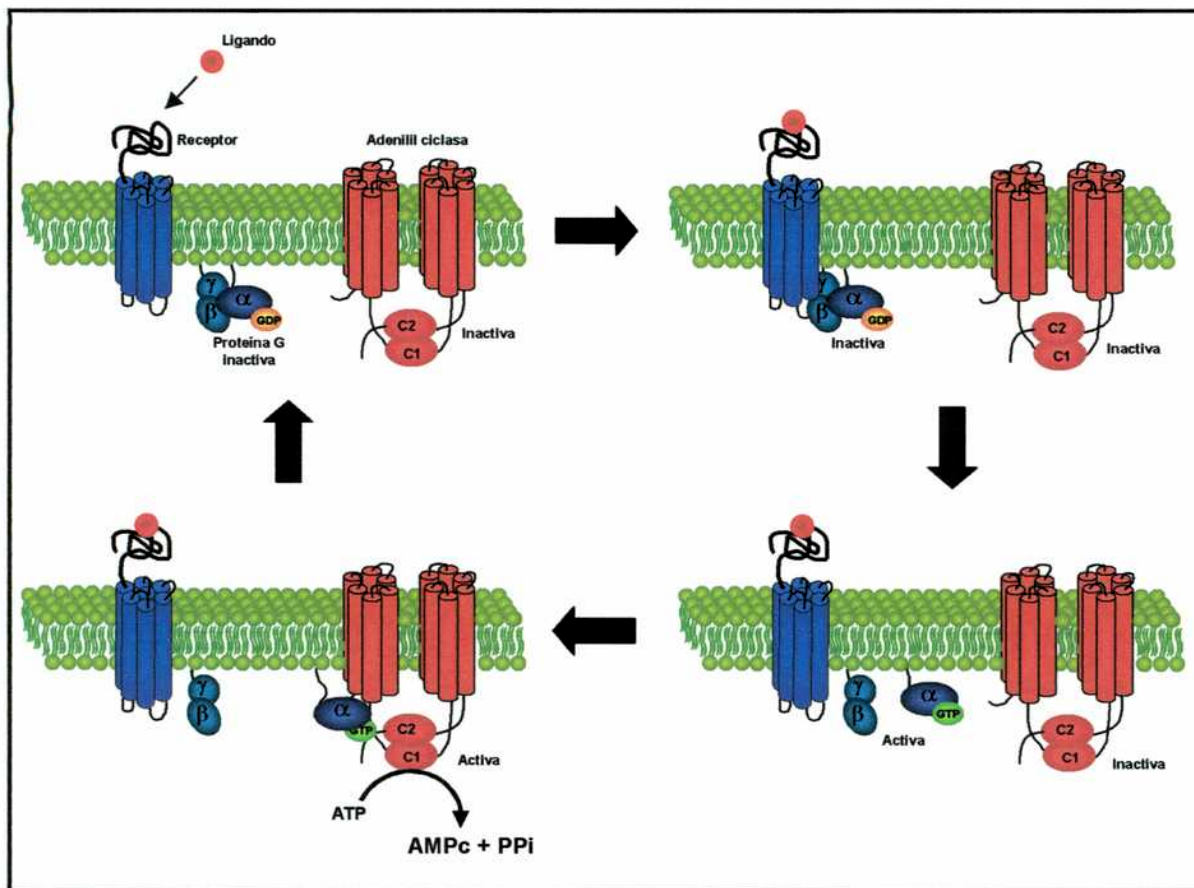


Figura 4. Mecanismo de regulación de las adenilil ciclasas por proteínas G.

Además de la regulación por proteínas G, los miembros de esta familia comparten una misma estructura que se caracteriza por tener un pequeño dominio amino-terminal intracelular, dos dominios de seis pasos transmembrana (M1 y M2) y dos dominios catalíticos intracelulares (C1 y C2), ambos necesarios para la actividad catalítica. Los dominios catalíticos pueden a su vez ser subdivididos en C1a y C1b, y C2a y C2b. El C1a y el C2a son homólogos entre sí, se encuentran altamente

conservados y constituyen el aparato catalítico (Figura 5). Notablemente, la expresión de cualquiera de las mitades de esta enzima, M1C1 o M2C2, o de los sitios catalíticos independientemente no presenta actividad enzimática. De forma contraria, la coexpresión de ambas mitades o de los dominios catalíticos unidos por un pequeño espaciador reconstituye una actividad enzimática que puede ser estimulada por el diterpeno foskolina y la subunidad alfa de la proteína G (Patel y col., 2001; Hurley, 1998; 1999). A partir de estos ensayos bioquímicos y por cristalografía de homodímeros de C2, y heterodímeros C1-C2 unidos a G α s y forskolina, se ha demostrado que las adenilil ciclasas de esta clase funcionan a través de la heterodimerización de sus dominios catalíticos, que da lugar a la formación de una interfase hidrofóbica C1a-C2a responsable de la actividad catalítica (Figura.5; Yan y col., 1996; Whisnant, y col., 1996; Zhang y col., 1997; Liu y col, 1997; Hurley 1999; Temer y col., 1997).

Dentro del bolsillo hidrofóbico formado por esta interacción se encuentra el sitio de unión a forskolina, formado por residuos de ambos dominios catalíticos. Al unirse, la forskolina aumenta unas diez veces la afinidad entre los dominios catalíticos produciendo una estimulación de la actividad enzimática. En forma similar, dentro del bolsillo hidrofóbico existe un sitio de interacción con la G α s también formado por residuos de C1a y C2a. La interacción tiene una mayor contribución del dominio C2a y la subunidad G α s parece producir una estimulación de la actividad catalítica por un mecanismo similar al de forskolina. Por otro lado, la interacción con la proteína G α i está mediada únicamente por el dominio C1a y el mecanismo preciso de inhibición aún no se conoce (Patel y col., 2001; Hurley, 1998; 1999; Tesmer y Sprang, 1998).

Con respecto a los dominios Cb, C1b corresponde a una región grande y variable que contiene diversos sitios de regulación. Se ha observado que este dominio es importante para la regulación mediada por Ca⁺²-CAM y por calcineurina, además de tener un papel secundario en la regulación por subunidades G α . De forma contraria C2b es pequeño, está sólo presente en las isoformas I, II, III y VIII, y carece de funciones conocidas (Patel y col., 2001; Tesmer y Sprang, 1998).

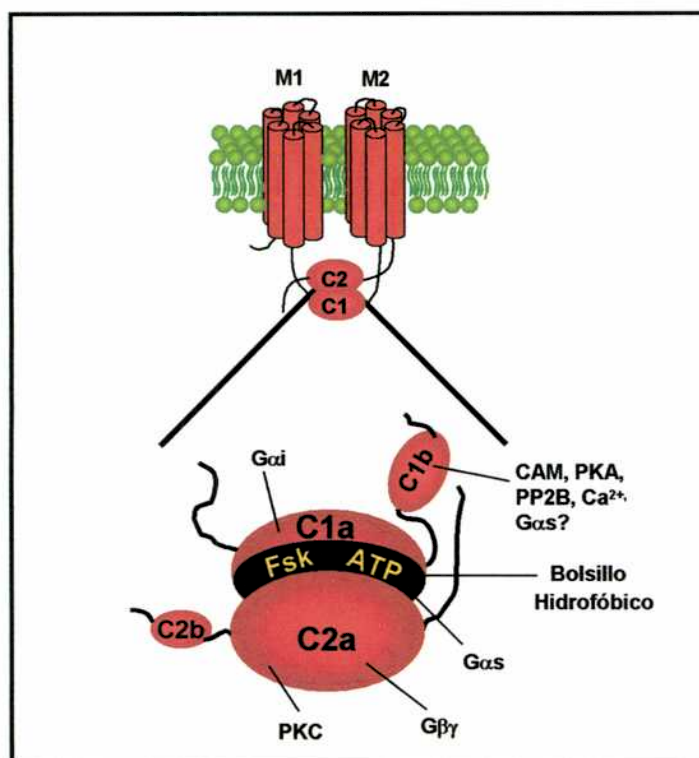


Figura 5. Estructura de dominio catalítico de las adenilil ciclasas de mamíferos. M, dominios transmembrana, C dominios catalíticos, Fsk, forskolina, PP2B, fosfatasa de proteínas B.

2.1.2- Mecanismo catalítico

Por ensayos de mutagénesis dirigida, modelado molecular y estudio con inhibidores específicos, se han identificado los aminoácidos del sitio catalítico involucrados en la unión del ATP (Tesmer y col., 1997; Liu y Col., 1997; Zhang y col., 1997; Hurley, 1999). Mutaciones en estos residuos tienen diferentes efectos en la unión del sustrato e incluso pueden modificar la especificidad de ATP por GTP (Tucker y col., 1998). Se ha demostrado que ciertos derivados de adenosina pueden inhibir la actividad de las enzimas adenilil ciclasas. Estos compuestos, denominados inhibidores del sitio P por requerir la presencia de un anillo de purina, inhiben la reacción directa en forma no competitiva con respecto al complejo Mg^{+2} -ATP (Désaubry y col., 1996; Dessaur y Gilman, 1997; Tesmer y col., 2000). Algunas mutaciones dentro del sitio catalítico alteran la unión de estos inhibidores y del ATP en forma idéntica o similar. Sin embargo, otras mutaciones inhiben la unión de ambos compuestos en forma diferente

indicando que los inhibidores del sitio P deben unirse a conformaciones diferentes del mismo sitio catalítico, a sitios superpuestos pero no idénticos, o presentar distintos sitios de unión (Hurley, 1998; Tang y Hurley, 1998; Tesmer y Sprang, 1998).

Con respecto a la unión de metales, se ha demostrado que el mecanismo catalítico es similar al descrito para la polimerasa del fago T7 e involucra la unión de dos metales divalentes a dos sitios diferentes (A y B) del dominio catalítico (Zimmermann y col., 1998; Tesmer y Sprang, 1998; Artymiuk y col., 1997). Uno de estos sitios une Mg^{+2} libre mientras que el otro une el complejo Mg^{+2} -ATP. Se ha observado también que el Mn^{+2} se une al sitio B y actúa como un potente activador de estas enzimas, probablemente porque tiene un tamaño similar al Mg^{+2} pero es un mejor ácido de Lewis. De forma contraria, el Zn^{+2} se une al sitio A y ejerce un potente efecto inhibitorio sobre la actividad de estas enzimas (Hurley, 1998; 1999; Tesmer y Sprang, 1998).

2.1.3- Regulación

Las distintas isoformas de adenilil ciclasas poseen de mecanismos de regulación diversos. De acuerdo con su regulación y propiedades bioquímicas, las enzimas de mamíferos se han dividido en nueve familias (ACI-IX). Todas ellas son estimuladas por la subunidad $G\alpha_s$ y, excepto por la familia ACIX, por el diterpeno forskolina.

Como se encuentra resumido en la Tabla I, dentro de las distintas familias se puede observar una estimulación o inhibición por calcio, por la subunidad $G\beta\gamma$ y por distintas quinasas de proteínas. Cabe mencionar que la estimulación mediada por calcio es siempre dependiente de calmodulina, mientras que la inhibición puede ser directa o mediada por calcineurina o la quinasa de proteínas dependiente de calmodulina II (CAMKII). Las distintas familias muestran también distinta sensibilidad a los inhibidores del sitio P (Hurley, 1998; 1999; Tesmer y Sprang, 1998; Patel y col., 2001).

Isoformas	Activadores	Inhibidores
ACI	G α s, Fsk, Ca ⁺² /CAM	G α i, G β γ , CAMK IV, Inh. sitio P
ACII	G α s, Fsk, Ca ⁺² /CAM	CAMK II, Inh. sitio P
ACIII	G α s, Fsk, Ca ⁺² /CAM	Inh. sitio P
ACIV	G α s, Fsk, G β γ , PKC	Inh. sitio P
ACV	G α s, Fsk, G β γ	Inh. sitio P
ACVI	G α s, Fsk, G β γ , PKC	Inh. sitio P
ACVII	G α s, Fsk, PKC	G α i, Ca ⁺² , PKA, Inh. sitio P, G β γ
ACVIII	G α s, Fsk	G α i, Ca ⁺² , PKA, Inh. sitio P, PKC
ACIX	G α s	Calcineurina, Inh. sitio P
AC soluble	HCO ₃ ⁻	?

Tabla I. Activadores e inhibidores de las adenilil ciclasas de mamíferos.

2.2- Clase II

Las adenilil ciclasas de clase II se caracterizan por presentar una estructura completamente distinta a la previamente descrita, que consta de un gran dominio extracelular, un único dominio transmembrana y un único dominio catalítico intracelular. Dicha estructura es similar a la de los receptores de membrana con actividad guanilil ciclasa (GCRP; Potter y Hunter, 2001).

Dentro de esta clase de enzimas se encuentra la adenilil ciclasa ACG de *D. discoideum*. Esta proteína se expresa en estadios específicos del desarrollo y actúa como un sensor osmótico (Pitt y col., 1992; van Es y col., 1996).

Otras enzimas que han sido clasificadas dentro de esta clase son las descritas para los tripanosomátidos *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y el organismo relacionado *Leishmania donovani*. Las características de estas proteínas serán abordadas en la sección 6.3.1.1.

2.3- Clase III

Este grupo incluye las adenilil ciclasas periféricas de membrana de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y de otros hongos, así como también la de *E. coli*.

La adenilil ciclasa de *S. cerevisiae* presenta varias diferencias con las enzimas de mamíferos. La actividad de la misma es insensible a las subunidades de la proteína G heterotrimérica así como también al activador forskolina, al fluoruro de aluminio y a las toxinas de cólera y pertussis. Por otro lado, esta enzima es activada por la proteína G monomérica RAS en respuesta a cambios en los niveles extracelulares de glucosa. La regulación de esta adenilil ciclasa por RAS requiere de la presencia de la proteína CAP la cual actúa como puente entre ambas proteínas (Danchin, 1993; Toda y col., 1985). En forma análoga, la adenilil ciclasa de *S. pombe* es regulada por variaciones en los niveles extracelulares de glucosa, pero en este caso, y de la misma manera que sucede con las enzimas de mamífero, la regulación se produce a través de la subunidad alfa de una proteína G heterotrimérica (Danchin, 1993; Kawamukai y col, 1991; Engelberg y col., 1990; Yamawaki-Kataoka, y col; 1989; Young y col., 1989).

Otras adenilil ciclasas de hongos presentan una estructura similar y están involucradas en un gran número de procesos celulares como la virulencia y el crecimiento de hifas en *Candida albicans*, la respuesta a nutrientes en *Cryptococcus neoformans*, el crecimiento celular en *Ustilago maydis* y el control de la utilización de fuentes de carbono en *Neurospora crassa*.

De forma similar a lo observado en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, la adenilil ciclasa de *E. coli* es regulada por glucosa. La estructura de esta proteína presenta dos dominios funcionales, un dominio amino-terminal con actividad catalítica y un dominio carboxilo-terminal regulado por glucosa. Cuando los niveles de glucosa son altos esta adenilil ciclasa se encuentra defosforilada y presenta una muy baja actividad. Una disminución en los niveles de glucosa induce la fosforilación y activación de la enzima. El aumento en los niveles de AMPc se traduce en una activación de factor de la transcripción CAP o CRP, el cual reprime la transcripción del gen de la adenilil ciclasa y

regula la expresión de otros genes involucrados en la utilización de fuentes alternativas de carbonos (Danchin, 1993; Bostford y Harman, 1992).

2.4- Clase IV

Finalmente se encuentran las adenilil ciclasas solubles descritas para algunas bacterias y una de mamíferos.

Entre las enzimas más interesantes de este grupo se encuentran las de las bacterias *Bordetella pertussis* y *Bacillus anthracis*. En ambos casos las adenilil ciclasas son secretadas como toxinas y son activadas por la calmodulina de las células huésped, proteína no existente en dichos organismos. La estructura de la adenilil ciclasa de *B. pertussis* se compone de un dominio amino-terminal con actividad adenilil ciclasa dependiente de calmodulina y un dominio carboxilo-terminal responsable de la actividad hemolítica de este patógeno. A esta adenilil ciclasa toxica se la denominó ciclolisina. La adenilil ciclasa de *B. anthracis* ha sido denominada factor de edema por su acción en el huésped infectado. Esta enzima presenta tres dominios funcionales: un péptido señal, un dominio con actividad adenilil ciclasa y un dominio de interacción con una proteína responsable de su internalización a la célula huésped (Danchin, 1993; Bostford y Harman, 1992).

Otro caso muy interesante es el de la adenilil ciclasa soluble de mamíferos la cual presenta propiedades bioquímicas distintas a las otras isoformas descritas en estos organismos. Esta enzima posee dos dominios catalíticos que están más relacionados a los dominios catalíticos de las adenilil ciclasas de cianobacterias que a los de células eucariotas. Su actividad es insensible a reguladores de proteínas G, requiere de Mn^{+2} e interesantemente actúa como sensor de HCO_3^- . La expresión de esta adenilil ciclasa soluble fue primero descrita en testículo en donde se cree que tiene un papel fundamental en el proceso de fertilización regulado por bicarbonato, modulando la movilidad de los espermatozoides, la capacitación y la reacción acrosomal. Recientemente también se ha reportado la expresión esta enzima en otros tejidos que responden al bicarbonato (Buck y col., 1999; Wuttke y col., 2001).

3- Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

La actividad hidrolítica de nucleótidos cíclicos en extractos celulares fue descrita por Sutherland y Rall poco después del descubrimiento del AMPc (Sutherland y Rall, 1958). Se sabe ahora que una amplia y diversa familia de enzimas, denominadas fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs), es responsable de dicha actividad.

Inicialmente se consideró que las fosfodiesterasas tenían un papel pasivo responsable de la terminación de la señal de AMPc. Sin embargo, la evidencia acumulada durante las últimas décadas ha demostrado que estas enzimas tienen un papel activo en la regulación de la señalización mediada por este segundo mensajero. Las PDEs no sólo regulan los niveles de AMPc a través de su degradación, sino también actúan como puntos de entrecruzamiento con otras vías de señalización y tienen un papel fundamental en la compartimentalización de la señal generada, regulando el acceso del AMPc a sus efectores.

Las PDEs han sido divididas en tres clases (Nikawa y col., 1987; Sass y col., 1986; Richter, 2002):

Clase I: Incluye todas las PDEs descritas en mamíferos así como también otras PDEs descritas en eucariotas inferiores como *S. cerevisiae* (Sass y col., 1986), *D. discoideum* (Thomason y col., 1998) y *T. brucei* (Seebeck y col., 2001). Las enzimas de esta clase se caracterizan por presentar una considerable homología de secuencia en su dominio catalítico (30-50 %) y una alta afinidad por el sustrato ($K_m = 0.5-10 \mu M$).

Clase II: Las enzimas de esta clase han sido identificadas solamente en *S. cerevisiae* (Nikawa y col., 1987), *D. discoideum* (Lancombe y col., 1986), *Vibrio fischeri* (Callahan y col., 1995), *C. albicans* (Hoyer y col., 1994) y *L. mexicana* (Rascón y col., 2000). Estas se caracterizan por no presentar homología de secuencia con las PDE de clase I y por tener una menor afinidad por su sustrato.

Clase III: Es una nueva clase creada para incluir la PDEs de procariotas que no pertenecen a ninguna de las otras dos clases (Richter, 2002).

3.1- Clase I

3.1.1- Familias y estructura

Dentro de esta clase de enzimas las PDEs de mamíferos han sido las más ampliamente estudiadas. Once familias han sido descritas basándose en sus propiedades bioquímicas y farmacológicas, su distribución tisular, su localización subcelular, su especificidad de sustratos y sus mecanismos de regulación. Cada una de estas familias esta compuesta por 1 a 4 isoformas distintas, habiéndose identificado hasta el momento 21 genes diferentes. Añadiendo más complejidad a esta clase de PDEs, algunos de estos genes codifican para más de una proteína, ya sea por splicing alternativo o por el uso de promotores alternativos, existiendo así más de 50 posibles isoformas en células de mamíferos (Mehats y col., 2002; Torphy, 1998).

Como se detalla en la Tabla II, las 11 familias descritas incluyen fosfodiesterasas específicas de AMPc, de GMPc y duales. Todas ellas presentan una estructura similar, con un dominio catalítico conservado cercano al extremo carboxilo-terminal y los dominios regulatorios principales en la región amino-terminal (Figura 6). El sitio catalítico de todas las PDEs de mamíferos presenta la secuencia consenso HD(X2)H(X4)N que incluye los dominios de unión a los metales Zn^{+2} y Mg^{+2} . Las regiones fuera del dominio catalítico son variables entre las distintas familias pero se encuentran conservadas dentro de una misma familia. Parte de estas secuencias están involucradas en la regulación y localización específica de los miembros de distintas familias, e incluyen sitios de fosforilación, dominios de unión a pequeñas moléculas y dominios de interacción proteína-proteína (Figura 6). Además de la homología de secuencia, los miembros de una misma familia comparten propiedades farmacológicas, muchas veces distintas a los miembros de otras familias, lo cual permite el desarrollo de inhibidores específicos (Mehats y col., 2002; Soderling y Beavo, 2000).

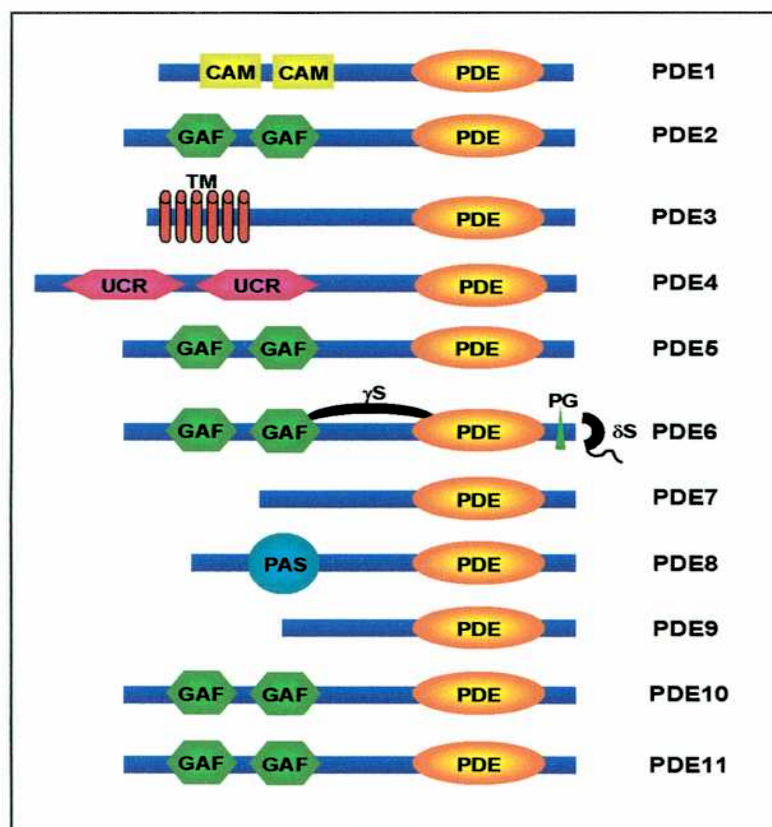


Figura 6. Estructura de las 11 familias de PDEs de mamíferos.

CAM: dominios de unión a Ca-calmodulina

GAF: dominios de unión de GMPc

TM: dominios trans-membrana

UCR: regiones río arriba conservadas

γS: subunidad gama

δS: subunidad delta

PG: dominios de adición de grupos lipídicos

PDE: dominio catalítico de fosfodiesterasa.

3.1.2- Regulación

Las PDEs pueden ser reguladas por diversos mecanismos permitiendo un amplio entrecruzamiento con distintas vías de transducción de señales (Tabla II; Torphy, 1998; Houslay, 1998; Soderling y Beavo, 2000). El ejemplo más claro es el de la familia PDE1 cuyos miembros son activados por la unión del complejo Ca^{+2} -calmodulina a dos dominios amino-terminales de la PDE (Figura 6). De esta manera, los agentes capaces de aumentar los niveles de calcio producen una activación de esta familia de PDEs y una disminución de los niveles intracelulares de AMPc o GMPc (Erneux, 1985).

La presencia de sitios de unión a nucleótidos cíclicos en otras familias permite una integración de las vías de señalización por AMPc y GMPc. En el caso de la PDE2 aumentos en los niveles de GMPc activan alostericamente esta enzima e inducen una disminución en los niveles de AMPc (Whalin y col., 1991). Por otro lado, el GMPc inhibe competitivamente la hidrólisis de AMPc por la PDE3 (Tabla II; Harrison y col., 1986).

Familia	Nº de genes	Especificidad	Regulación	Inhibidor
PDE1	3	Dual	↑ Ca ²⁺ /CAM, ↓ PKA, ↓ CAMK II	Vinpocetine, W-7, Fenotiazinas, IBMX
PDE2	1	GMPc>AMPc	↑ GMPc	EHNA, IBMX
PDE3	2	Dual	↓ GMPc, ↑ PKA, ↑ PKB /AKT	Milrinone, Trequisin, IBMX
PDE4	4	AMPc	↑ PKA, ↓ ERK2	Rolipram, IBMX
PDE5	1	GMPc	PKA, PKG ↑↓?, γ Subunidad?	Dipiridamole, Zaprinast, IBMX
PDE6	4	GMPc	↓ γ Subunidad	Dipiridamole, Zaprinast, IBMX
PDE7	2	AMPc		IBMX, Dipiridamole
PDE8	2	AMPc	Oxígeno?	Dypiridamole
PDE9	1	GMPc	?	
PDE10	1	Dual	↓ AMPc?	IBMX, Zaprinast, Dipiridamole
PDE11	1	Dual	?	IBMX

Tabla II. Propiedades de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos de mamíferos. IBMX, 3-isobutil-1-metilxantina, EHNA, eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil) adenosín-hidrocloreuro.

El análisis de las secuencias proteicas de las distintas familias llevó a la identificación de distintos dominios de unión a ligandos. Se ha determinado que las familias PDE2, 5, 6, 10 y 11 presentan dominios GAF de unión a GMPc (Figura 6, Ho y col., 2001; Soderling, 2000; Torphy, 1998). El hecho de que varias de estas proteínas no sean capaces de unir este segundo mensajero y que estos dominios han sido descritos en proteínas como el factor de transcripción fh1A de bacterias, organismos carentes de GMPc, sugiere que los dominios GAF podrían tener otra función.

En el caso de la PDE8 se identificó la presencia de un dominio PAS (Figura 6; Pre-ARTN-Sim). En varias proteínas, este dominio está involucrado en la homodimerización e interacción con proteínas que regulan la localización subcelular. Interesantemente, se ha reportado que este dominio actúa como un sensor de oxígeno y luz en *Archea*. A pesar de que en la PDE8 su función es desconocida, de alguna manera

podría estar involucrado en sensor el ambiente extracelular e intracelular (Soderling, 1998; Soderling y Beavo, 2000; Mehats y col., 2002)

Además de la regulación por distintos ligandos, las PDEs son reguladas por fosforilación (Tabla II). Entre las quinasas reportadas de regular la actividad de estas enzimas se encuentran la PKA, la CAMK, la quinasas de proteínas dependiente de GMPc (PKG) y la quinasa de proteínas B (PKB o AKT), entre otras (Ang y Antoni, 2002; Murthy, 2001; Laliberte y col., 2002; Mehats y col., 2002; Hashimoto y col., 1989; Liu y Maurice, 1999).

3.1.3- Localización subcelular

La actividad de algunas familias de PDEs es también regulada por la localización de las mismas dentro de la célula. La localización de PDEs en distintos compartimientos subcelulares fue sugerida al observar que en algunos tipos celulares la actividad fosfodiesterasa se encontraba asociada tanto a la fracción soluble como a la particulada (Strada y col., 1984).

Se ha demostrado que la PDE3 puede anclarse a la membrana del retículo endoplasmático a través de dominios hidrofóbicos presentes en su extremo amino-terminal (Figura 6; Shakur y col., 2000). Por otra parte, el anclaje de algunas isoformas de la PDE4 depende de la interacción con proteínas como la proteína RACK-1 primero identificada por la unión de PKC (Yarwood y col., 1999). Algunas PDE4 presentan además dominios ricos en prolina lo cual les permite la interacción con proteínas que presentan dominios SH3 (Beard y col., 1999; 2002; Mehats y col, 2002). También se ha reportado que el anclaje de la PDE6 a la membrana depende de la presencia de grupos carboximetilo o residuos hidrofóbicos agregados por modificaciones post-traduccionales (Florio y col., 1996; Qin y col., 1992; Qin y Baehr, 1994; Anant y col, 1992).

3.1.4- Inducción de la actividad PDE y función homeostática

Se ha observado que durante la activación de la adenilil ciclasa a través de un receptor de membrana se produce un aumento en la actividad fosfodiesterasa de AMPc. Las evidencias acumuladas con isoformas de las familias PDE3 y 4 permiten proponer dos tipos de mecanismos (Figura 7):

Regulación a corto plazo: Este mecanismo involucra la fosforilación y activación de PDE existentes en la célula a través de la PKA (Figura 7). Esta regulación mediada por PDE3 y 4 tendría un papel central en control de la magnitud y duración de la señal de AMPc permitiendo rápidas variaciones en la concentración del segundo mensajero (Oki y col., 2000; Liu y Maurice, 1999).

Regulación a largo plazo: En este caso se requiere de la síntesis “*de novo*” de PDEs y puede tardar de horas a días. Esta regulación ha sido principalmente estudiada para la familia PDE4 aunque también ha sido observada en otras familias. Un aumento prolongado de los niveles de AMPc en la célula induce un aumento específico en la transcripción de genes que codifican para PDEs a través de la actividad de PKA/CREB. Este aumento, junto con un aumento en la estabilidad del mensajero también regulado por AMPc, lleva finalmente a un incremento en la expresión de la enzima (Figura 7). El mecanismo se revierte en forma lenta solo cuando disminuye la actividad adenilil ciclasa (Conti, 2000; Swinnen y col., 1991).

Este proceso de inducción parece ser un mecanismo homeostático universal por el cual las células regulan la respuesta a hormonas y factores que estimulan la actividad de la adenilil ciclasa aumentando la actividad fosfodiesterasa de AMPc.

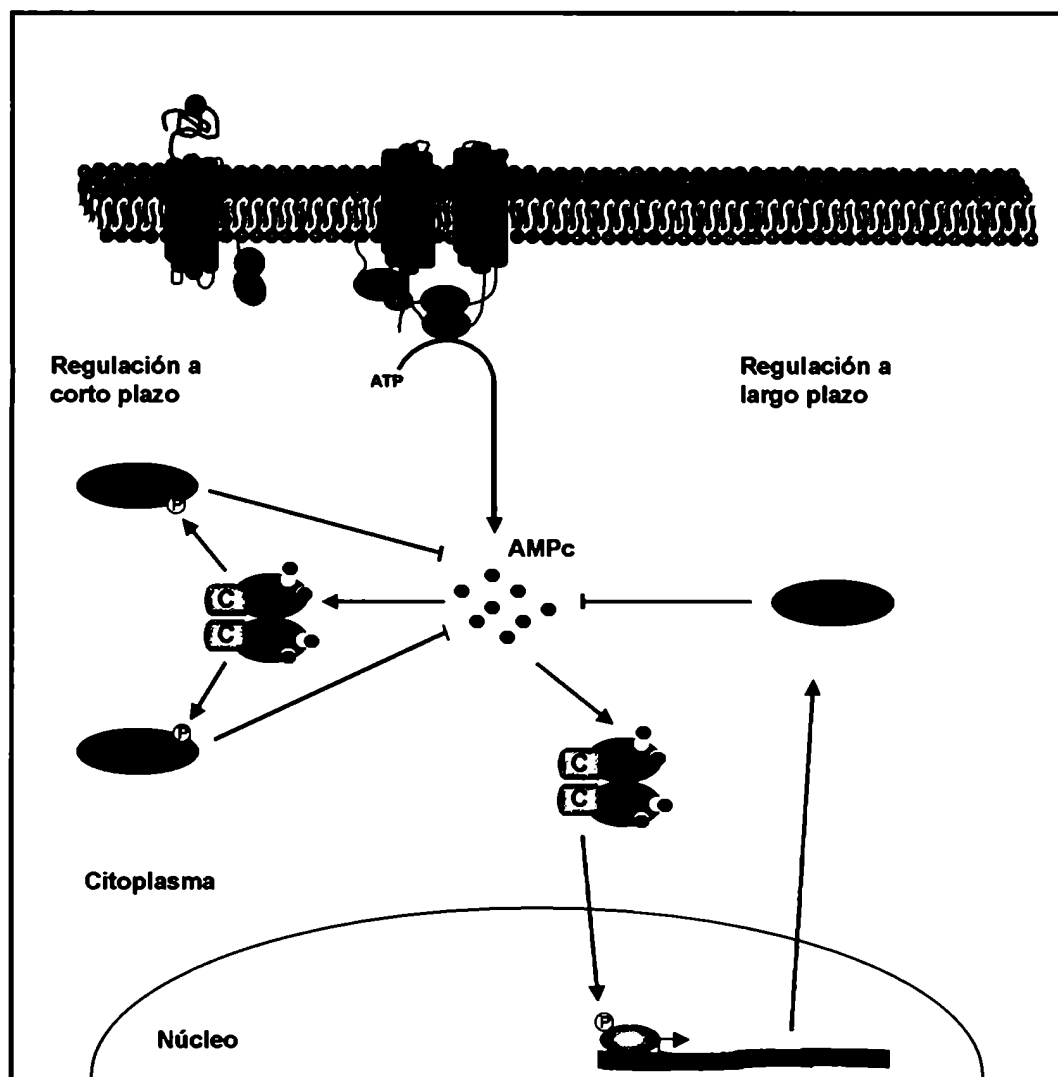


Figura 7. Mecanismos de regulación a corto y largo plazo de la inducción de la actividad fosfodiesterasa.

3.1.5- Fosfodiesterasas y enfermedad

Varios descubrimientos claves llevaron a que, durante las últimas décadas, las PDEs se hayan convertido en importantes blancos terapéuticos. Utilizando técnicas de cromatografía, a principios de los años 70 se identificó la presencia de distintas actividades de PDE asociadas a distintos tipos celulares y tejidos. Esta fue la primera evidencia de que estas enzimas eran parte de una familia de proteínas e impulsó la búsqueda de inhibidores específicos que pudieran diferenciar las distintas isoformas. A finales de los años 70 y principio de los 80 se reportó que distintas moléculas orgánicas podían inhibir específicamente isoformas de PDE con propiedades cinéticas diferentes.

Estos descubrimientos estimularon la búsqueda de nuevos inhibidores más potentes y selectivos. La aplicación de técnicas de biología molecular permitió grandes avances en este tema y llevó a la identificación de un gran número de inhibidores específicos de las distintas familias identificadas. Muchos de estos inhibidores son hoy utilizados para el tratamiento del asma, la artritis, enfermedades autoinmunes, inflamación, e impotencia. El éxito obtenido con el inhibidor de PDE sildefanil, conocido comúnmente como Viagra, para el tratamiento de la impotencia muestra lo efectivo que estos inhibidores pueden ser (Torphy, 1998; Torphy y Page, 1999; Soderling y Beavo, 2000; Huang y col., 2001).

3.2- Clase II

Las PDEs de esta clase han sido descritas en *C. albicans*, *D. discoideum*, *S. cerevisiae*, *Vibrio fischeri* y *L. mexicana*.

La PDE1 de *C. albicans* es una fosfodiesterasa de especificidad dual, capaz de hidrolizar tanto GMPc como AMPc. Esta enzima presenta una baja homología con las PDEs de mamíferos además de tener una muy baja afinidad por sus sustratos ($K_m = 0.25$ y 0.49 mM respectivamente; Hoyer y col., 1994).

En el caso de *D. discoideum*, la PDE perteneciente a esta clase es secretada al medio extracelular en donde regula los niveles de AMPc y consecuentemente las señales quimiotácticas en este organismo. Se ha identificado una glicoproteína inhibidora de esta enzima, también secretada por la ameba. A bajas concentraciones de AMPc el inhibidor se une a la PDE y aumenta su K_m de $5 \mu\text{M}$ a 5 mM (Lancombe y col., 1986).

S. cerevisiae es un caso muy interesante ya que presenta sólo dos PDEs, una de clase I (PDE 1) y otra de clase II (PDE 2) (Nikawa y col., 1987; Sass y col., 1986).

La PDE de *V. fischeri* corresponde a una enzima localizada en el periplasma de este organismo. Esta localización de la enzima le permite a la bacteria degradar AMPc

externo y utilizarlo como una fuente de carbono. (Dunlap y Callahan, 1993; Callahan y col., 1995).

En *L. mexicana* sólo se ha sido descrito una actividad PDE. La Km obtenida incluiría a dicha enzima dentro de esta clase (Rascón y col., 2000).

3.3- Clase III

Esta clase ha sido recientemente creada para incluir la fosfodiesterasa de AMPc CpdA de *E. coli* y otras PDEs de procariotas identificadas por homología con dicho gen. Esta clase de enzimas parece tener un mecanismo catalítico distinto al de las fosfodiesterasas descritas, que depende de la unión de iones Fe^{+3} y es similar al mecanismo catalítico de la fosfatasa ácida púrpura (Richter, 2002).

4- Calcio

De todos los segundos mensajeros descritos el Ca^{+2} es probablemente el más importante. En 1883 Sydney Ringer reportó que el Ca^{+2} era necesario para mantener los latidos del corazón de rana, demostrando por primera la importancia biológica del ión. Desde ese momento y hasta el día de hoy, numerosos descubrimientos han demostrado que el calcio está involucrado en numerosos procesos como la fertilización de óvulo, el desarrollo de los tejidos, la conducción del impulso nervioso, la contracción muscular, el crecimiento en las plantas, el metabolismo, el aprendizaje, la memoria, etc. Constantemente son identificadas nuevas funciones para este catión y cada vez resulta más difícil encontrar algún proceso fisiológico en el cual el calcio no tenga un papel fundamental.

Las señales de calcio generalmente son el resultado de la apertura de canales específicos. Estos canales se encuentran localizados principalmente en la membrana plasmática, en el retículo endoplasmático o en el retículo sarcoplasmático. La presencia de distintos canales y la diferente regulación de cada uno de ellos les permite a las células responder a diversos estímulos y producir una respuesta específica en cada tejido o tipo celular.

Cuando estos canales son activados se produce la entrada de calcio en el citoplasma. Como los mismos permanecen abiertos sólo un período muy corto de tiempo, e introducen pequeños pulsos de calcio en el citoplasma, inicialmente se genera una alta concentración del ión en una pequeña área cercana al canal. Esta alta concentración local da lugar a lo que se llama señal primaria de Ca^{+2} (Figura 8A). La señal primaria es de corta duración ya que el catión difunde del sitio de salida para dar lugar a la denominada señal global de calcio (Figura 8A; Berridge y col., 1999; Bootman y col., 2001; Bootman y Berridge, 1995; Berridge 1997).

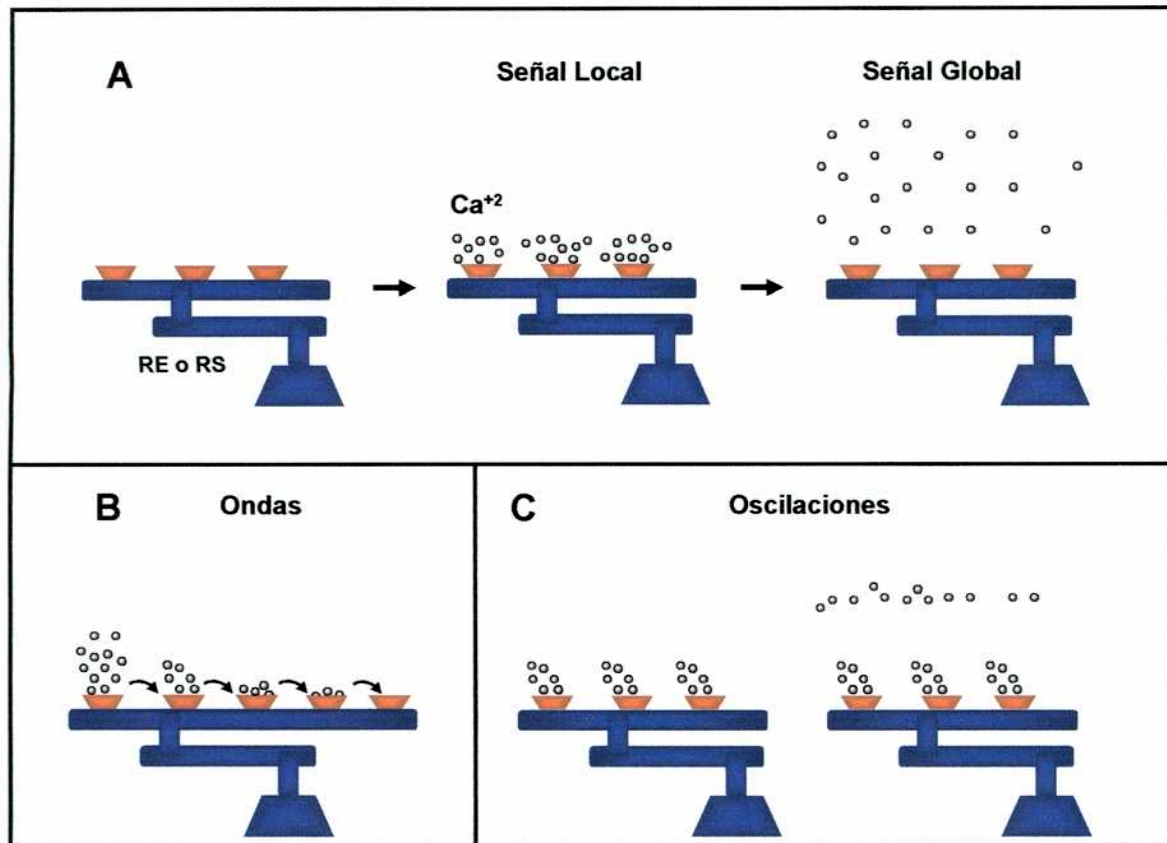


Figura 8. Señales de calcio. A, Señal local y global de calcio. B, Generación de ondas de calcio. C, Generación de oscilaciones de calcio.

Las señales primarias tienen la ventaja de ser altamente localizadas (1-6 μM) y permiten un control local de muchos procesos fisiológicos como la liberación de vesículas sinápticas, la activación de canales iónicos y la generación de señales nucleares de calcio. Como la concentración de Ca^{+2} decae rápidamente con la distancia, es necesario que el canal y sus efectores se encuentren muy cerca unos de otros. Esto permite un efecto altamente específico del ión, el cual que se encuentra fuertemente influenciado por el tipo de canal o receptor responsable de la liberación del mismo. Además de esto, las señales primarias tienen un efecto muy rápido y un bajo costo energético, de forma contraria a lo que sucede con las señales globales (Berridge y col., 1999; Bootman y col., 2001; Bootman y Berridge, 1995; Berridge 1997).

Una vez generadas, las señales primarias dan lugar a las señales globales, ya sea como oscilaciones u ondas de Ca^{+2} (Figura 8B y C). La amplitud y frecuencia de estas oscilaciones son de gran importancia para la señal. Se ha demostrado que una frecuencia óptima en las oscilaciones intracelulares de calcio es importante para la expresión de

varios genes. Generalmente, las respuestas globales se generan a partir de la producción coordinada de muchas señales primarias. Los mecanismos por los cuales se obtiene esta señal son específicos de cada tipo celular y consecuencia de un balance entre la entrada de Ca^{+2} extracelular y la salida de Ca^{+2} de los depósitos intracelulares (Berridge y col., 1999; Bootman y col., 2001; Bootman y Berridge, 1995; Berridge 1997).

La información codificada en las señales de Ca^{+2} es descifrada por un grupo de proteínas que unen este segundo mensajero y convierten la señal en una gran variedad de procesos biológicos. Algunas de estas proteínas, como la PKC, unen Ca^{+2} y regulan directamente distintos efectores en forma Ca^{+2} dependiente. Otras proteínas que unen Ca^{+2} actúan como intermediarios entre esta señal y los cambios biológicos producidos. Dentro de este último grupo se encuentra una familia de proteínas que se caracteriza por presentar un dominio estructural de unión a Ca^{+2} conocido como *EF-Hand* (Lewit-Bentley y Réty, 2000). Estas proteínas responden a Ca^{+2} de dos maneras distintas; un primer grupo incluye proteínas, como la parvalbumina y la calbindina, que no sufren ningún cambio conformacional al unir el catión y funcionan principalmente como tampones o transportadores de Ca^{+2} . El segundo grupo incluye proteínas que sufren un cambio conformacional al unir al catión y actúan así como sensores de Ca^{+2} . Entre las proteínas mas conocidas de este último grupo se encuentran la troponina C, involucrada en la regulación de la contracción muscular, la proteína multifuncional calmodulina, las proteínas de la familia S100 y las proteínas miristoiladas como la recoverina (Chin y Means, 2000).

De estas proteínas la calmodulina ha sido probablemente la más intensamente estudiada. Esta presenta cuatro dominios *EF-Hand* de unión a Ca^{+2} y se expresa en todas las células eucariotas en donde regula diversos procesos como el crecimiento, la proliferación y el movimiento (Chin y Means, 2000).

Como fue previamente mencionado, a través de la calmodulina, calcineurina, PKC, CAMKs y probablemente otras proteínas, el Ca^{+2} puede regular la actividad de las enzimas de la vía de AMPc y también sus efectores. De la misma manera, el AMPc puede regular los componentes de la vía de señalización del Ca^{+2} , ya sea directamente o a través de la PKA. Muchos procesos celulares son regulados conjuntamente por ambos

segundos mensajeros estando claramente establecido que existe una importante interacción entre ambas vías de señalización.

5- Compartimentalización de las señales de Ca^{+2} y AMPc

El mecanismo de acción del AMPc y el Ca^{+2} podría describirse simplemente de la siguiente manera: un estímulo extracelular produce un aumento intracelular de los niveles de los segundos mensajeros los cuales se unen a sus moléculas efectoras, modifican su actividad y producen finalmente una respuesta biológica específica. Este proceso, aparentemente sencillo, enmascara complejos mecanismos que permiten que las mismas moléculas regulen un gran número de procesos fisiológicos distintos y muchas veces antagónicos. La gran versatilidad que se puede obtener a partir de estas moléculas es posible debido a la existencia de distintas cinéticas y amplitudes de las señales así como también la existencia de distintos patrones espacio-temporales.

A lo largo de los años se ha demostrado que el citoplasma no es un único compartimiento en donde las moléculas pueden moverse libremente sino que esta lleno de organelas y estructuras altamente localizadas. Se sabe que muchas de estas organelas, así como también muchas estructuras celulares, se encuentran en un equilibrio dinámico, con un continuo intercambio de sus componentes y no como estructuras rígidas. Durante los últimos años se ha demostrado que los segundos mensajeros pueden actuar localizadamente o a través de gradientes, los cuales dependen del sitio de producción, del equilibrio acumulación/degradación y de las constantes de difusión de los mismos en el citoplasma (Zaccolo y col, 2002; Schwartz, 2001; Houslay y Milligan, 1997).

Es indiscutible que el Ca^{+2} actúa a través de gradientes locales. La presencia de estos gradientes locales puede obtenerse y regularse gracias a la entrada de Ca^{+2} por diferentes canales iónicos, a la captura o salida del mismo a través bombas e intercambiadores de Ca^{+2} y a la lenta difusión del mismo dentro del citoplasma producida por la presencia de altas concentraciones de sitios de unión a Ca^{+2} prácticamente inmóviles (Zaccolo y col, 2002; Berridge y col., 1999; Bootman y col., 2001; Berridge, 1997).

El AMPc, en cambio, es generado casi exclusivamente en la membrana plasmática, degradado en gran parte en el citoplasma, y tiene una velocidad de difusión

entre 10 y 50 veces mayor a la del calcio. A pesar de esto, muchas evidencias apuntan a una acción del mismo en forma localizada. Utilizando quimeras de las subunidades de la PKA con la proteína fluorescente GFP se ha demostrado la existencia localizada de señales de AMPc tras la estimulación con un agonista β -adrenérgico (Figura 9; Zaccolo y Pozzan, 2002). Estas señales localizadas parecen ser necesarias para limitar la activación de determinadas poblaciones de PKA. La acción del AMPc en ciertas regiones de la célula puede ser utilizada para evitar la generación de otras señales no deseadas. En el caso de los miocardiocitos, este tipo de señales permitiría regular la contracción muscular sin tener otros efectos secundarios de la señalización de AMPc, como variaciones en la expresión de genes (Zaccolo, 2002; Schwartz, 2001).

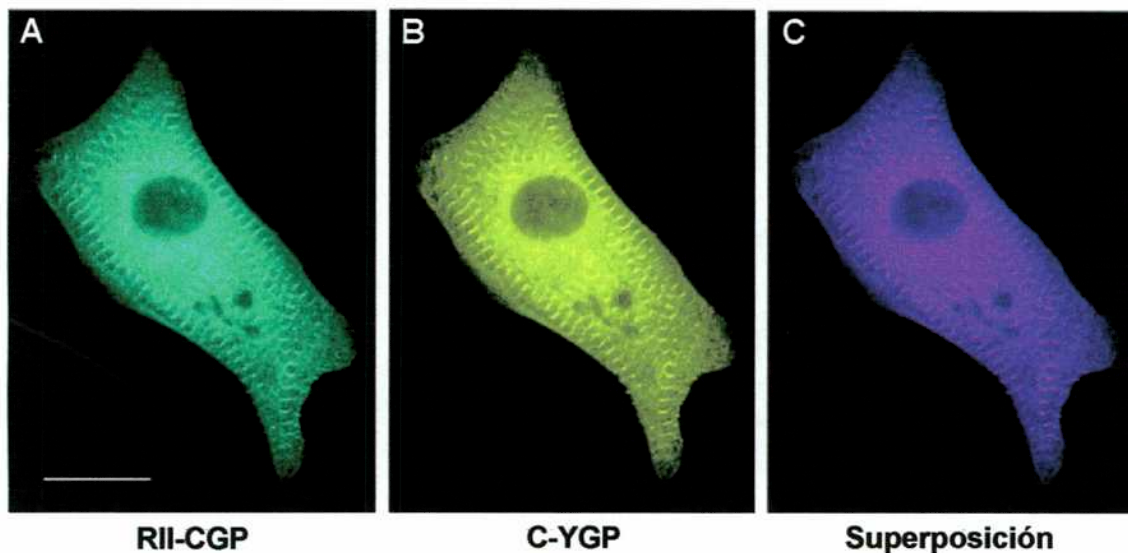


Figura 9. Señales de AMPc locales. A y B, Señal de AMPc localizada en miocardiocitos cotransfectados con la subunidad RII de la PKA fusionada a la proteína fluorescente CFP (RII-CFP) y la subunidad C de la PKA fusionada a la proteína fluorescente YFP (C-YFP), y estimulados con el agonista adrenérgico norepinefrina. C, Muestra la superposición de ambas señales fluorescentes. (Zaccolo y Pozzan, 2002).

Se ha demostrado que algunas moléculas de PKA se encuentran asociadas a compartimientos subcelulares específicos como el núcleo, la mitocondria, el retículo endoplasmático, la membrana plasmática, el citoesqueleto y el centrosoma. El anclaje de la PKA a estas organelas esta mediado por proteínas denominadas AKAPs (Figura 10; Colledge y Scott, 1999; Feliciello y col., 2001; Griffioen y Thevelein, 2002). Estas proteínas permiten una especificidad de la señal de AMPc manteniendo la quinasas

próxima a sus efectores o blancos. Las AKAPs también permiten el anclaje directo de la PKA a canales iónicos sustratos de esta enzima como el CFTR, el receptor de NMDA, de AMPA y a ciertos canales de Ca^{+2} (Figura 10). Probablemente el resultado más interesante con respecto estas proteínas ha sido el descubrimiento de que una isoforma de la familia PDE4 inmunoprecipita junto con la subunidad RII de la PKA y con dos proteínas AKAPs. Esto sugiere la existencia de PDE y PKA juntas en un complejo formado por las proteínas de anclaje (Mehats y col., 2002; Schwartz, 2001).

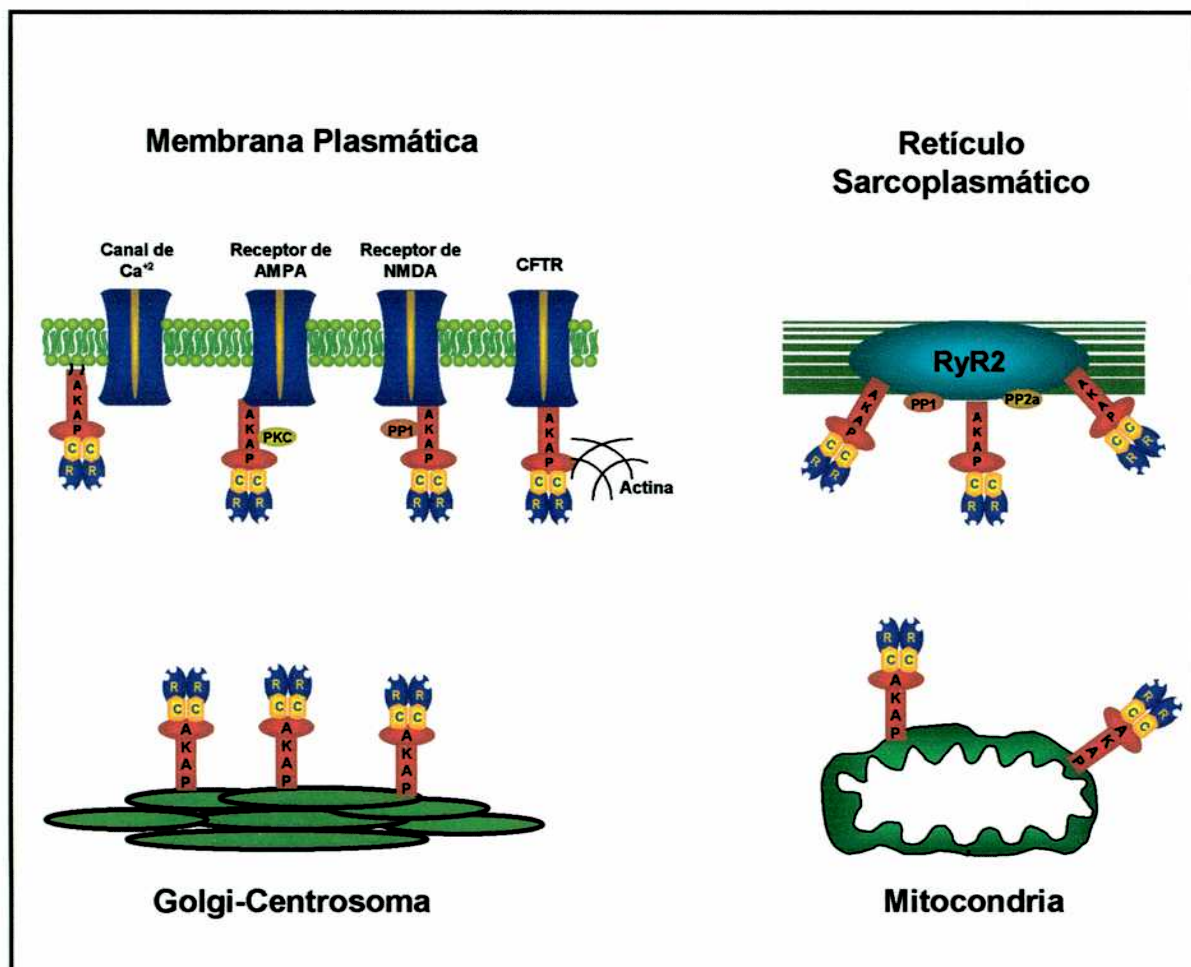


Figura 10. Anclaje de PKA a través de AKAPs a distintas organelas subcelulares. AKAP, proteína de anclaje de PKA, PP1, fosfatasa de proteínas tipo 1, AMPA, NMDA, CFTR, RyR2, receptor de rianodina, PP2a, fosfatasa de proteínas tipo 2A.

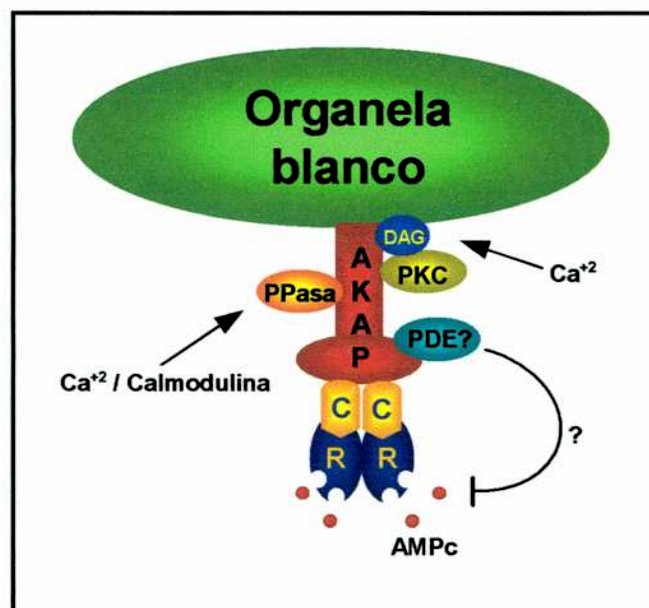


Figura 11. Complejos de señalización formados en las AKAPs. PPasa, fosfatasa, DAG, diacilglicerol, PDE, fosfodiesterasa.

De esta manera, la señal localizada puede lograrse gracias a la acción conjunta de AKAPs, PKA, PDE y probablemente otras moléculas todavía no identificadas. Las AKAPs permiten la formación de complejos moleculares de señalización en los cuales pueden coexistir los receptores generadores de la señal, las PKAs efectoras, las PDE y otras moléculas reguladoras como PKC y calcineurina (Figura 11; Mehats y col, 2002; Colledge y Scott, 1999; Feliciello y col., 2001; Griffioen y Thevelein, 2002). Así, estas proteínas de anclaje son responsables de la formación de complejos que aseguran una señal localizada y altamente controlada debido a la presencia de moléculas efectoras y reguladoras que permiten terminar rápidamente la señal generada.

Para obtener una señal localizada es también necesario controlar la difusión del segundo mensajero de manera de evitar la producción de señales en regiones no deseadas de la célula. Se ha descrito que las PDEs tienen un papel fundamental en la regulación de la difusión, así como también en la generación de gradientes de AMPc. El agregado de inhibidores de PDE a miocardiocitos estimulados con agonistas adrenérgicos evita la formación de las estrías de AMPc y consecuentemente la señal localizada (Figura 9B; Zaccolo y col., 2002). La diferente localización subcelular de las distintas isoformas de PDEs hace más evidente el hecho de que estas enzimas cumplen

un papel crucial en el control de este proceso. Apoyando esta hipótesis se ha reportado que PDEs de la familia 4 de mamíferos translocan a la membrana plasmática tras la estimulación de un receptor adrenérgico por su ligando. Esta traslocación produce un aumento de la actividad hidrolítica de AMPc cerca del sitio de síntesis del mismo (Perry y col., 2002). Así, la degradación localizada de AMPc parece ser uno de los mecanismos principales de regulación de la difusión del segundo mensajero (Zaccolo, 2002; Schwartz, 2001; Houslay y Milligan, 1997).

6.1- Tripanosomátidos

Los tripanosomátidos son una gran familia de parásitos flagelados pertenecientes al orden kinetoplástico. Estos organismos suelen ser llamados parásitos digenéticos para describir su alternancia entre dos organismos, más comúnmente un insecto y un mamífero. Sin embargo, además de mamíferos los tripanosomátidos son capaces de infectar un gran número de otros organismos como plantas, peces, anfibios y pájaros.

Los tripanosomas representan uno de los primeros linajes de células eucariotas con mitocondria, teniendo una antigüedad de entre 300-500 millones años. Probablemente como resultado de esta tan antigua divergencia es que presentan varias estructuras y características biológicas únicas lo cual los hace un modelo de estudio muy interesante. Estas células presentan muchos de los componentes comunes de una célula como el núcleo, el retículo endoplasmático, el aparato de golgi y el citoesqueleto, pero entre otras estructuras distintas, presentan una única mitocondria y una estructura en la base del flagelo que se conoce con el nombre de kinetoplasto. Inicialmente se creyó que el kinetoplasto era de alguna manera el motor de la célula, de ahí el termino kineto en el nombre del orden. Sin embargo, hoy se sabe que esta organela no es otra cosa que el genoma de la mitocondria, el cual se encuentra formado por cientos de minicírculos y maxicírculos de ADN concatenados. El flagelo de estos parásitos presenta una estructura de un axonema típico, pero además presenta una estructura filamentosa única denominada *paraflagellar rod* que se extiende en forma paralela al axonema a lo largo del flagelo. Además de esto, las enzimas glicolíticas en tripanosomas no se encuentran libres en el citoplasma como es común en células eucariotas, sino que se encuentran dentro de organelas membranosas denominadas glicosomas (Simpson, 1998). Como ejemplo, la figura 12 muestra la estructura de una célula de uno de los miembros de esta familia de tripanosomátidos, el parásito *Trypanosoma cruzi*.

Es importante mencionar también que en estos organismos la regulación de la expresión esta controlada principalmente a nivel de la estabilidad de los ARN

mensajeros y no a nivel de la regulación de la transcripción. Las evidencias acumuladas muestran una transcripción policistónica, la ausencia de regiones promotoras y factores de transcripción, y la presencia de un mecanismo de trans-splicing por el cual una secuencia conservada de 39 nucleótidos es agregada al extremo 5' de todos los ARN mensajeros. Finalmente, estos parásitos un mecanismo de edición del ARN en la mitocondria por el cual más de la mitad de los genes codificados en los maxicirculos son modificados después de su transcripción por el agregado o remoción de residuos uridina en sitios específicos. Este proceso es guiado por pequeños ARNs codificados en los minicirculos de dicha organela (Simpson, 1998).

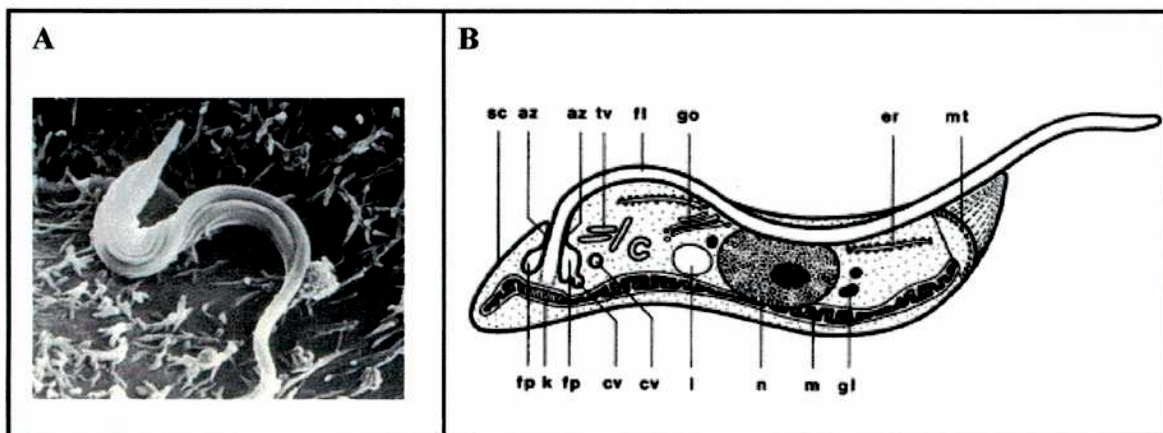


Figura 12. Morfología del parásito *T. cruzi* estadio tripomastigote. A, Microscopía electrónica de barrido, B, Estructura subcelular. Sc, cubierta de superficie, az, zona de unión del flagelo (*attachmment zone*), tv, vesículas tubulares, fl, flagelo, go, golgi, er, retículo endoplasmático, mt, microtúbulos, fp, bolsillo flagelar (*flagellar pocket*), k, kinetoplasto, cv, vesículas recubiertas, l, lisosomas, n, núcleo, m mitocondria, gl, glicosomas.

Además de ser sumamente interesante para el estudio de novedosos procesos, un pequeño grupo de estos tripanosomátidos son patógenos de humanos. Dentro de este grupo se encuentran el *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, el *Trypanosoma brucei*, causante de la enfermedad del sueño y los organismos relacionados *Leishmania*, responsables de la Leishmaniasis.

6.2- Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez en 1909 por Carlos Chagas. El Dr. Chagas se encontraba en Brazil trabajando en una campaña antimalaria

cuando describió por primera vez la presencia del parásito *Trypanosoma cruzi* en el intestino de un insecto triatomino. Poco tiempo después encontró la presencia de este parásito en un gato y quedó cautivado por la idea de que este organismo podría ser transmitido a humanos. Fue entonces cuando escucho que una niña de dos años de edad se encontraba enferma y con fiebre. El Dr. Chagas examinó la niña, encontrando que presentaba los ganglios linfáticos inflamados así como también el bazo y el hígado agrandados. Por medio de microscopia óptica determinó que gran parte de las células observadas presentaban parásitos con una morfología idéntica a la que había observado para *Trypanosoma cruzi*. La figura 13 muestra los parásitos dibujados en el trabajo original publicado por Carlos Chagas sobre *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909).

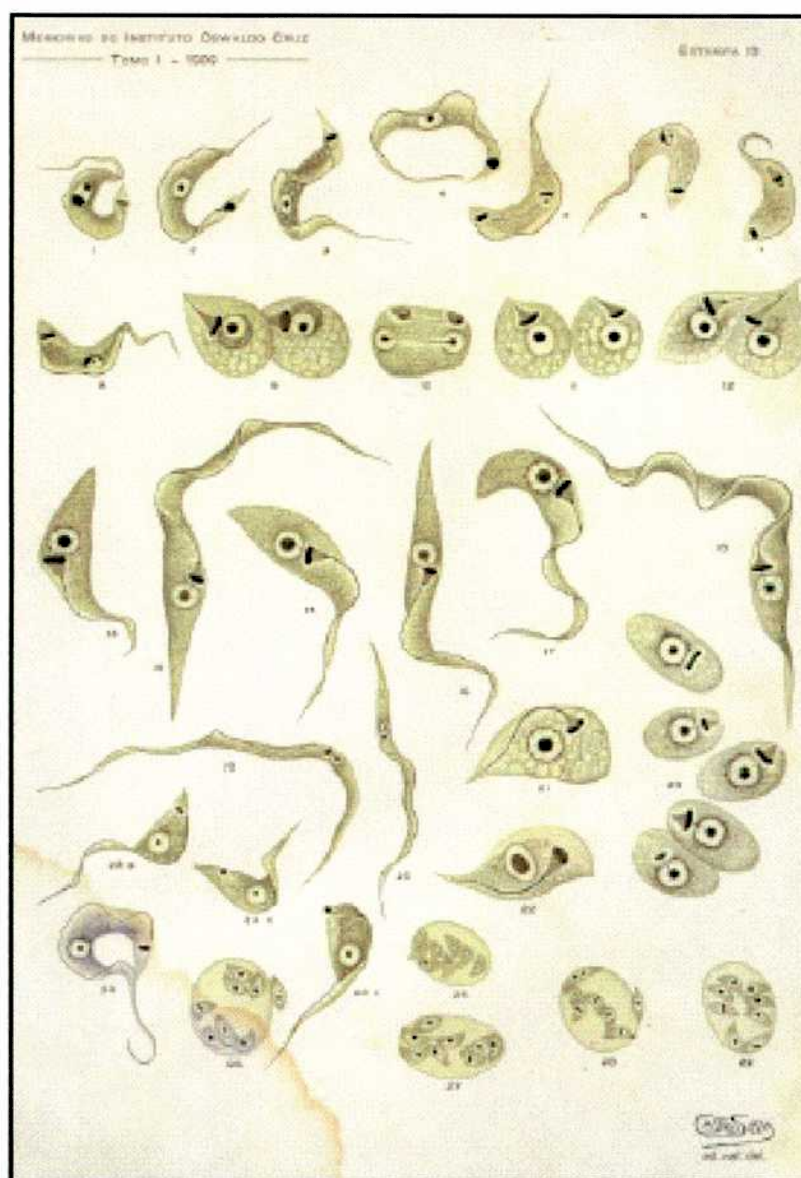


Figura 13. Morfología de los distintos estadios del parásito *T. cruzi* reportados en el trabajo original de Carlos Chagas.

La enfermedad de Chagas es la mayor endemia en América del sur y central, extendiéndose desde México hasta el sur de Argentina (Figura 14) y existiendo sólo en este continente. Según la organización mundial de la salud entre 18 y 20 millones de personas se encuentran infectadas con *T. cruzi* y entre 100 y 120 millones se encuentran en riesgo de infección, lo que representa un 25% de la población de América Latina (Organizacion Mundial de la Salud, OMS, 1996).

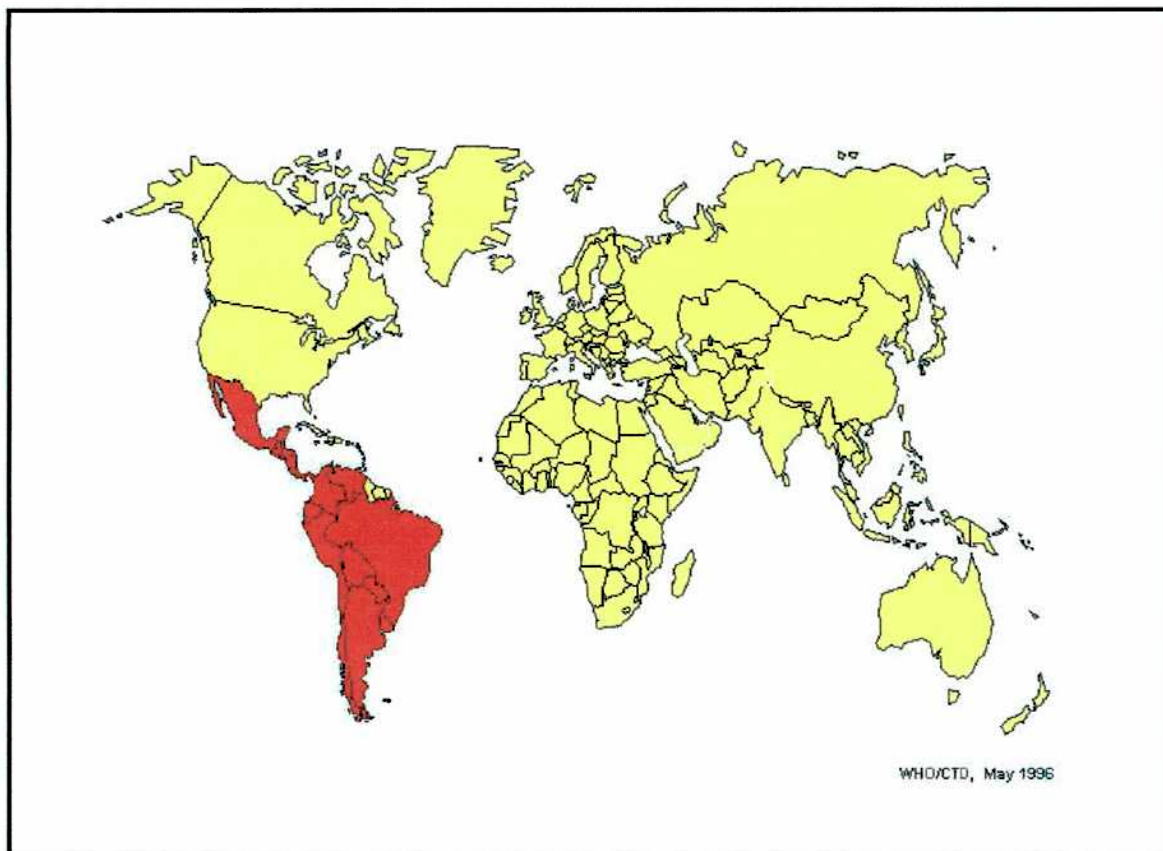


Figura 14. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas (OMS, 1996). Las zonas endémicas se encuentran coloreadas en rojo.

La enfermedad de Chagas se transmite a través de un insecto hematófago. Existe un amplio espectro de insectos vectores responsables de la transmisión de esta enfermedad siendo el *Triatoma infestans* o "Vinchuca" el más importante en la Republica Argentina (Figura 15).

Esta enfermedad se caracteriza por dos estadios principales: una fase aguda, que aparece rápidamente tras la infección, y una fase crónica, que puede durar varios años y afecta en forma irreversible distintos órganos internos.

Fase aguda: Esta fase generalmente sólo se observa en niños menores a 10 años y se caracteriza por fiebre, inflamación de ganglios linfáticos, agrandamiento de bazo e hígado y a veces por la presencia de un nódulo subcutáneo en el sitio de infección denominado chagoma. Si la infección se produce a través del ojo es posible observar un edema y conjuntivitis conocido como el síndrome de Romana. Sin embargo, generalmente esta fase es asintomática.

Fase crónica: Después de un período indeterminado en el cual los parásitos colonizan distintos órganos, entre un 10-30% de los individuos infectados pasan a la fase crónica de la enfermedad. Esta etapa se caracteriza por presentar muy bajos niveles de parásitos en sangre y por alteraciones en diversos órganos. Se puede producir un agrandamiento del corazón de hasta 3 veces el tamaño normal y observar la aparición de arritmias u otras alteraciones cardíacas (27% de los casos), siendo estas fallas la principal causa de muerte por esta enfermedad. En algunos pacientes se observa un agrandamiento del esófago y el colon (6%), produciéndose lo que se conoce como megaenfermedad. En este caso aparecen severos trastornos en la digestión. También es posible observar en pacientes chagásicos alteraciones en el sistema nervioso central (3%).

La enfermedad de Chagas es una enfermedad socio-económica típica, asociada a la pobreza y a la existencia de casas primitivas con pisos de tierra, paredes de adobe y techos de paja, las cuales son un lugar ideal para la proliferación del vector que la transmite (Figura 15B). Desde el lanzamiento de la iniciativa del “CONO SUR” en 1991 por la OMS, destinada a interrumpir la transmisión de esta enfermedad en países de América latina, se produjo una disminución de un 75% de la incidencia de casos en humanos en Argentina, Brazil, Chile, Uruguay y Paraguay. Desde 1997 y 1999, Uruguay y Chile han sido certificados países libres de transmisión. Lo mismo sucedió en el año 2000 con 10 de las 12 provincias endémicas de Brazil y 12 de las 19 regiones endémicas de Argentina.

A pesar de que el control de la transmisión a través de la eliminación del vector ha demostrado ser altamente eficiente, todavía no existen vacunas para la prevención de esta enfermedad ni drogas claramente efectivas para el tratamiento de los enfermos crónicos.

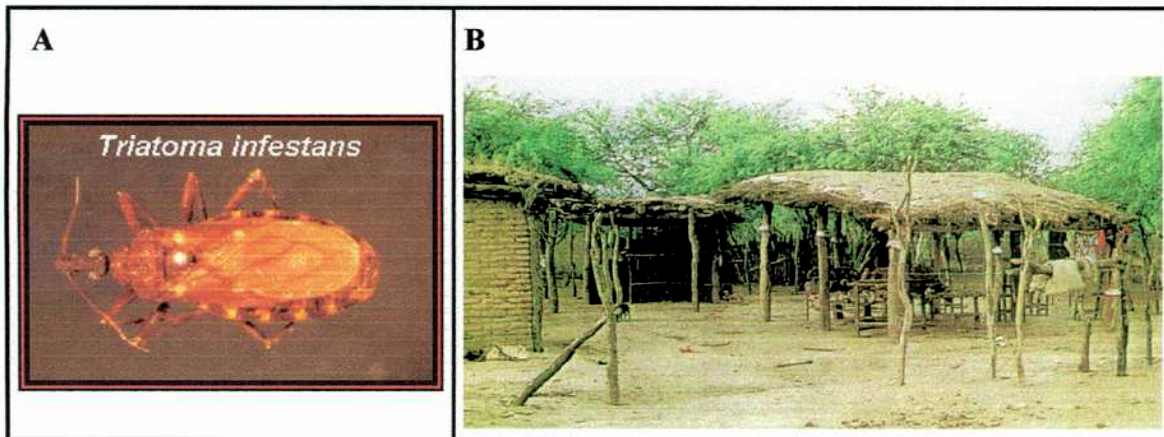


Figura 15. A, *Triatoma infestans* o vinchuca. Principal vector de transmisión en Argentina. B, Rancho, vivienda precaria en donde se favorece la proliferación del vector de transmisión.

6.3- Ciclo de vida de *T. cruzi*

El parásito *Trypanosoma cruzi* presenta un complejo ciclo de vida que involucra distintos estadios, alternando entre formas no replicativas e infectivas y formas replicativas no infectivas (Figura 16). Durante este proceso se producen complejos cambios en la bioquímica y en la morfología de este organismo.

Describiéndolo de forma simple, el ciclo de vida comienza cuando el vector hematófago infectado con *T. cruzi* se alimenta de sangre de un vertebrado. Mientras ingiere sangre el insecto defeca y libera con las heces formas infectivas del parásito denominadas tripomastigotes. Los tripomastigotes son células flageladas, no replicativas e infectivas. La picadura del insecto es indolora pero la saliva produce una respuesta alérgica que hace que el vertebrado se rasque y facilite la entrada de los tripomastigotes. Una vez en la sangre, los tripomastigotes pueden infectar todo tipo de células, pero principalmente infectan células musculares y macrófagos. Dentro de las

células, los tripomastigotes se diferencian a una forma no flagelada, replicativa y no infectiva, denominada amastigote. Los amastigotes intracelulares se dividen por fisión binaria para posteriormente rediferenciarse a la forma infectiva tripomastigote. Los nuevos tripomastigotes son liberados al romperse la célula infectada y entran nuevamente al torrente sanguíneo, dónde pueden infectar nuevas células y propagar la infección. Cuando un nuevo vector toma sangre del individuo infectado toma también tripomastigotes circulantes. Estos parásitos se mueven dentro del intestino del vector en donde se diferencian a una nueva forma, el epimastigote. Esta es otra forma extracelular flagelada capaz de dividirse pero no de infectar. Los epimastigotes se unen al intestino del vector en donde se multiplican aumentando el número de parásitos en el insecto. Finalmente, los epimastigotes se mueven al recto del insecto dónde se diferencian nuevamente a la forma infectiva y cierran el ciclo (Figura 16; De Souza, 2002).

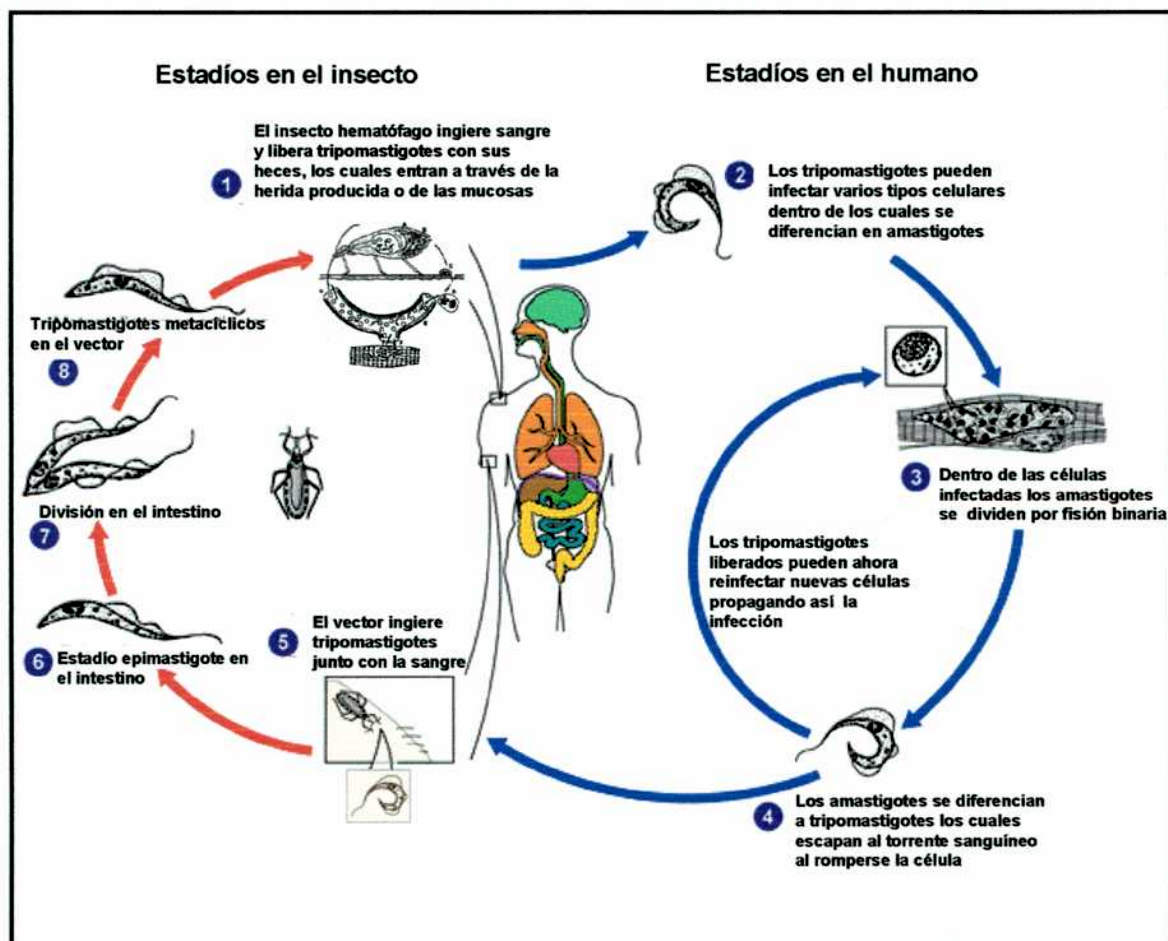


Figura 16. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

En los últimos años se ha reportado la existencia de nuevas formas del parásito tanto dentro del vector como en el hospedador vertebrado. Algunas de estas formas intermedias parecen estar más adaptadas para la infección de células del insecto o del mamífero, denotando la alta complejidad del ciclo de vida de estos organismos (Tyler y Engman, 2001).

6.4- Transducción de señales en *T. cruzi*

Como se puede observar en su ciclo de vida, *T. cruzi* esta expuesto a ambientes muy diferentes, ya sea dentro del insecto vector o dentro del huésped mamífero. Para sobrevivir, este parásito debe necesariamente ser capaz de sensar estos ambientes y producir los cambios morfológicos y bioquímicos necesarios para adaptarse. Estos cambios son esenciales para que la transferencia del parásito entre el vector y el hospedador sea exitosa.

En tripanosomátidos se han identificado muchos de los componentes de las vías de señalización descritas en eucariotas superiores. A pesar de que un gran número de estos componentes se encuentran conservados, existen otros que todavía no han sido identificados y que probablemente no estén presentes en estos organismos.

La Tabla III resume algunas de las vías de transducción de señales de las cuales algún componente ha sido descrito y sus posibles funciones. Entre ellas se encuentran reguladores y efectores de la vía de señalización del AMPc, Ca^{+2} , inositol fosfatos y fosfatidil-inositol fosfatos, oxido nítrico sintetasa, quinasas de proteínas, fosfatasas de proteínas, proteínas fosforilables, enzimas involucradas en la respuesta al estrés y también proteínas de respuesta al choque térmico.

La carencia de herramientas necesarias para conectar los distintos componentes descritos ha hecho que el estudio de la señalización en estos parásitos se centre en la caracterización de moléculas y actividades bioquímicas específicas más que en la integración de las distintas vías de señalización.

Señal/Componente	Referencias
Reguladores y efectores de AMPc	Rangel-Aldao <i>y col.</i> , 1987; 1988; Rolin <i>y col.</i> , 1990; Ross <i>y col.</i> , 1991; Ouassi <i>y col.</i> , 1992; DeCastro <i>y col.</i> , 1993; Flawiá <i>y col.</i> , 1997; Fraidenraich <i>y col.</i> , 1993; Rolin <i>y col.</i> , 1993; Sanchez <i>y col.</i> , 1995; Garcia <i>y col.</i> , 1995; Boshart y Mottram 1997; Vasella <i>y col.</i> , 1997; Naula y Seebeck 2000; Seebceck <i>y col.</i> , 2001
Reguladores y efectores de Ca^{+2}	Gbenle 1990; Orr <i>y col.</i> , 1992; Kaur y Ruben, 1994; Stojdl y Clarke, 1996; Ajioka y Swindle, 1996; Flawiá <i>y col.</i> , 1997; Xiong and Ruben, 1998; Eintracht <i>y col.</i> , 1998; Ridgley <i>y col.</i> , 1999; Docampo y Moreno, 1999; Eintrach <i>y col.</i> , 1998; Godsel <i>y col.</i> , 1999; Tan y Andrews 2002, Santander <i>y col.</i> 2002
IP e PIP	Docampo y Pignataro, 1991; Moreno <i>y col.</i> , 1992; Stephens <i>y col.</i> , 1993; Oliveira <i>y col.</i> , 1993; Garrido <i>y col.</i> , 1996; Bringaud <i>y col.</i> , 1998; Malaquias y Oliveira, 1999; Ridgley y Ruben, 2001; Marchesini <i>y col.</i> , 2002; Santander <i>y col.</i> 2002
Dominios PH	Gale <i>y col.</i> , 1997
Quinasas y reguladores del ciclo celular	Boshart y Mottram, 1997; Gomez <i>y col.</i> , 1998 y 2001; Van Hellemond <i>y col.</i> 2000; Hassan <i>y col.</i> , 2001; Santori <i>y col.</i> , 2002; Park <i>y col.</i> , 2002; Li y Wang, 2003
Quinasas estadio específicas	Parsons <i>y col.</i> , 1993; Boshart y Mottram, 1997; Grant <i>y col.</i> , 1998; Spadafora <i>y col.</i> , 2002; Garcia-Salcedo <i>y col.</i> , 2002
Fosfoproteínas	Saar <i>y col.</i> , 1998; Aboagye-Kwarteg <i>y col.</i> , 1991; Dell y Engel, 1994; Parsons <i>y col.</i> , 1994
Fosfatasas de proteínas	Evers y Cornelissen, 1990; Erundu y Donelson, 1991; Burns <i>y col.</i> , 1993; Bakalara <i>y col.</i> , 1995; Chaudhuri, 2001; Cedro Fernandes <i>y col.</i> , 2003
Óxido Nítrico y GMPc	Paveto <i>y col.</i> , 1995; Pereira <i>y col.</i> , 1997
Proteínas de respuesta al golpe térmico	Engman <i>y col.</i> , 1989; Zilberstein y Shapira, 1994; Perez-Alvarez <i>y col.</i> , 2001; Graefe <i>y col.</i> , 2002
Componentes de la vía de MAPK	Li <i>y col.</i> , 1996; Hua y Wang, 1997; Muller <i>y col.</i> , 2002

Tabla III. Componentes y vías de transducción de señales descriptas en tripanosomátidos.

A diferencia de lo que ocurre en células de mamíferos, los tripanosomas no muestran cambios rápidos en la morfología, el metabolismo, los procesos de exocitosis o la transcripción. Asimismo, muy poco se conoce sobre los ligandos y las moléculas involucradas en la percepción de señales extracelulares, y las respuestas biológicas producidas por las mismas. Es interesante suponer que moléculas presentes en el hospedador mamífero o en el insecto puedan ser capaces de modular la proliferación o diferenciación de estos organismos.

Apoyando esta hipótesis, se ha observado que el INF- γ tiene un efecto en el crecimiento de *T. brucei* (Hua, 1997), que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) induce la proliferación de amastigotes y la activación de vías de señalización (Ghansah, 2002), que los agonistas del receptor de glutamato afectan la movilidad de *T. cruzi* modulando la actividad de una óxido nítrico sintetasa (Paveto y col., 1995; Pereira y col., 1997), y que el péptido GDF (Globin Derived Factor; Fraidenraich y col., 1993), y los péptidos derivados de fibronectina, inducen la diferenciación de *T. cruzi* a través de la estimulación de la actividad adenilil ciclasa en este organismo (ver sección 6.3.1). Sin embargo, excepto por un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL; Green y col., 2003), un receptor de transferrina (Steverding, 2000; Isobe y col., 2003) y una proteína homóloga al receptor de EGF (Hide, 1989), ningún receptor de respuesta a señales extracelulares ha sido identificado en tripanosomátidos. Tampoco han sido reportadas proteínas con dominios SH2 o SH3, proteínas RAS o factores de transcripción.

Por otro lado, existen proteínas que han sido caracterizadas bioquímicamente pero cuyos genes aún no han sido identificados. Entre ellas, probablemente las más interesantes son las proteínas G heterotriméricas, moléculas centrales en la transducción de señales de eucariotas superiores. Estas han sido identificadas en tripanosomas ya sea por la capacidad de unir GTP, por un peso molecular esperado revelado en Western blots con anticuerpos específicos, por la capacidad de ADP ribosilarse, o por ensayos de fusión de membranas, en los cuales proteínas de las membranas de *T. cruzi* son capaces de inhibir la adenilil ciclasa de mamíferos de una manera glucagón dependiente (Coso y col., 1992; Eisenchlos y col., 1986; Cassel y col., 1991; Oz y col., 1994; Coulter y col., 1995). Sin embargo, hasta el presente los genes que codifican para las mismas no han sido clonados.

Además de los componentes enumerados en la tabla III existen un gran número de secuencias relevantes a la transducción de señales que han sido identificadas a través del proyecto genoma pero que aún no han sido integradas en las vías de señalización de estos parásitos y por ello no han sido incluidas en la tabla III.

Es interesante mencionar que el estudio de la transducción de señales en tripanosomátidos se ha focalizado principalmente en el estudio de los procesos de diferenciación, crecimiento e infección. Debido a su participación en estos procesos, las vías de señalización mediadas por AMPc y Ca^{+2} han sido las más ampliamente estudiadas.

6.4.1- AMPc en *T. cruzi*

En *Trypanosoma cruzi* se ha demostrado que el AMPc produce una inhibición de la proliferación celular. Altas concentraciones de AMPc obtenidas por tratamientos con 8-Br-AMPc producen un arresto del crecimiento e inhiben la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Santos y col., 1988). De forma contraria, el suero fetal bovino, que actúa como un agente mitogénico para este parásito, produce una disminución de los niveles intracelulares de este segundo mensajero (Oliveira y col., 1993).

Además de su papel en el crecimiento celular, el AMPc también está involucrado en el proceso de diferenciación en *T. cruzi*. Previo a la diferenciación de la forma epimastigote a la forma tripomastigote se produce un aumento en los niveles de AMPc (Rangel-Aldao y col., 1988). Aún más, análogos permeables de AMPc e inhibidores de fosfodiesterasas son capaces de disparar el proceso de diferenciación (Rangel-Aldao y col., 1988; Gonzales-Perdomo y col., 1988)

En nuestro laboratorio se purificó, a partir de intestino de vinchuca, un péptido capaz de estimular la actividad adenilil ciclasa en membranas de *T. cruzi* e inducir la diferenciación de la forma epimastigote a la tripomastigote. Se determinó que este péptido es producido el tracto digestivo del vector por proteólisis de la α^D -globina de

pollo y se lo denominó GDF (Fraidenraich y col., 1993; Garcia y col., 1995). En forma análoga, se demostró que péptidos derivados de la proteólisis de fibronectina aumentan los niveles de AMPc en tripomastigotes. En este caso, cuando los tripomastigotes se unen a la fibronectina se produce el clivaje de la misma a través de una proteasa del parásito y los fragmentos liberados aceleran el proceso de diferenciación a la forma amastigote intracelular (Ouaissi y col., 1992).

Por otro lado, en *T. cruzi* se ha reportado que la expresión del gen TC26 está íntimamente relacionada con el proceso de diferenciación. Interesantemente, este es el único gen descrito en tripanosomátidos cuya expresión es inducida por AMPc (Heath y col., 1990).

Algo similar se observa en el organismo relacionado *T. brucei* en el cual previo a la diferenciación de la forma sanguínea a la procíclica, se observan dos picos de AMPc (Rolin y col., 1993). La diferenciación de la forma sanguínea de este parásito a la forma stumpy también parece involucrar la acción de este segundo mensajero. Cuando los cultivos de la forma sanguínea llegan a una alta densidad poblacional liberan un factor de bajo peso molecular, denominado factor SIF (Stumpy Induction Factor), el cual estimula la diferenciación a la forma stumpy. Se ha demostrado que análogos de AMPc producen el mismo efecto sugiriendo que este factor actuaría a través de esta vía de señalización (Vassella y col., 1997).

Finalmente el AMPc se encuentra presente en la orina y los fluidos secretados en el tracto digestivo del insecto vector, por lo que no sería sorprendente que el mismo tuviese un papel fundamental en la diferenciación de tripanosomátidos en condiciones naturales (Kollien y col., 2000).

6.4.1.1- Adenilil ciclasas en *T. cruzi*

Todas las adenilil ciclasas descritas en tripanosomátidos presentan características estructurales y propiedades bioquímicas completamente distintas a las descritas en mamíferos. Estas enzimas no presentan homología de secuencia con

dichas enzimas excepto por aquellos aminoácidos esenciales para la actividad catalítica (Naula y Seebeck, 2000; Seebeck y col., 2001). Además, la estructura de estas enzimas es completamente diferente. Como fue mencionado previamente, las adenilil ciclasas de membrana de mamíferos presentan una estructura que consiste en un pequeño dominio amino-terminal intracelular, dos dominios de seis pasos transmembrana (M1 y M2) y dos dominios catalíticos intracelulares (C1 y C2). En forma diferente, las adenilil ciclasas de tripanosomátidos presentan un largo y variable dominio amino terminal extracelular, un único dominio transmembrana y un único dominio intracelular catalítico altamente conservado (Figura 17; Naula y Seebeck, 2000; Seebeck, 2001). Esta estructura es similar a la de los receptores de membrana con actividad guanilil ciclasa (Potter y Hunter, 2001).

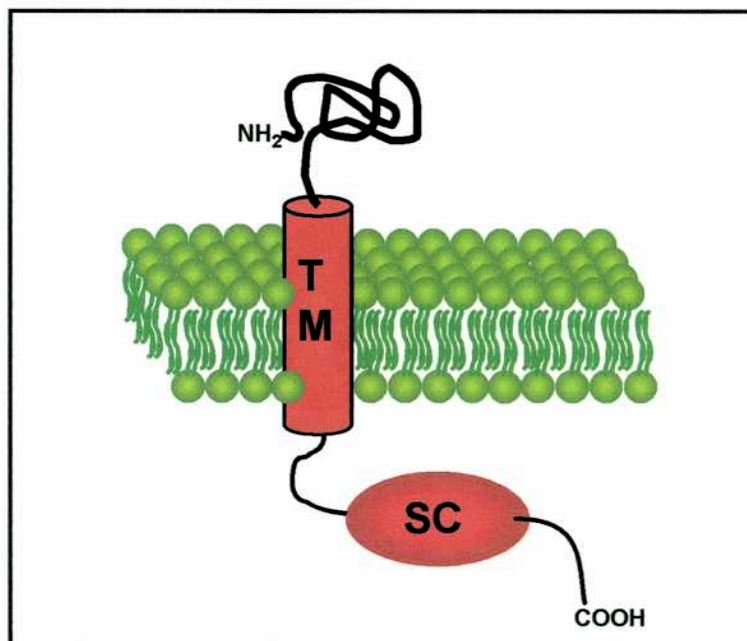


Figura 17. Estructura de las adenilil ciclasas de tripanosomátidos. TM, dominio transmembrana, SC, sitio catalítico.

En estos organismos las adenilil ciclasas están codificadas por grandes familias de genes (Taylor y col., 1999; Sanchez y col., 1995; Alexandre y col., 1996). En *T. cruzi* por lo menos nueve genes han sido reportados, en *L. donovani* cinco y en *T. brucei* por lo menos diecisiete. Se espera que en el genoma de *T. brucei* existan alrededor de cien genes que codifiquen para estas enzimas.

Con respecto a sus características bioquímicas, se ha demostrado que la actividad de las adenilil ciclasas de tripanosomátidos es dependiente de Mn^{+2} e insensible a agentes reguladores de las enzimas de mamíferos como la forskolina y reguladores de proteínas G (AlF_3^- , GTP γ -S, toxina de cólera y toxina pertussis). Esto indicaría que la actividad de estas proteínas no estaría regulada por una proteína G convencional, lo cual las diferencia aún más de las enzimas de mamíferos (Eisenchlos y col., 1986; Martin y col., 1978; Paindavoine y col., 1992).

Muy poco se conoce de los mecanismos reguladores de las adenilil ciclasas de tripanosomátidos. La activación por Ca^{+2} de la adenilil ciclasa ESAG4 de *T. brucei* es hasta el momento el único mecanismo regulador descrito. Sorprendentemente, el gen ESAG4 solo se expresa en uno de los estadio del ciclo de vida de *T. brucei* y la enzima se localiza específicamente en el flagelo del mismo (Paindavoine y col., 1992).

El gran número de genes identificados para estas enzimas, la estructura similar a receptores guanilil ciclasa, el hecho de que el dominio amino-terminal sea altamente variable y su aparente independencia de proteínas G, ha permitido hipotetizar que estas proteínas podrían actuar como receptores con actividad adenilil ciclasa

6.4.1.2- Fosfodiesterasas de AMPc en *T. cruzi*

La actividad fosfodiesterasa específica de AMPc ha sido descrita en *T. cruzi* (Tellez-Iñón y col., 1985; Goncalves y col., 1980), *T. brucei* (Walter y Oppendoes, 1982), *Trypanosoma Gambiense* (Walter, 1974) y *L. mexicana* (al-Chalabi y col., 1997; Rascon y col., 2000). A pesar de esto, los genes que codifican para estas enzimas sólo han sido clonados y caracterizados en *T. brucei*.

En *T. cruzi* Tellez-Iñón y colaboradores han reportado la presencia de una actividad fosfodiesterasa de AMPc en extractos solubles de epimastigotes de *T. cruzi* (Tellez-Iñón y col., 1985). Esta actividad presenta dos afinidades distintas por AMPc, es activada por complejo Ca^{+2} -calmodulina y bloqueada por los antagonistas de CAM clorpromazina, flufenazina y el compuesto 40/80. Por otra parte, Goncalves y

colaboradores reportaron la presencia de una actividad fosfodiesterasa de AMPc independiente de Ca^{+2} (Goncalves y col., 1980). La presencia de dos Kms distintas en extractos solubles de epimastigotes y las diferentes respuestas observadas frente al Ca^{+2} podría indicar la presencia de más de una enzima en dichos extractos.

En el caso de *L. mexicana*, la actividad de PDE reportada es esencialmente soluble aunque un 5% se encuentra asociada a la fracción particulada. Esta enzima presenta una muy baja afinidad por el sustrato AMPc y corresponde a una PDE de clase II. La elución de columnas de filtración por gel muestra que dicha PDE forma parte de un complejo de alto peso molecular ya sea por oligomerización de la proteína, similar a lo reportado para *T. gambiense*, o por la interacción con factores regulatorios aún desconocidos (Rascon y col., 2000; Walter y col., 1974).

En los últimos dos años, varios genes que codifican para fosfodiesterasas de AMPc han sido identificados en *T. brucei* (Figura 18; Seebeck y col., 2001). Estos pueden separarse en dos grupos: la fosfodiesterasa 1 (TbPDE1) (Gong y col., 2001) y la familia de fosfodiesterasas 2 (TbPDE2A-E; Zoraghi y col., 2001; Rascon y col., 2002; Zoraghi y Seebeck, 2002).

TbPDE1 fue identificado a partir de un rastreo en mutantes de levaduras *S. cerevisiae* carentes de PDE. Este es un gen de copia única que se expresa en muy bajos niveles en todos los estadios de *T. brucei*. A pesar de que TbPDE1 no presenta homología significativa con ninguna de las 11 familias de PDEs descritas en mamíferos, pertenece a las PDEs de clase I. Estudios con parásitos transgénicos carentes del gen TbPDE1 han demostrado que, incluso cuando los niveles de AMPc se encuentran aumentados, este segundo mensajero no es esencial para la proliferación de *T. brucei* en cultivo ni para la infección del insecto vector (Gong y col., 2001).

La familia TbPDE2 de *T. brucei* fue identificada a partir de las secuencias del proyecto genoma de este parásito (Figura 18; Seebeck y col., 2001; Zoraghi y col., 2001; Rascon y col., 2002; Zoraghi y Seebeck, 2002). Todos genes así identificados (al menos cinco), presentan un dominio catalítico altamente conservado pero difieren en sus regiones amino terminales. Excepto TbPDE2D y E, todas las enzimas de esta familia presentan uno o dos dominios GAF de unión a GMPc (Figura 18). Sin embargo,

este segundo mensajero parece no ejercer ningún efecto sobre la actividad de estas enzimas. Todos los miembros de esta familia pertenecen las PDEs de clase I y son altamente específicas para AMPc.

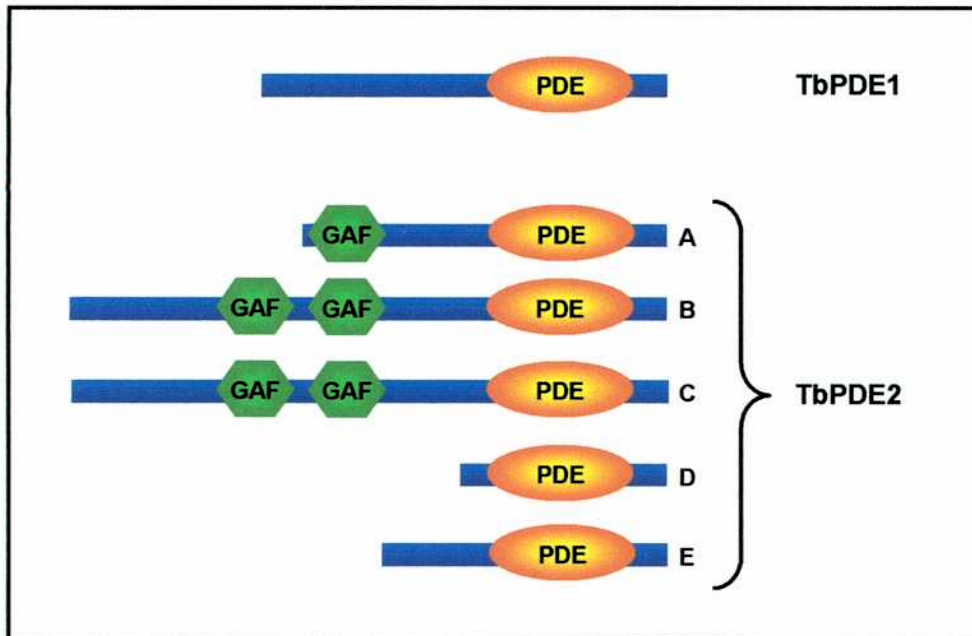


Figura 18. Fosfodiesterasas de AMPc de *T. brucei*. GAF, dominios de unión a GMPc, PDE, dominio catalítico

Los estudios con TbPDE2A, B y C han demostrado que estas enzimas son insensibles a ciertos inhibidores de fosfodiesterasas no selectivos como la isobutilmetil-xantina (IBMX) y la papaverina. Sin embargo, son sensibles a ciertos inhibidores familia específicos como son el Sildefanil, el Dypiridamole, el Etazolato y el Trequisin (Zoraghi y col., 2001; Rascon y col., 2002; Zoraghi y Seebeck, 2002). Estos inhibidores aumentan los niveles de AMPc in vivo y son capaces de bloquear la proliferación de formas sanguíneas de *T. brucei* en cultivo. Más aún, la eliminación del ARN mensajero para esta familia utilizando la técnica de ARN de interferencia (RNAi) es letal para este organismo (Zoraghi y Seebeck, 2002). Esos resultados demuestran que las enzimas de esta familia son necesarias para la proliferación de *T. brucei*.

6.4.1.3- Efectores de AMPc en *T. cruzi*

La PKA ha sido el único efector del AMPc identificado en *Trypanosoma cruzi*. Inicialmente se sugirió que este parásito no presentaba actividad PKA pero presentaba una proteína que unía AMPc diferente de las subunidades regulatorias convencionales de la PKA. Esta proteína parecía tener una estructura monomérica y un peso molecular superior al de las subunidades regulatorias descritas (Rancel-Aldao y col., 1983). Sin embargo, estudios posteriores revelaron que este organismo si presenta una actividad de PKA (Ulloa, 1988), así como también las subunidades C y R las cuales se encuentran inmunologicamente relacionadas con las de organismos superiores (Ulloa y col., 1988; Ochatt y col., 1993). Recientemente, se ha identificado el gen que codifica para una subunidad C en *T. cruzi*. Este gen se expresa diferencialmente en los distintos estadios del parásito y codifica para una proteína que presenta todas las propiedades bioquímicas de la PKA (Huang y col., 2002).

Los genes que codifican para la subunidad C han sido también identificados en *T. brucei* (Seebeck y col., 2001) y *Leishmania* (Siman-Tov y col., 1996). De manera interesante, el gen clonado en *Leishmania* también se expresa diferencialmente en los distintos estadios del mismo.

Contrariamente, los genes que codifican para las subunidades regulatorias capaces de unir AMPc no han sido aún clonados en estos parásitos. En *T. brucei* se ha identificado un gen que podría representar una subunidad R. La proteína codificada por este gen es capaz de inmunoprecipitar una actividad quinasa de proteínas con las características bioquímicas de la PKA, además de ser reconocido por un anticuerpo contra la PKA de corazón bovino (Seebeck y col., 2001).

Estas evidencias indicarían que los tripanosomátidos presentan una PKA convencional formada por subunidades regulatorias y catalíticas.

6.4.2- Calcio en *T. cruzi*

Otro segundo mensajero que parece tener un papel importante en la diferenciación de *T. cruzi* es el calcio. Se ha demostrado que el agregado de

homogenatos de intestino de vinchuca, los cuales inducen la diferenciación de este parásito, producen un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{+2} en la forma epimastigote (Isola y col., 1986). De la misma manera, agentes quelantes de Ca^{+2} e inhibidores de calmodulina disminuyen e incluso bloquean la diferenciación de *T. cruzi* (Lammel y col., 1996; Stojdl y Clarke., 1996)

Se ha observado también que aumentos en los niveles intracelulares de calcio son necesarios para la infección de células de mamíferos por *T. cruzi*. Tras el contacto con las células se produce un aumento intracelular de los niveles de Ca^{+2} en tripomastigotes, el cual no se observa en los epimastigotes no infectivos. De manera similar, drogas que inhiben el aumento de los niveles intracelulares de Ca^{+2} reducen la infectividad de *T. cruzi* (Yoshida y col., 2000; Moreno y col., 1994; Yakubu y col., 1994; Docampo, 1993; Ruiz y col., 1998).

Los tripanosomátidos presentan tres compartimientos capaces de almacenar calcio: el retículo endoplasmático, la mitocondria y una organela exclusiva denominada acidocalsisoma (Xiong y col., 1998; Docampo y Moreno, 1999). Alteraciones en la liberación de calcio de estas organelas por tratamientos con especies reactivas de oxígeno producen fragmentación del ADN nuclear, pérdida de movilidad y finalmente la muerte, denotando la importancia de este segundo mensajero en el metabolismo del parásito (Ridgley y col., 1999).

Los acidocalcisosomas son probablemente las organelas más importantes en el mantenimiento de la homeostasis de calcio (Docampo y Moreno, 1999). Estas organelas son similares a los reservorios de Ca^{+2} de plantas y hongos, y parecen tener una función dual, manter de los niveles intracelulares de Ca^{+2} y regular el pH intracelular.

La respuesta celular a cambios en los niveles de este segundo mensajero es mediada por proteínas que unen Ca^{+2} (CaBPs). Muchas CaBPs, incluyendo a la calmodulina, han sido descritas en este parásito. Sin embargo, muy poco se conoce de los mecanismos de acción de las mismas. Varios efectores de la calmodulina han sido identificados entre los cuales se encuentran la CAMKII (Ogueta y col., 1994), la óxido nítrico sintetasa (NOS), la Ca^{+2} -ATPasa de membrana plasmática (Nolan y col., 1994) y el factor de elongación $\alpha 1$ (Kaur y col., 1994). Entre otras CaBPs se encuentran una

quinasa de proteínas y una endonucleasa dependientes de calcio (Gbenle y col., 1990), y los genes de la calmodulina-ubiquitina (Ajioka y col., 1996).

Cabe mencionar que gran parte de las CaBPs en *T. cruzi* y en otros tripanosomátidos, se encuentran localizadas específicamente en el flagelo (Engman y col., 1989; Wu y col., 1992; 1994; Maldonado y col., 1997; Godsel y col., 1999; Ogueta y col., 1994). Esto sugiere que esta organela tendría un papel crucial en la señalización mediada por Ca^{+2} .

DATOS PRELIMINARES

Datos preliminares

Durante las últimas décadas, el laboratorio de la Dra. Flawiá y el Dr. Torres se ha dedicado al estudio de las vías de transducción de señales en *Trypanosoma cruzi*, focalizándose principalmente en la vía de señalización mediada por AMPc. Se determinó la presencia de una actividad adenilil ciclasa en membranas de epimastigotes de *T. cruzi* dependiente de Mn^{+2} e insensible a forskolina y reguladores de proteínas G (Torruella y col. 1986; Tellez-Iñon y col., 1985; Eisenschlos y col., 1986; Fraidednraich y col., 1993; Garcia y col., 1995; Flawiá y col., 1997).

Posteriormente se identificó a un marco de lectura abierto de 3942 pares de bases que presentaba alta homología con adenilil ciclasas de tripanosomátidos previamente descritas. Esta secuencia fue denominada TczAC y depositada en el banco de secuencias GenBank. Por ensayos de complementación en levaduras mutantes carentes de actividad adenilil ciclasa se demostró que el gen *TczAC* codificaba para una adenilil ciclasa funcional.

OBJETIVOS

Conociéndose que el AMPc tiene un papel esencial en los procesos de transducción de señales y que en el parásito *T. cruzi* esta involucrado en procesos de crecimiento y diferenciación, surge como ineludible el estudio del mismo en este organismo. En este contexto se propuso como objetivo general de esta tesis estudiar y caracterizar enzimas involucradas en la síntesis y degradación del AMPc en *Trypanosoma cruzi*.

El trabajo se dividió en dos módulos cuyos objetivos particulares se detallan a continuación:

Modulo I

- Caracterizar molecular y bioquímicamente la adenilil ciclasa TczAC de *T. cruzi*
- Identificar posibles factores reguladores de esta enzima

Modulo II

- Identificar y caracterizar genes que codifican para fosfodiesterasas de AMPc en *T. cruzi*

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

1- Cepas de bacterias *E. coli*

- **XL1-Blue MRA:** D(mcrA)182, D(mcrCB-hdSMR-mrr)172, endA1, supE44, thi-1, recA, gyrA96, relA1, lac, l- [P2 lisógeno].
- **DH5 α F':** F'/endA1 hdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nal^r) relA1 Δ (lacZYA-argF)_{U169} (m80lacZ Δ M15).
- **BL21/Lys:** F⁻ ompT hdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal (DE3) dcm pLysS, (cam^R).
- **DH10B:** F⁻ mrcA Δ (mrr-hdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 ara Δ 139D(ara, leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL mupG.

2- Cepas de levaduras

- **T503A:** *Mat- α , leu2, his3, trp1, ura3, cyr 1-2.*
- **L40:** *Mat- α , his3D200, trp1-901, leu2-3,112 ade2 LYS2::(*lexAop*)₄-HIS3 URA3::(*lexAop*)₈-lacZ.*
- **PM943:** *MATa leu2-3, 112 ura3-1 trp1-92 his3-11, 15 ade2-1 can1-100 GAL SUC mal pde1::TRP1 pde2::URA3.*
- **J106:** *MATa leu2 his3 ura3 trp1 ade8 can1 pde1::URA3 pde2::HIS3.*
- **CHP495:** *h⁻ leu1-32 his7-366 fbpl::ura41 ura4::fbpl-lacZ git2D::his71.*

3- Cepas de parásitos

Se utilizaron epimastigotes del parásito *Trypanosoma cruzi* de la cepa CL Brener. En los experimentos que incluyen tripomastigotes se utilizó la cepa Y.

4- Medios de cultivos

4.1- Cultivo de bacterias

- **LB:** bacto-triptona 1% p/v, extracto de levaduras 0,5% p/v, NaCl 1% p/v.
- **LB-agar:** LB + bactoagar 1,5% p/v.
- **Medio Rico para bacterias (SOC):** bacto-triptona 2% p/v, extracto de levaduras 0,5% p/v, NaCl 0,05% p/v, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10mM, glucosa 20 mM
- **Concentración de ampicilina:** 50 µg/ml.
- **Concentración de IPTG:** 0,1 M (120 mg en 5 ml de H₂O). Se utilizaron 100 µl/placa (concentración final p/placa: 0,5 mM). Para los ensayos de inducción de proteínas recombinantes se utilizó IPTG 0.1-1 mM final.
- **Concentración de X-gal:** 50 mg/ml, (en dimetilformamida). Se agregaron 50 µl/placa (concentración final p/placa: 40 µg/ml).

4.2- Cultivo de levaduras

- **YPD:** 2%p/v peptona, 1%p/v extracto de levaduras, 2% dextrosa.
- **Medio mínimo:** 0,17% p/v base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos y sulfato de amonio, 0,5% p/v. sulfato de amonio, 1% p/v ácido succínico, 0,6% p/v NaOH, 0.01% p/v de los aminoácidos ade, arg, cis, (leu), (lys), tre, (trp), ura, 0.005 % p/v de los aminoácidos asp, (his), ile, met, phe, pro, ser, tir, val y 2% p/v de glucosa.
Aminoácidos entre paréntesis: aminoácidos excluidos en los medios mínimos según corresponda.
- **TULys:** medio mínimo sin trp, ura, lys.
- **THULL:** medio mínimo sin trp, his, ura, leu, lys.
- **TUL:** medio mínimo sin trp, ura, leu.
- **TULL:** medio mínimo sin trp, ura, leu, lys.
- **ULL:** medio mínimo sin ura, lys, leu.

- **Ura⁻**: medio mínimo sin ura.
- **Gal⁺**: medio mínimo sin ura y con rafinosa 2%, galactosa 2% y 2% glicerol en lugar de glucosa.
- **Leu⁻**: medio mínimo sin leu.
- **YES**: 0,5% p/v Extracto de levaduras, 3% glucosa + 225 mg/l de ade, his, leu, ura y lys.
- **EMM**: 14.7mM Ftalato de potasio, 15.5 mM Na₂HPO₄ , 93.5 mM NH₄Cl , 2% w/v glucosa, sales (MgCl₂ 5,2 mM, CaCl₂ 0,1 mM, KCl 134 mM, Na₂SO₄ 0,294 mM), vitaminas (Ácido pantoténico 4,2 µM, ácido nicotínico 81,2 µM, Inositol 55,5 µM biotina 40, 8 nM), minerales (Ácido bórico 8,09 µM, MnSO₄ 2,37 µM, ZnSO₄ 13,9 µM, FeCl₂ 0,74 µM, ácido molibdico 0,247 µM, KI 0,6 µM, CuSO₄ 0,16 µM, ácido cítrico 4,76 µM).
- **EMM + 5'-FOA**: EMM con 2% glucosa, 0,1% 5'-FOA + 25 mg/l ura y 112,5 mg/ml de ade, leu y lys.

4.3- Cultivo de parásitos

- **LIT**: (para epimastigotes de *T. cruzi*) 0,5% p/v infusión de hígado, 0,5% p/v triptosa, 68 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 22 mM Na₂HPO₄, 2% p/v glucosa, 0,02 mg/ml hemina, 10% v/v suero fetal bovino, 100 µg/ml estreptomycin y 100 U/ml penicilina

5- Soluciones generales

5.1- Soluciones empleadas en técnicas de ADN y ARN

- **TE**: Tris-HCl 10 mM pH8, 1 mM EDTA pH8.
- **TBE 10x**: (1 litro) 10,8% p/v Tris base, 5,5% p/v ácido bórico, 20 mM EDTA pH8.
- **TAE 50x**: (1 litro) 24,2% p/v Tris base, 5,71 % v/v ml ácido acético glacial, 50 mM EDTA pH8.
- **TBF1**: acetato de potasio 30 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, KCl 100 mM y glicerol 15% v/v, pH 5,8 ajustado con acético 2 N.
- **TBF2**: MOPS 10 mM pH 7, CaCl₂ 5 mM, KCl 10 mM y glicerol 10% v/v. Se ajusta a pH 7 con KOH.
- **Solución I**: Tris-HCl 25 mM pH 8, glucosa 50 mM y EDTA 10 mM.
- **Solución II**: NaOH 0,2 M y SDS 1%.

- **Solución III:** acetato de sodio 3 M pH 4,8.
- **STET:** 8% p/v Sacarosa, 5% v/v Tritón X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8 y 50 mM EDTA.
- **PIC:** fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- **H₂O DEPC:** agua hexadestilada con di-etilpirocarbonato 0,01 % v/v. Se agitó durante toda la noche y al día siguiente se autoclavó dos veces.
- **Buffer MOPS 10x:** 0,2 M MOPS, 0,5 M acetato de sodio pH 7, 0,01 M Na₂EDTA.
- **Buffer de siembra para muestras de ADN, 6x:** 0,25%p/v azul de bromofenol, 0,25% p/v Xyleno Cyanol, 30% v/v y glicerol.
- **Buffer de siembra para muestras de ARN:** se emplearon 46 µl de la siguiente mezcla cada 30 µl de muestra de ARN. Mezcla: 6 µl MOPS 10x, 30 µl formamida deionizada, 9 µl formaldehído, 1 µl de Bromuro de Etidio (BrEt) 1mg/ml.
- **Church:** 1% p/v seroalbúmina, 7% p/v SDS, 1 mM EDTA 8, 0,5% p/v Na₂PO₄
- **SSC 20x:** NaCl 3M, Na₃citrato 0,3M, pH 7.
- **Solución de lisis de bacterias:** 50 mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 1mM fenilmetilsulfonil fluorato (PMSF).
- **Solución de resuspensión de cuerpos de inclusion:** 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl 8 M urea pH 8.
- **LDS:** 1 % SDS ,100mM EDTA pH 8, 10mM Tris pH 8.
- **NDS 100%:** Se mezclan 350 ml H₂O, 93 g EDTA y 0,6g Tris base. Se lleva a pH >8 con 100 a 200 pellets de NaOH sólido. Se agrega N-lauril sarcosina (5 g disueltos en 50 ml de H₂O). Se leva a pH 9,5 con NaOH concentrado y se agrega agua destilada para llegar a 500ml.
- **SM:** 50 mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 10 mM MgSO₄.
- **Solucion de lisis de ADN:** 10 mM Tris-HCl pH 8, 1% SDS, 200 mM EDTA pH 8.
- **Buffer de columna:** 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF.
- **Buffer de lisis:** 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 5% glicerol, 1-10 mM β-mercaptoetanol.
- **Antiproteásicos:** 0,5 mM PMSF, 1 mM benzamidina, 2 µg/ml inhibidor de tripsina y 25 unidades/ml aprotinina y a veces 50 µg/ml N^α-p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK).

5.2- Soluciones empleadas en técnicas de proteínas

- **Buffer de siembra para muestras de proteínas, 5x:** 50% v/v glicerol, 7.7% p/v DTT, 10% p/v SDS, 0,4 M Tris-HCl pH 6,8, 0,002% p/v azul de bromofenol.

- **Buffer Tris-glicina-SDS 10x:** (1 litro) 3,03% p/v Tris base, 14,4% p/v glicina y 1% v/v SDS.
- **Azul de Coomasie:** 25% p/v Coomasie R250, 30% v/v Metanol, 10% v/v ácido acético.
- **TBS 10x:** 0,25 M Tris-HCl pH 8, 9% p/v NaCl.
- **TBS-Tween 1x:** TBS 1x + 0,05% v/v Tween 20.
- **PBS:** (1 litro) 0,8% p/v NaCl, 0,02% p/v KCl, 0,115% p/v Na₂HPO₄, y 0,02% p/v KH₂PO₄.
- **PBS-T:** PBS 1X + 0,05% v/v Tween 20.
- **Reactivo de Bradford:** (1 litro) 100 mg de Coomassie G250 en 50 ml de etanol 95 %, agregar 100 ml de ácido fosfórico 85%, completar a volumen con H₂O. Se filtra y se guarda en un frasco oscuro. (Alternativamente se usó el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* de BioRad según las instrucciones del fabricante).

5.3- Soluciones empleadas en técnicas de levaduras

- **Solución LiOAc:** 0.1 M LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8.
- **Solución PEG-LiOAc:** 40% p/v PEG₃₃₅₀, 0.1 M LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH8.
- **ADN *carrier*:** se hirvieron por 5-10 min 200 µl de ADN de esperm a de salmón sonicado de concentración 10-20 µg/ml. Se le agregaron inmediatamente 800 µl de solución LiOAc, se mezcló vigorosamente y se colocó en hielo hasta que alcanzó a T° ambiente.
- **Buffer Z:** 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄ pH7.
- **Buffer de lisis de levaduras (BA):** 50 mM Tris-HCl pH 8, 2,5 M LiCl, 4% Triton X-100, 62,5 mM EDTA.
- **Buffer de lisis de levaduras (BB):** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 % glicerol.

6- Oligonucleótidos (5'→3')

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa Oligo 4.05 (National Biosciences, Inc.). Las letras en negrita indican el sitio de corte de la enzima indicada entre paréntesis.

6.1- Identificación *TczPDE*

- **PDFw** CGC GGA TCC GGG TGT AAG AAT GGG GTG AGG AT
- **PDRv** CCC AAG CTT TTA ACT TTC CAC ACG TTC GAC TGT CCA
- **PD2Fw** GTA CGA AGG AAC GAT TGT GGC TG
- **PD2Rv** CTC CTT ACC AGC AAC GCT ATC TG
- **PD3Fw** TCT GGA GAA GTG ACT GTG TTT ACG
- **PD3Rv** TGC TCG GTG TTC ATT TAA TTC CAT C
- **5'PDint** CGA GTC CGG GTC CGA AAG AAT T

6.2- Secuenciación de *TczPDE*

- **PD4Fw**: CAA TCT TGC TGT TGA AAT TCT TTC G
- **PD4Rv**: CAG AAG ATG GGA ATT ATT GAT GGA T
- **PD5Fw**: TGC TGA ACG GTG AGA TCC TTG C
- **PD6Fw**: CTT CTA CCT CAA GAC GGA TTC C
- **PD6Rv**: TGT TCA GCT TCT TAA TCA ACT GG
- **PD7Fw**: GGA GAG TAA CCG TTT AGA GTG G
- **PD7Rv**: GGA GAA CAG CCT CAA TTA TTG C

6.3- Amplificación de sondas

- **MX6**: CCC AAG CTT ATG GCT GTG GGA TGG GTG GCT GTG (**Hind III**)
- **MX7**: GC TCT AGA TTA TTG AGG AAT AGA TGG AGA TCC (**Xba I**)
- **CPDFw** AAG CTT ATG GCG GAG ACA GGC GGT CG (**Hind III**)
- **CPDRv** CCG CGG TCA TAT ATA CAT CAT TTA TTT CCA (**Sac II**)

6.4- RT-PCR

- **ACASFw:** G CTC TAG AGC TGA TTC CTT TCC TTT CCT CTG

- **AM9Rv:** A ATC TCC ACA CGA AC G CC G

6.5- Expresión en bacterias

6.5.1- Paraflagellar rod

- **PARFw:** GGA TCC ATG CCT CCA AAG AAA GGG AAG A (**BamH I**)

- **PARRv:** AAG CTT TCA TAT CTC GTA CGG GAT AAA ATG GAT (**Hind III**)

6.5.2- TczPDE

- **EPDFw** G GAT CCT ATG GCG GAG ACA GGC GGT CG (**BamH I**)

- **EPDRv** AAG CTT TCA TAT ATA CAT CAT TTA TTT CCA TCA (**Hind III**)

6.6- Complementación en levaduras

Se utilizaron los oligonucleótidos **CPDFw** y **CPDRv** cuya secuencia fue descrita en sondas.

6.7- Ensayo de doble híbrido

- **DHFw:** CG GAA TTC TAC TTC AGC CAC AGC TCG CGT GAC (**EcoR I**)

- **DHRv:** A CGC GTC GAC TTA TTG AGG AAT AGA CGG AGA TCC (**Sal I**)

- **DIMFw:** CGC GGA TCC TAC TTC AGC CAC AGC TCG CGT GAC (**BamH I**)

- **DIMRv:** GC TCT AGA TTA TTG AGG AAT AGA CGG AGA TCC (**Xba I**)

- **PARVP16Fw:** GGA TCC CC ATG CCT CCA AAG AAA GGG AAG (**Bam HI**)

- **VP16:** GGA ATT GAC GAG TAC GGT

6.8- Expresión en *S. pombe*

- **MX6P:** ATG GCT GTG GGA TGG GTG GCT GTG

- **MX7P:** TTA TTG AGG AAT AGA TGG AGA TCC

7- Vectores

- **pGEM-Teasy:** Sistema de clonado de fragmentos de PCR (Promega). Posee resistencia a ampicilina, alto número de copias, sistema de β -galactosidasa para identificación de clones positivos.
- **pADNS:** Permite la expresión en levaduras bajo el promotor fuerte de expresión constitutiva ADH1. Presenta el gen *LEU2*.
- **pYES:** Permite la expresión en levaduras bajo el promotor inducible Gal1. Presenta el gen *URA3*.
- **pTOPO:** Estos vectores permiten el subclonado directo de fragmentos de PCR y la expresión en levaduras bajo el promotor NMT, ya sea 1, 41 u 81. Presenta gen *LEU2*.
- **pMAL-C2:** Permite la expresión en bacterias como una fusión con la proteína unión a maltosa (MBP). La expresión de la proteína de fusión está regulada por el promotor de la polimerasa del fago T7.
- **pBTM116:** Este vector permite la expresión de proteínas en fusión con el dominio LexA de unión al ADN. La proteína LexA no tiene una secuencia de localización nuclear reduciendo el número de falsos positivos. Este vector lleva el gen *TRP1*.
- **pVP16:** Este vector permite la expresión de proteínas en fusión con el dominio de activación de la transcripción de VP16. Lleva el gen *LEU2*.
- **pGAD:** Este vector permite la expresión de proteínas en fusión con el dominio de activación de la transcripción de Gal4. Lleva el gen *LEU2*.

8- Anticuerpos

-Anticuerpos monoclonales anti-LexA: Se utilizaron anticuerpos comerciales (Stratagene) que reconocen el dominio LexA.

- Anticuerpos monoclonales anti-Paraflagellar rod: Los anticuerpos utilizados fueron proporcionados por el Dr. Keith Gull.
- Anticuerpos policlonales anti-Arginina quinasa: Los anticuerpos utilizados fueron proporcionados por el Dr. Claudio Pereira.

9- Bibliotecas de *T. cruzi*

La biblioteca genómica de *T. cruzi* cepa CL brener utilizada para el rastreo del gen *TczAC* fue construida en el vector λ Fix II y gentilmente cedida por el Dr. Mariano Levin La biblioteca de expresión en levaduras utilizada para el rastreo por doble híbrido fue cedida por el Dr. Harvey Eisen.

10- Sondas

10.1- *TczAC*

Se utilizó como sonda un fragmento de ADN correspondiente al gen *TczAC* entero obtenido por PCR a partir de ADN plasmídico y utilizando los oligonucleótidos MX6 y MX7.

10.2- *TczPDE*

Para el rastreo de la biblioteca genómica de *T. cruzi* se utilizó como sonda un fragmento de ADN obtenido por PCR a partir de ADN genómico de *T. cruzi* utilizando los oligonucleótidos PD2Fw y PD5int.

Para la caracterización molecular de *TczPDE* se utilizó una sonda correspondiente al gen *TczPDE* entero amplificado por PCR a partir de ADN plasmídico y utilizando los oligonucleótidos EPDFw y EPDRv.

1- Métodos de ADN y ARN

1.1- Electroforesis de ADN

Para separar las moléculas de ADN se utilizaron geles de agarosa nativos. Estos se prepararon con buffer TBE 1x o TAE 1x al 0,7-1,5% con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio (BrEt). Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspendieron con el correspondiente volumen de buffer de siembra 6x. Los geles fueron visualizados y fotografiados con el equipo Image Master VDS, de Pharmacia-Biotech.

1.2- Corte con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN plasmídico o genómico se realizaron en los buffers indicados por el fabricante. Las enzimas utilizadas fueron de New England Biolabs, Promega, GibcoBRL o Pharmacia. Se utilizaron de 3 a 5 unidades de enzima por μg de ADN y las incubaciones se hicieron a las temperaturas recomendadas por el fabricante.

1.3- Amplificaciones por PCR

A partir de secuencias identificadas se diseñaron los oligonucleótidos que se usaron en las diferentes reacciones de amplificación por PCR. La mezcla de amplificación estuvo siempre compuesta por el ADN molde correspondiente (1-10 ng para plásmido, 100-200 ng para ADN de fago y 300-800 ng para ADN genómico), 100 ng de cada oligonucleótidos, 1-2 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, buffer Taq ó Pfu 1x y 2,5 U de enzima ADN polimerasa. El volumen final en todos los casos fue 50 μl .

Todas las reacciones constaron de:

-5 min. a 95°C (desnaturalización inicial del ADN)

30 ciclos de:

-1 min. a 95°C (desnaturalización)

-1 min. a T° (anidado)

- t min. a 72°C (elongación)

y 10 min. a 72°C (elongación final)

Donde T° y t son variables, dependiendo de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos usados en cada reacción de PCR y de la longitud del fragmento amplificado en cada caso.

1.4- Purificación y precipitación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos a ser purificados se llevaron a 100-200 μl con H_2O . Para remover proteínas y lípidos se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico pH 8 (25:24:1) (PIC) y se tomó la fase acuosa. Para remover restos de fenol, se agregó 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1) (CI) y se tomó la fase acuosa. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 1/10 volúmenes de 3 M acetato de sodio pH 5.2 o pH 4,8, o con 1/2 volumen de 7,5 M acetato de amonio pH 7, con el agregado de 2,5 volúmenes de etanol 100%. Se dejó a -70°C por 20-30 min. y se centrifugó a máxima velocidad por 20 min. El *pellet* se lavó con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió con H_2O o Tris-HCl 25 mM pH 8.

1.5- Cuantificación de ácidos nucleicos

Las muestras de ADN, ARN y oligonucleótidos se cuantificaron por medición de la absorbancia a 260 nm. Las concentraciones se calcularon sabiendo que 1DO_{260} de ADN= 50 mg/ml, 1DO_{260} de ARN= 40 mg/ml y 1DO_{260} de oligonucleótidos= 33 mg/ml y teniendo en cuenta el factor de dilución. Algunas muestras de ADN también se cuantificaron en geles de agarosa, comparando las intensidades observadas al UV con las intensidades dadas por un marcador de masa conocida.

1.6- Purificación de fragmentos de ADN de geles

En la mayoría de los casos, los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el *kit* QIAquick o QuiaEx II (Qiagen). Los fragmentos de ADN a purificar se separaron por

electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1x y luego se siguieron las instrucciones del fabricante.

1.7 Subclonado en pGEM-Teasy

La Taq polimerasa deja, en los extremos 5' de sus productos de amplificación, nucleótidos A sobresalientes. Los productos de PCR obtenidos con estas características se subclonaron en el plásmido pGEM-Teasy, incluido en el *kit* pGEM-Teasy vector System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de fragmentos de PCR amplificados con la enzima Pfu, se realizaron reacciones de agregado de A salientes (*tailing*) previo al subclonado en el plásmido pGEM-Teasy. Para ello se siguieron las instrucciones del *kit*.

1.8- Reacciones de ligación

En cada reacción de ligación se utilizaron entre 30 y 50 ng de vector. Se hicieron diferentes relaciones molares de inserto:vector (1:1, 3:1 y 5:1) manteniendo constante la masa de vector y variando la cantidad de inserto. Los volúmenes de reacción fueron de 10 o 30 μ l utilizando la enzima ADN ligasa del fago T4 (GibcoBRL). Para ligar extremos romos se usó 1 U de enzima y para extremos cohesivos 0,1 U. Las incubaciones fueron a 16°C durante toda la noche o a T° ambiente por 1-2 hs.

1.9- Marcación de sondas radioactivas

Las sondas radioactivas se prepararon con el *kit* Prime a gene (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La marcación se realizó utilizando 25 ng de fragmento de ADN por iniciación al azar de la polimerasa utilizando una batería de hexámeros inespecíficos. Como nucleótido radioactivo se usó [³²P]-dCTP. La sonda se purificó utilizando columnas Quiaquick (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante o por precipitación alcohólica (Sección 1.4).

1.10- Purificación de plásmidos

Se realizó a partir de cultivos bacterianos de 3 ml (minipreparaciones) ó de 50 ml (midipreparaciones).

- Para las minipreparaciones, en la mayoría de los casos se utilizó el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979).
- Se partió de 3-5 ml de un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche en medio LB con el antibiótico correspondiente.
- Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 4000 rpm durante 5' a T° ambiente.
- El *pellet* se resuspendió en 300 µl de solución I.
- Se agregaron 300 µl de solución II, preparada en el momento, se mezcló suavemente por inversión y se dejó 5' en hielo.
- Se agregaron 300 µl de solución III, se mezcló suavemente por inversión y se dejó en hielo 5'.
- Se centrifugó a máxima velocidad por 10 min. y se tomó el sobrenadante.
- Se agregaron 50 µg/ml de ARNasa A (libre de ADNasa) y se incubó por 30 min. a 37°C.
- Se hicieron 2 extracciones con 400 µl de cloroformo.
- Se precipitó con el agregado de 1 volumen de isopropanol 100% y centrifugación a máx. velocidad por 10 min. a T° ambiente.
- El *pellet* se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 20-50 µl de 25 mM Tris-HCl pH 8.

Alternativamente se realizaron *boiling minipreps* de la siguiente forma:

- 1,5 ml de cultivo se precipitaron a 12000 rpm a T° ambiente durante 30 segundos en una microcentrífuga.
- Las bacterias se resuspendieron en 360 µl de buffer STET.
- Se agregaron 40 µl de lisozima (10 mg/ml, Sigma). La mezcla se agitó en un *vortex*.
- Rápidamente se hirvió durante 1 minuto.
- El ADN bacteriano se precipitó a T° ambiente a 13000 rpm durante 15 min. y fue descartado con un escarbadiante.
- Se agregaron 400 µl de isopropanol, la mezcla se agitó en un *vortex* y se centrifugó a 13000 rpm a T° ambiente durante 10 min.
- Se descartó el sobrenadante y el plásmido se lavó con 0,5 ml de etanol 70%.

- Se centrifugó a 13000 rpm a T° ambiente durante 5 min y el sobrenadante se descartó.
- El plásmido se resuspendió en 30-50 µl 25 mM Tris-HCl pH 8 + 1 µl de ARNasa A (10mg/ml)

En los casos necesarios, las digestiones con enzimas de restricción se realizaron directamente en esta mezcla.

Para las midipreparaciones de alta pureza se realizaron con el sistema Plasmid Midi *Kit* de Qiagen según las instrucciones del fabricante o con el siguiente protocolo:

- Se partió de 40-50 ml de un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche en medio LB con el antibiótico correspondiente.
- Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 5000 rpm durante 10' a T° ambiente.
- El *pellet* se resuspendió en 2 ml de solución I.
- Se agregaron 4 ml de solución II, preparada en el momento, se mezcló suavemente y se dejó 10' en hielo.
- Se agregaron 3 ml de solución III, se mezcló suavemente por inversión y se dejó en hielo 10'.
- Se centrifugó 10 min. a 10000 rpm en rotor SS34 y se tomó el sobrenadante.
- Se agregaron 20 ml de etanol 100 % y se dejó 20 min. a -20°C.
- Se centrifugó 20 min. a 14000 rpm en rotor SS34, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 0,5 ml de TE.
- Se agregaron 50 µg/ml de ARNasa A (libre de ADNasa) y se incubó por 30 min a 37°C.
- Se hicieron 2 extracciones con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1).
- Se centrifugó 5 min. a 13000 rpm para separar las fases.
- Se precipitó con el agregado de 1:10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol 100% y centrifugación a 13000 rpm por 10 min. a T° ambiente.
- El *pellet* se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 200-300 µl de 25 mM Tris-HCl pH 8.

1.11- Secuenciación y análisis de secuencias

Las secuenciaciones se realizaron en centros de servicios en el exterior:

- Bio Resource Center: Cornell New York State Center for Advanced Technology and Biotechnology. Cornell University, Ithaca, US.
- Cancer Research Center: Chicago University, Chicago, Illinois, US.

El análisis y comparación de las secuencias se realizó utilizando los programas

- BLASTN y P (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)
- ORF FINDER (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf)
- WU-BLAST2 (www.ebi.ac.uk/blast2/parasites)
- CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/clustalw)
- SMART (www.smart.embl-heidelberg.de)
- PROSITE (www.expasy.ch/prosite)
- DAS (www.sbc.su.se/~miklos/DAS/)
- SPLIT (<http://pref.etfos.hr/cgi-bin/split/>)
- TMPRED (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)
- PRED-TMT (at <http://o2.db.uoa.gr/PRED-TMR/>)

2- Clonado del gen *TczPDE*

2.1- Obtención de la sonda

A partir de las secuencias de *T. cruzi* homólogas al gen TbpDE2B obtenidas por comparación en la base de secuencias, se diseñaron distintos oligonucleótidos. A partir de ADN genómico de *T. cruzi* se realizaron amplificaciones por PCR con distintas combinaciones de los mismos. Se obtuvo así una banda nítida del tamaño esperado con PD2Fw y 5'PDint. Este fragmento fue purificado de la agarosa, clonado en el vector pGEM-Teasy y secuenciado. El fragmento mostró una alta homología con las fosfodiesterasas de *T. brucei* previamente identificadas y fue utilizado como sonda.

- Se prepararon células competentes XL1-Blue MRA crecidas en LB líquido con 10 mM de MgSO_4 y 0,2% de maltosa
- Se tomaron 600 μl de las bacterias competentes y se las mezcló 200 μl de la solución de bacteriófago a una concentración de 150 ufp/ μl de manera de obtener 30 000 playas de lisis por placa. Se calculó que con esa cantidad de playas se encontraba representado de 3 a 4 veces el genoma de *T. cruzi* y se prepararon 4 placas.
- Las células competentes y los fagos se incubaron 20 min. a T° ambiente y 10 min. a 37°C.
- Se agregaron 7-8 ml de TOP agarosa (0,7% de agarosa en LB) mantenido a 48°C. Se mezcló en un *vortex*.
- Se plaqueó en placas grandes (0,137 m de diámetro) con LB agar bien seco.
- Se mantuvo durante 10 min. a T° ambiente y después se pasó a 37°C.
- Después de 6-8 hs cuando las unidades formadoras de colonias (ufp) fueron visibles y no confluentes y se dejaron a 4°C durante 30 min. o más.
- Sobre cada placa se colocaron 2 filtros de nylon Hybond N⁺ (Amersham), el primero 1 a 2 min. y el segundo 5 a 7 min.
- Los filtros se dejaron secar invertidos sobre un papel Whatman 3MM.
- Manteniendo los fagos hacia arriba, las membranas se colocaron durante 7, 3 y 3 min. sobre 3 papeles Whatman que estaban embebidos en las siguientes soluciones: (1) 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH y (2) 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7.2 y 1 mM EDTA (2 veces).
- Después se sometieron a 120000 μJ de radiación ultravioleta usando un UV Stratalinker 1800 de Stratagene.
- Las membranas se lavaron suavemente con SSC 2X para remover impurezas
- Posteriormente se prehibridaron con medio Church a 65°C durante 6 h y se hibridaron con las sondas correspondientes durante toda la noche.
- Luego, las membranas se lavaron 20 min. con 2x SSC, 0,1% de SDS, con 1x SSC, 0,1% de SDS y con 0,1x SSC, 0,1% de SDS respectivamente.
- A las 48 h se revelaron las placas identificándose los clones positivos en cada duplicado.
- Estos clones se seleccionaron levantando el agar de las placas con una punta azul estéril y agregando 0,5 ml de medio SM más 50 μl de cloroformo. La mezcla se agitó en un *vortex* y se guardó a 4°C.

- A partir de cada positivo se prepararon dos diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) de la fase superior y se realizó una segunda ronda de rastreo de forma idéntica a la descrita anteriormente pero utilizando placas pequeñas (0,087 m de diámetro).
- Se volvieron a identificar los clones positivos y con dos diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) de cada uno de ellos se realizó una tercera ronda de rastreo. Cuando todos los clones identificados fueron positivos se consideró entonces que los clones estaban puros.

2.3- Purificación de ADN de fagos

- Se titularon fagos identificados en el rastreo. Con 10^9 ufp se inocularon 2 ml de células competentes preparadas como fue descrito previamente.
- Las células competentes y los fagos se incubaron 20 min. a T° ambiente y 10 min. a 37°C.
- Con estos cultivos se inocularon 500 ml del LB + 10mM MgSO₄ y 0,2% maltosa y se crecieron 8 hs a 37°C en agitación.
- Posteriormente, se agregaron 10 ml de cloroformo para lisar las células y se incubó 15 minutos a 37°C. Los restos celulares se descartaron centrifugando 20 min. a 5000 rpm (rotor GS3) y 4°C.
- Se agregaron 60 ml de NaCl 5 M y se incubó 15 min. A T° ambiente.
- Se agregaron 60 g de PEG 8000 al sobrenadante y se dejó toda la noche a 4°C.
- Se centrifugó 20 minutos a 5000 rpm a 4°C y el *pellet* se resuspendió en 20 ml de SM.
- Se hicieron dos extracciones con cloroformo, se centrifugó durante 2 hs a 25000 rpm en rotor SW28 y el *pellet* se resuspendió en 0.5 ml de SM.
- El sobrenadante se incubó con proteinasa K 100 µg/ml en EDTA 20 mM /SDS 0.5% por 60 minutos a 68°C.
- Se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo (1:1).
- Se agregó un volumen de isopropanol y se incubó durante 20 minutos a T° ambiente.
- Se centrifugó 15 minutos a 10000 rpm, se lavó el *pellet* dos veces con etanol 70%, y se resuspendió en 0.2 ml de buffer TE.

Alternativamente el ADN del fago se purificó utilizando el Lambda midi *kit* de Quiagen según instrucciones del proveedor.

3- Caracterización molecular de genes identificados

3.1- Extracción de ADN genómico

- 1-2 ml de parásitos crecidos en medio LIT se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm.
- Se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado con 1 ml de PBS 1X.
- Se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm recuperándose el *pellet*.
- Se añadió 1 ml de solución de lisis para ADN y se resuspendió el *pellet*.
- Se realizaron dos una extracciones con fenol:cloroformo (1:1) mezclando suavemente por inversión.
- Se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm y se de descartó el *pellet*.
- Se realizó una última extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (1:1).
- Se centrifugó durante 1 minuto a 13200 rpm y se conservó la fase acuosa.
- Se agregó 1 volumen de isopropanol y se incubó 30 min. a T° ambiente.
- El ADN se precipitó por centrifugación a 13200 rpm.
- Se lavó con 1 volumen de etanol 70% y se resuspendió en 200 µl de agua bidestilada o TE.

La eficiencia del método se verificó corriendo el ADN en un gel de agarosa 0.8 % para constatar la integridad de la muestra.

3.2- Ensayos de Southern Blot

- Se digirieron 5 µg de ADN genómico con diferentes enzimas de restricción. Excepto con aquellas enzimas que presentan “star activity”, la digestión se incubó a 37°C durante toda la noche en un volumen final de 50-100 µl, empleando 5 unidades de cada enzima por µg de ADN y 1 mM de espermidina.
- Cuando fue necesario, el ADN se precipitó agregando 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 más 0,7 volúmenes de isopropanol. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 min., después el *pellet* se lavó etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en 40 µl de TE 1x.

- El ADN digerido se separó en un gel 0,7-0,8% agarosa que se corrió a 70 V durante 5-6 hs.
- El gel se trató con 0,25 N de HCl durante 30 min., se lavó con H₂O.
- Se transfirió durante la noche a una membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham) con 0,4 N de NaOH.
- La membrana se lavó unos minutos con SSC 2X y se prehibridó con Church a 65°C.
- Posteriormente se hibridó durante toda la noche con una sonda marcada con [α -³²P] dCTP.
- La membrana se lavó 40 min. con 2X SSC, 0,1% de SDS y 30 min. con 1x SSC, 0,1% de SDS y se expuso con pantalla amplificadora y a -70°C a una placa fotográfica.
- La placa se reveló 3 días después.

3.3- Electroforesis en geles de campos pulsantes (PFGE)

3.3.1- Preparación de bloques

- Epimastigotes crecidos en medio LIT se cosecharon por centrifugación a 1500 rpm 10 minutos, se lavaron 2 veces con PBS 1X/Glucosa 2% y se resuspendieron en PBS 1X/Glucosa 2% a una concentración de 2×10^8 parásitos/ml.
- La muestra se calentó levemente (aproximadamente 30 seg.) a 50° C y se agregó un volumen de 1,4% de agarosa SeaPlake en PBS 1X previamente equilibrada a 50° C.
- Se mezcló suavemente y se transfirió a los moldes, dejándose endurecer 5-10 minutos en heladera.
- Los bloques se colocaron en 3-5 volúmenes de LDS y se incubaron a 37° C durante 48hs.
- Se lavaron dos veces los bloques con 3-5 volúmenes de 20% NDS durante 2 hs a T° ambiente en agitación.

3.3.2-. Separación de cromosomas *T. cruzi* por PFGE

- Se preparó un gel de agarosa SeaKem 1% en buffer TBE 0,5X.
- El buffer enfrió a 14° C por recirculación.
- Los bloques de agarosa conteniendo las muestras se sembraron dentro de los posillos del gel usando una espátula y estos se sellaron con agarosa 1% en buffer TBE 0,5X.

- El gel se colocó en la cuba de electroforesis con electrodo hexagonal (BioRad) y se dejó equilibrar por 20 min.
- Se programaron los siguientes parámetros de corrida:
 - Bloque1 pulso de 60 a 90 segundos 6 V/cm duración 16 horas
 - Bloque2 pulso de 200 a 500 segundos 3 V/cm duración 20 horas
 - Bloque3 pulso de 500 a 1200 segundos 2,7 V/cm duración 12 horas
- Una vez finalizada la corrida, el gel se tiñó con una solución de BrEt 0,15 µg/ml por 30 minutos con agitación leve.
- Se destiñó posteriormente en agua deionizada por 30 minutos más y se tomó una fotografía al UV con el equipo Image Master VDS, de Pharmacia-Biotech.
- La transferencia e hibridación del gel se realizó como fue descrito para el Southern blot.

3.4-Extracción de ARN total

Para garantizar la calidad de las preparaciones de ARN se utilizó material de vidrio esterilizado por horneado, agua DEPC y material de plástico nuevo y autoclavado.

La extracción del ARN total de epimastigotes se realizó a partir de $4 \cdot 10^{10}$ epimastigotes utilizando el reactivo Total RNA Isolation (TRIzol) reagents de Gibco BRL y siguiendo las indicaciones del proveedor.

3.5- Electroforesis de ARN

Se utilizaron geles de 1,5% agarosa desnaturalizantes con 6% formaldehído en buffer MOPS 1x pH 7. Las muestras a sembrar se llevaron a 30 µl con agua DEPC y se les agregó 46 µl de buffer de siembra. Las mismas se calentaron a 65°C por 10 min., se colocaron en hielo. La corrida electroforética se realizó con buffer MOPS 1x, 6% formaldehído a 5-10 V/cm de 4 a 6 hs. Los geles fueron visualizados y fotografiados con el equipo Image Master VDS, de Pharmacia-Biotech.

3.6- Ensayos de Northern Blot

- 15 µg de ARN total fueron separados en geles formaldehído-agarosa

- El ARN se transfirió toda la noche a una membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham) usando SSC 10X.
- La membrana se sometió a un pulso de radiación ultravioleta de 120000 μ J usando un UV Stratalinker 1800 de Stratagene y se lavó unos minutos con SSC 2X
- Posteriormente se prehibridó con medio Church a 65°C durante varias horas y luego se hibridó durante toda la noche con las sondas correspondientes.
- La membrana se lavó con 2X SSC, 0,1% de SDS, 1X SSC, 0,1% de SDS y 0,2X SSC, 0,1% de SDS y se expuso a una placa fotográfica a -70°C durante 2-3 días en un cassette con pantalla amplificadora.
- Alternativamente se registró la señal empleando un fosfoimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech).

3.7- Transcripción Reversa

Se preparó ADNc utilizando de 1-2 μ g de ARN total de epimastigots como molde. Para ello el ARN se incubó con oligo-dt o una batería de hexámeros inespecíficos (random hexamers) 1-2,5 μ M, MgCl₂ 5 mM y dNTPs 1 mM por 10 minutos a T° ambiente y 60 min. a 37°C, en presencia de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega). Entre 2 y 10 μ l de ADNc se utilizaron como molde para las amplificaciones por PCR utilizando los oligonucleótidos correspondientes.

4- Técnicas con bacterias

4.1- Preparación y transformación de bacterias competentes

La preparación de bacterias competentes de *E. coli* de la cepa DH5 α se realizó según Hanaham (1983) con modificaciones.

- Se plaquearon bacterias sobre LB-agar y se crecieron a 37°C durante la noche.
- Se transfirieron 4 ó 5 colonias aisladas a un tubo de cultivo con 3 ml de LB y se crecieron en agitación a 37°C durante la noche.
- Se inoculó 1 ml de cultivo a 100 ml de LB en un erlenmeyer de 500 ó 1000 ml, y se creció en agitación a 37°C hasta DO₆₀₀ = 0,5.
- Se dejó 10 min. en hielo.

- Se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 5 min. y se descartó completamente el sobrenadante.
- Las bacterias se resuspendieron cuidadosamente en 40 ml de buffer TFB1 frío y se dejaron 5 min. en hielo.
- Se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C durante 5 min. y se descartó el sobrenadante.
- Se resuspendieron en 4 ml de TFB2 frío y se incubaron en hielo 15 min.
- Posteriormente, las bacterias se alicuotaron en tubos *eppendorf* estériles en volúmenes de 50 ó 100 µl congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido.
- Se almacenaron las alicuotas a -70°C.

Para cada transformación se usaron 50 µl de bacterias competentes. Estas se descongelaron en hielo y se transformaron con 1-10 ng de plásmido. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min. y se sometió a un golpe de calor de 42°C durante 90 segundos o 37°C durante 5 min., enfriándose después durante 1-2 min. en hielo. Se agregaron 800 µl de SOC estéril y las bacterias se recuperaron a 37°C durante 30 min. Se plaquearon de acuerdo a la eficiencia de las bacterias y a la cantidad de plásmido utilizado.

La preparación de bacterias electrocompetentes de alta eficiencia de *E. coli* de la cepa DH10B se realizó como se describe a continuación:

- Se inoculó un litro de cultivo con 1/100 de volumen de un cultivo fresco saturado durante la noche anterior.
- Se crecieron las células a 37°C en agitación vigorosa hasta DO₆₀₀ entre 0,5 y 0,7.
- Se cosecharon por centrifugación a 4000 x g durante 15 min. a 4°C en botellas estériles frías. Las centrifugaciones sucesivas fueron iguales.
- El *pellet* celular se resuspendió cuidadosamente en 1 litro de 10 % glicerol estéril, pre-enfriado.
- Se centrifugó nuevamente. Se resuspendió el *pellet* en 500 ml de 10 % glicerol estéril, pre-enfriado.
- Se centrifugó nuevamente. Se resuspendió el *pellet* en 250 ml de 10 % glicerol estéril, pre-enfriado.
- Se resuspendió el *pellet* en un volumen final de aproximadamente 4 ml de 10 % glicerol estéril, pre-enfriado.
- Se alicuotó la suspensión celular de a 50 µl, se congeló empleando N₂ líquido y se conservaron a -70 °C hasta su utilización.

Para cada electroporación se usaron 50 µl de bacterias competentes. Dada la mayor eficiencia de este método, estas bacterias se utilizaron para transformar con 1 µl de reacciones de ligación. Se empleó un equipo MicroPulser (BIORad) y cubetas descartables estériles de 1 o 2 mm de gap (BIORad). Se siguieron las instrucciones del fabricante.

4.2- Expresión de proteínas recombinantes

- Los genes *TczPDE* y *PAR* fueron amplificados por PCR utilizando los oligonucleótidos EPD (Fw y Rv) y PAR (Fw y Rv) respectivamente. Para la amplificación de *TczPDE* se utilizó ADN del fago purificado mientras que para *PAR* se utilizó ADN genómico de *T. cruzi*. Los fragmentos amplificados fueron subclonados en el vector de expresión en bacterias pMAL.
- Las construcciones se utilizaron para transformar la cepa de bacterias BL21. Cultivos saturados de las bacterias transformadas se diluyeron 1/20 en LB-ampicilina y se incubaron con agitación a 37°C, hasta una DO₆₀₀=1.
- Luego se indujeron con IPTG 1 mM (concentración final) por 2 a 3 h.
- El cultivo bacteriano se centrifugó y el *pellet* se resuspendió en solución de lisis de bacterias mas antiproteásicos (extracto total).
- Las células se lisaron usando el sonicador Heat System Ultrasonic, inc. ultrasonic processor con 5 ciclos de: 30 segundos de sonicación en el punto 5 y 60 segundos en hielo.
- Las bacterias lisadas se separaron en *pellet* y sobrenadante por centrifugación a 13000 rpm y 4°C por 10 minutos.

4.3- Purificación de proteínas recombinantes

4.3.1- Purificación de cuerpos de inclusión

- Se tomaron 5 g de bacterias BL-21 inducidas y se resuspendieron en 10 ml de solución de lisis.
- Se rompieron las bacterias por sonicación y el lisado se centrifugó 10 minutos a 12.000 xg.
- Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en solución de lisis con 10 mM MgCl₂ mas 0,02 mg/ml de ADNsa y se incubó por 30 minutos a 37° C.

- Se centrifugó 10 minutos a 12000 xg y se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en solución de lisis más 0,2 mg/ml de lisozima.
- Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó 10 minutos a 12000 xg y se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en solución de lisis más 2 mg/ml de deoxicolato de sodio.
- Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó 10 minutos a 12000 xg, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en solución de lisis con 0.5 % de Triton X-100
- Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó 10 minutos a 12000xg, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó 3 veces con agua.
- Los cuerpos de inclusión se resuspendieron en urea 8 M (solución de resuspensión).

4.3.2- Renaturalización de proteínas recombinantes

Para renaturalizar la proteína recombinante presente en los cuerpos de inclusión, se colocaron 10 ml de la solución en una membrana de diálisis (dialysis tubing D-9777 Sigma). Esta membrana se colocó en un erlenmeyer de 4 litros conteniendo 2 litros de solución de resuspensión de cuerpos de inclusión y se mantuvo a 4° C con agitación. Se goteo durante toda la noche 2 litros de la misma solución pero sin urea. De esta manera la concentración de urea se redujo a la mitad. Se paso la membrana de diálisis a 1 litro de solución de resuspensión de cuerpos de inclusión 4 M urea y se colocó a 4° C con agitación. Se gotearon durante toda la noche 3 litros de esta misma solución sin urea. Se repitió este procedimiento reduciendo de esta manera progresivamente la concentración de urea en la solución. Como último paso se colocó la membrana de diálisis con los cuerpos de inclusión en un erlenmeyer de 4 litros con la solución de resuspensión sin urea y se la dejo a 4° C toda la noche con agitación para eliminar cualquier resto de urea.

4.3.3 Purificación de la proteína recombinante en resinas de amilosa

- El extracto de la proteína recombinante renaturalizada se diluyó 1:5 con buffer de columna.

- Se colocó 1 ml de resina de amilosa en una columna de 10 ml (BioRad) y se equilibró con 8 volúmenes del mismo buffer.
- El extracto diluido se cargó en la columna y se eluyó a un flujo constante de 1 ml/minuto.
- Se colectó el percolato para analizar luego por SDS-PAGE.
- Se lavó con 12 volúmenes de buffer de columna.
- Se eluyó la proteína recombinante con buffer de columna más 10 mM maltosa de manera de competir los sitios de la MBP. Se colectaron 20 fracciones de 200 µl.

4.4- Obtención de Anticuerpos

Se utilizaron 4 ratones de la cepa *Balb-C*.

- 500 µg de proteína recombinante se sembraron en un gel SDS-PAGE utilizando calles de gran tamaño (3 cm).
- El se corrió, se tiñó con Coomassie Blue en agua y se localizó la banda de interés.
- Esta se cortó con un bisturí estéril y se trozó en pequeños fragmentos.
- Se liofilizaron los trozos de gel y una vez secos se pulverizaron con mortero.
- El polvo se humedeció con PBS 1x y se pasó repetidas veces por jeringas de grosor descendente hasta lograr pasar el granulado por una punta 21G o 22G.
- Antes de la primera inoculación se retiró suero preinmune de todos los ratones.
- Los ratones fueron inoculados intraperitonealmente con la proteína recombinante emulsionada con adyuvante completo de Freund.
- Luego de 15 días se realizó una segunda inoculación con proteína recombinante y adyuvante incompleto de Freund.
- Pasados 15 días más se les aplicó una tercera inoculación y 15 días después se sangraron por la cavidad ocular.
- La sangre extraída se dejó 1 hora a 37° C en un tubo *eppendorf* y posteriormente se incubó toda la noche a 4° C para permitir la completa coagulación.
- Se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos produciendo la separación del coagulo del suero.
- El suero se alicuotó de a 10 µl y se guardó a -20°C

5- Técnicas con levaduras

5.1- *S. cerevisiae*

5.1.1- Transformación

- Se inocularon 10 ml de medio YPD con una colonia grande de las levaduras a ser transformadas. Se dejó crecer, según la cepa de levadura 30°C durante toda la noche.
- Se diluyó en 50 ml de YPD hasta una $DO_{600nm} = 0.5$ y se dejó crecer con agitación durante 2-4 hs.
- Se cosecharon por centrifugación a 2500 rpm y T° ambiente. El *pellet* se resuspendió en 40 ml de TE o H₂O y se volvió a centrifugar a 2500 rpm y T° ambiente.
- El *pellet* se resuspendió en 2 ml de solución LiOAc y se incubó por 10 min. a T° ambiente
- 1-2 µg de plásmido a ser transformado se mezcló con 50 µl de una mezcla de ADN *carrier* preparada en el momento.
- A la mezcla de ADN (plásmido + ADN carrier) se le agregaron 100 µl de las levaduras en solución LiOAc y se mezclaron bien.
- Luego se le agregaron 700 µl de la solución PEG-LiOAc, se mezcló con *vortex* y se incubó con agitación por 30 min. - 1 hr o 30°C.
- Se incubó a 42°C por 7-10 min. (golpe de calor).
- Se centrifugaron a máx. velocidad por 20 segundos. El sobrenadante se descartó y el *pellet* de levaduras se resuspendió en 150 µl de TE y se plaqueó en los correspondientes medios de selección.

5.1.1.2- Gran Escala

Se utilizó para transformar levaduras L40 transformadas con el vector pBTM116-DC (AC1) con la biblioteca de expresión de *T. cruzi*.

- Se creció un cultivo de 5 ml de L40/AC1 en medio TULys durante toda la noche a 30°C.
- Se inocularon los 5 ml en 100 ml del mismo medio y se dejó crecer durante toda la noche a 30°C.
- El cultivo saturado se diluyó hasta una $DO_{600} = 0.3-0.5$ en 300 ml de medio YPD + 40

- µg/ml de adenina y se dejó crecer en agitación a 30°C durante 4 hs.
- Las levaduras se cosecharon por centrifugación a 2500 rpm por 5 min. a T° ambiente.
 - El *pellet* se resuspendió en 250 µl de TE y se volvió a centrifugar.
 - El *pellet* se resuspendió en 10 ml de solución LiOAc y se incubó por 10 min. a T° ambiente.
 - Se le agregó una mezcla de ADN compuesta por 250 µg de la biblioteca plasmídica de expresión y 1 ml de ADN *carrier*.
 - Se le agregaron 70 ml de solución PEG-LiOAc, se mezcló bien y se incubó con agitación por 30 min. a 30°C.
 - Se le agregaron 6 ml de DMSO, se mezcló bien y se incubó a 42°C por 6 min. (golpe de calor) agitando ocasionalmente para permitir una temperatura homogénea.
 - Se enfrió rápidamente hasta T° ambiente en baño de agua y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. a T° ambiente.
 - Las levaduras se lavaron con 300 ml de TE. El *pellet* se resuspendió en 500 ml de YPD y se incubó con agitación por 1 hr a 30°C.
 - Las levaduras se centrifugaron y se volvieron a lavar con 300 ml de TE.
 - Se sembraron 1/10⁴ del volumen total en placas TUL para medir la eficiencia de transformación y las levaduras se volvieron a centrifugar a 2500 rpm por 5 min. a T° ambiente.
 - El *pellet* se resuspendió en 500 ml de TUL y se incubó con agitación a 30°C por 16 hrs.
 - Las levaduras se cosecharon y se lavaron con 250 ml de TE.
 - El *pellet* final se resuspendió en 5 ml de TE.
 - Se sembraron 200, 150, 100, 50 y 10 µl en placas THULL y se dejaron a 30°C por 3-5 días

5.1.2- Complementación

5.1.2.1- TczAC

Para los ensayos de complementación de TczAC en levaduras transformadas con el gen *TczAC* entero, el dominio catalítico o el vector vacío fueron crecidas en placas Gal⁺ e incubadas a 30°C o 34°C por dos días.

5.1.2.2- TczPDE

Para los ensayos de complementación en levaduras carentes de fosfodiesterasas de AMPc, el gen *TczPDE* entero fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos CPDFw y CPDRv. La banda amplificada fue subclonada en el vector de expresión en levaduras pADNS (leu^+) bajo el promotor de expresión constitutiva ADH1. La construcción fue utilizada para transformar las levaduras de la cepa PM943 y J106, y los clones positivos fueron seleccionados a 30°C en medios Leu^- . Como control se utilizó el plásmido pADNS vacío.

Para los ensayos de choque térmico las levaduras se crecieron a 30°C en medio Leu^+ o YPD hasta $DO_{600} = 1.8-2$ y luego se incubaron a 55°C por 30 minutos. Después de esto las células se plaquearon en YPD y se incubaron a 30°C por dos días.

5.1.3- Preparación de extractos proteicos

- Las levaduras transformadas con el gen *TczAC* se crecieron por dos días en medio Ura^- , se centrifugaron a 4000 xg a 4°C por 5 min., se resuspendieron en medio Gal^+ y se crecieron por 16 hs más. Las células fueron cosechadas a 4000 rpm 4°C por 10 min. (extracto crudo).
- Las levaduras transformadas con el gen *TczPDE* fueron crecidas hasta $DO_{600} = 1,5$ y cosechadas a 4000 xg a 4°C por 10 min. (extracto crudo).
- Los extractos crudos de las levaduras fueron resuspendidos en buffer de lisis más antiproteásicos y las levaduras fueron lisadas por 10 ciclos de *vortex* 1 min./hielo 1 min. en presencia de *glass beads* (425-600 μm). El debris celular fue descartado por centrifugación a 2500 xg 4°C. Los sobrenadantes fueron centrifugados a 100.000 xg a 4°C durante 1 hr. Los *pellet* fueron resuspendidos en Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 5% glicerol mas antiproteásicos y utilizados como fracción particulada.

5.1.4- Lavado de membranas

Para remover los complejos Ca^{+2} -calmodulina endógenos las membranas de levaduras fueron lavadas con Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 5% glicerol, EGTA 5 mM y NaCl 0,1 M

por 30 minutos a 4°C y en agitación. Las membranas así tratadas fueron lavadas dos veces con Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 5% glicerol para remover todo el EGTA.

Para la extracción de TczPDE de la membrana:

- Las membranas de las levaduras transformadas fueron lavadas con Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 5% glicerol, NaCl 1 M por 30 min. a 4°C y en agitación.
- Se centrifugó a 100.000 xg a 4°C durante 40 min.
- Se resuspendió el *pellet* en el mismo buffer pero con colato de sodio 0,1% en lugar de NaCl y se lavó por 30 min. más.
- Se centrifugó a 100.000 xg a 4°C durante 40 min.
- Se resuspendió el *pellet* en el mismo buffer pero con colato de sodio 0,5% y se lavó por 30 min. más.
- Se centrifugó a 100.000 xg a 4°C durante 40 min.
- Finalmente se resuspendió el *pellet* en el mismo buffer pero con urea 8 M y se lavo por 30 min.
- Se centrifugó a 100.000 xg a 4°C durante 40 min. y el *pellet* se resuspendió en Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 5% glicerol.

5.1.5- Ensayo de doble híbrido en levaduras

5.1.5.1 Ensayo de dimerización

El dominio catalítico de TczAC se amplificó por PCR con los oligonucleótidos DHFw y DHRv y se subclonó en el vector de expresión en levaduras pBTM116 (*trp*⁺) en fusión con el dominio de unión al ADN LexA (AC1). Esta construcción fue utilizada para transformar la cepa de levaduras L40 las cuales fueron seleccionadas 30°C en medios TULys. La expresión de la proteína de fusión en extractos de las levaduras transformadas se confirmó por ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo comercial que reconoce el dominio LexA. La correcta conformación del dominio catalítico se verificó por ensayos de actividad adenilil ciclasa en extractos solubles de las levaduras transformadas.

Por otro lado el mismo dominio catalítico se amplificó con los oligonucleótidos DIMFw y DIMRv y se subclonó en el vector de expresión en levaduras pGAD (*leu*⁺) en fusión con el dominio activador de la transcripción Gal4 (AC2). Esta construcción se utilizó para transformar las levaduras L40 salvajes y también que expresaban la fusión AC1. Los clones

positivos fueron seleccionados a 30°C en los medios ULL y TULL respectivamente. La interacción entre los dominios catalíticos se determinó analizando la capacidad de revertir el fenotipo *his⁻* de la cepa original y por ensayos de actividad β -galactosidasa.

5.1.5.2 Rastreo de la biblioteca de expresión de *T. cruzi*

Las levaduras L40 que expresaban la fusión AC1 fueron cotransformadas con 250-300 μ g de la biblioteca plasmídica de expresión de *T. cruzi* subclonada en el vector pVP16 (*leu⁺*). Los clones transformados fueron seleccionados a 30°C en medios TULL por 16 hs para inducir la expresión del gen HIS3 y LacZ y luego la interacción se analizó por crecimiento en medios HTULL y actividad β -galactosidasa.

Como último paso para descartar falsos positivos se realizó el control de interacción específica. Este ensayo consiste en determinar si las proteínas expresadas por estos clones son capaces de asociarse a cualquier proteína y activar el sistema. Para ello las levaduras conteniendo los posibles clones positivos fueron crecidas en medios con triptofano (ULL) para que perdieran la fusión AC1 y luego retransformadas con el vector pBTM116 al que se le subclonó el gen para la lamina (gen inespecífico). La selección de las transformantes se realizó en placas TULL. Tres clones de cada transformación se estiraron por duplicado en placas THULL y TULL. Las colonias crecidas en esta última placa se ensayaron para actividad de β -galactosidasa.

Se realizó una minipreparación de plásmidos de levaduras de todos los clones positivos y se amplificó por PCR el inserto presente en el vector pVP16 con los oligonucleótidos flanqueantes M13Fw y VP16Rv. Los fragmentos obtenidos fueron subclonados en el vector pGEM-Teasy y secuenciados.

5.1.5.3- Interacción con paraflagellar rod

Para confirmar la interacción entre TczAC y paraflagellar rod se amplificó el gen PAR entero del genoma de *T. cruzi* utilizando los oligonucleótidos PARVP16Fw y PARRv. El gen amplificado se subclonó en el vector pGEM-Teasy y se liberó con las enzimas de restricción BamH I y Not I. El fragmento liberado fue purificado y se utilizó como inserto en una reacción de ligación con el vector pVP16 digerido con las mismas enzimas. La construcción

obtenida se utilizó para transformar la cepa L40 que expresaba la fusión AC1. La interacción entre ambas proteínas de fusión se determinó analizando el crecimiento en medios sin histidina y midiendo la actividad β -galactosidasa. La especificidad de la interacción se confirmó con la proteína no relacionada lamina como fue descrito en la sección anterior.

5.1.6- Medición de actividad β -galactosidasa

Para los ensayos en placa

- Se transfirieron colonias de levaduras a filtros de nitrocelulosa.
- Las membranas se colocaron, colonias hacia arriba, sobre un soporte de aluminio que flotaba en nitrógeno líquido. Luego de 30 segundos se sumergieron por 5 segundos.
- Los filtros se colocaron, colonias hacia arriba, sobre papel Whatman™ 3MM y se los dejó descongelar a T° ambiente
- Luego se colocaron dentro de la tapa de una caja de petri (10 cm diámetro) sobre papel Whatman™ 3MM humedecido con buffer Z + 50 μ l de 25 mg/ml X-gal. La caja se tapó y colocó a 30°C hasta la aparición de color azul.

Para los ensayos en medio líquido

- Se crecieron 5 ml de las levaduras toda la noche.
- Se inocularon 5 ml de cultivo con 20-50 μ l de cada cultivo.
- Se crecieron las levaduras a 30°C hasta DO₆₀₀= 2 para las levaduras en medio rico y DO₆₀₀= 0,5-4 para las levaduras en medios mínimos.
- Se centrifugaron las células a 1100 xg 5 minutos, se resuspendieron en el mismo volumen de buffer Z y se dejaron en hielo.
- Se determinó la DO₆₀₀ de cada muestra.
- Se tomaron 100 μ l y 50 μ l de cada muestra y se les agregó 900 μ l y 950 μ l de buffer Z respectivamente (cada una se realizó por duplicado o triplicado).
- Se agregó una gota de SDS 0,1% y dos gotas de cloroformo.
- Se *vortexeó* por 10-15 segundos y se equilibrio por 15 min. a 30°C.
- Se agregaron 0,2 ml de ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactosidasa) 4 mg/ml y se *vortexeó* 5 segundos.
- Se incubó a 30°C hasta la aparición del color amarillo determinándose el tiempo

transcurrido y se paró la reacción con el agregado de 0,5 ml de Na₂CO₃.

- Las células se centrifugaron a 1100 xg 5 min y se determinó la DO₄₂₀ y DO₅₅₀.
- La actividad se calculó como:

$$U = \frac{1000 \times [(DO_{420}) - (1,75 \times DO_{550})]}{(t) \times (v) \times (DO_{600})}$$

5.1.7- Minipreparación de plásmidos de levaduras

- Se crecieron 5 ml de levaduras hasta saturación en el medio correspondiente.
- Se centrifugaron a 2000 rpm 5 min.
- Se resuspendieron en 300 µl de buffer de ruptura (BA).
- Se agregó 150 µl de *glass beads* (425-600 M) y 0.3 ml de fenol:cloroformo (1:1).
- Se *vortexeo* vigorosamente 1 min.
- Se cecntrigufó a max. velocidad 1 min.
- Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, se precipitó con etanol y se resuspendió en 20-25 µl de TE 1X.
- Se utilizó para las PCRs 1 µl de una dilución 1/10 o 1/20 de extracto soluble

5.1.8- Extracto soluble de levaduras

- Se crecieron 10 ml de levaduras hasta saturación en el medio correspondiente.
- Se centrifugaron a 2000 rpm 5 min.
- Se resuspendieron en 250 µl de buffer de ruptura (BB).
- Se agregó 1 gr de *glass beads* (425-600 M).
- Se realizaron 10 ciclos de *vortex* 1 min./hielo 1 min.
- Se agregaron 250 µl más de buffer
- Se mezclo bien y se tomó el sobrenadante.
- Se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C 20 min.

5.2 *S. pombe*

5.2.1 Transformación

- Se crecieron 150 ml de cultivo en medio mínimo EMM hasta una densidad de $0,5-1 \cdot 10^7$ células/ml ($DO_{600} = 0.2-0.5$).
- Se centrifugaron las células a 3000 rpm por 5 minutos.
- Se lavaron con 40 ml de agua estéril y se centrifugaron otra vez.
- Se resuspendieron a una densidad de $1 \cdot 10^9$ células/ml en 0,1 M LiOAC pH 4,9 (ajustado con ácido acético).
- Se prepararon alícuotas de 100 μ l y se incubaron a 30°C por 1-2 hs. Las células sedimentan en esta etapa.
- Se agregó 1 g de ADN plasmídico en 15 μ l de TE a cada tubo y se mezcló por *vortex* hasta que las células se resuspendieron totalmente. No hay que dejar enfriar los tubos en esta etapa.
- Se agregaron 290 μ l de PEG 4000 50% precalentado a 30°C. Se mezcló por *vortex* y se incubó a 30°C 1 h.
- Se incubó a 42°C por 14 minutos y enfriar los tubos a T° ambiente por 10 minutos.
- Se centrifugaron las células a 5000 rpm 2 minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se resuspendieron las células en 1 ml de medio YES (1/2) con pipeta.
- Se transfirieron a un erlenmeyer de 50 ml y se diluyeron las células con 9 ml de medio YES.
- Se incubó a 30°C por 1 h.
- Se plaquearon 50-300 μ l en las placas de medio mínimo correspondientes.

La transformación tuvo una eficiencia de 10^4 a 10^5 colonias por microgramo de ADN. Alternativamente se agregó 10 g de ADN de esperma de salmón sonificado al ADN plasmídico para aumentar la eficiencia.

6- Técnicas con parásitos

6.1- Cultivo

El cultivo de epimastigotes se efectuó en medio LIT a 28°C. Típicamente se inició un cultivo con 10^6 células/ml y a los siete días se alcanzó la fase exponencial con 10^8 células/ml aproximadamente.

6.2- Preparación de extractos

Los parásitos se cosecharon a 2500 xg 10 min., se levaron con PBS 1X y se resuspendieron en buffer de lisis mas antiproteásicos. La ruptura de las células se llevó a cabo por 10 ciclos de congelamiento/descongelamiento en N₂ líquido. El extracto obtenido se centrifugó 1 hr a 100.000 xg. El *pellet* se resuspendió en el buffer de lisis y se lo utilizo como fracción particulada.

6.3- Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular se llevó a cabo como fue descripto por Gomez y col. (1989). Para ello *pellets* de epimastigotes de *T. cruzi* se resuspendieron en Tris-HCl 25 mM pH 8, sacarosa 0,25 M y KCl 5 mM mas antiproteásicos. Las células se rompieron como fue descripto para la obtención de extractos de parásitos y el debris celular se descartó a 500 xg por 10 min. El homogenato obtenido se sometió a 6 centrifugaciones secuéniales de 1000 xg 15 min. (Flagelo), 5000 xg 15 min. (Mitocondria), 11000 xg 30 min. (Lisosomal Pesado), 16000 xg 30 min. (Lisosomal medio), 30000 xg 30 min. (Lisosomal liviano) y 105.000 x g (Microsomal). Todas las fracciones fueron lavadas y resuspendidas en el mismo buffer.

6.4- Inmunolocalización

- Los epimastigotes fueron cosechados a una densidad de $2-5 \times 10^7$ parásitos/ml y lavados dos veces con PBS 1X
- Los parásitos se colocaron por 10 min. sobre portaobjetos de 8 posillos tratados con Vectabond (Laboratorios Vector) para aumentar la adhesión.

- El exceso de células se descartó y los parásitos adheridos fueron fijados con paraformaldehído 3,5 %.
- Los parásitos se lavaron 3 veces con PBS 1X y se permeabilizaron con metanol 100% a -20 °C
- Las células se rehidrataron con PBS y se incubaron con soroalbúmina 2% en PBS-T por 30 minutos.
- Se incubaron los protaobjetos toda la noche con los correspondientes anticuerpos (anti-TczPDE 1/200 a 1/500, anti-tubulina 1/1000 y anti-PAR 1/4).
- Los parásitos se lavaron 3 veces con PBS-T y se incubaron con los anticuerpos del *kit Alexa Fluor® 488 Signal-Amplification* para ratón (Molecular Probes Inc.) siguiendo las instrucciones del proveedor.
- Después de esta incubación se lavaron con PBS-T y se incubaron con DAPI 0.1 µg/ml en agua por 5 minutos.
- Las células se lavaron con agua y se montaron los cubreobjetos utilizando el reactivo Prolong (Molecular Probes Inc).

Las imágenes se obtuvieron utilizando un Microscopio Laser Confocal (LSM 410 UV mounted on an Axiovert 135 microscope, Carl Zeiss, Inc.) Las imágenes se tomaron de manera secuencial para aumentar la ñal y disminuir el cruzamiento con las otras señales fluorescentes. La excitación de Alexa 488 se realizó con el laser omnicromo de Ar/Kr (Melles Griot). La excitación del DAPI se produjo con el laser de Ar (Enterprise 652, Coherent Laser). Las imágenes se tomaron con un objetivo de inmersión 100x DIC N.A. = 1.4 de Zeiss Plan-Apo. Se obtuvo una resolución de ~0,6 µm en el eje Z. Cuando se tomaron secciones estas fueron de 0,5 µm cada una. Las imágenes fueron tomadas con el programa LSM ver 3.98 para *Windows* de Zeiss y analizadas con el programa LSM Image Browser version 2.8 para *Windows* de Zeiss.

6.5- Tratamientos

La permeabilización de las células para analizar la localización flagelar de TczPDE se llevó a cabo como fue descrito por Godsel y Engman (1999). Los parásitos adheridos a los posillos del portaobjetos fueron tratados por 3 min con un buffer conteniendo 100 mM PIPES, 1% Triton X100, 1 mM NaCl y 25 mM Ca⁺², y rápidamente lavados 3

veces con PBS 1X antes de ser fijados. Los citoesqueletos se prepararon como fue descrito por Ersfeld and Gull (2001). En este caso las células se incubaron por dos minutos con el buffer 100 mM PIPES, 0.5 % Nonidep P-40 (NP-40), 2 mM EGTA y 1 mM MgSO₄ a 4°C, y después fueron lavados 3 veces con PBS 1X antes de ser fijados.

7- Técnicas de proteínas

7.1- Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de los extractos fue determinada por el método de Bradford utilizando muestras concentradas o diluciones de los mismos. Se usó seroalbúmina bovina para realizar una curva de calibración y las lecturas de absorbancia se hicieron a 620 nm. Se realizaron como mínimo dos duplicados para cada muestra.

7.2- Electroforesis de proteínas

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Se armaron geles desnaturalizantes (0,1 % SDS) de 8 a 12% en celdas BioRad 220. Las muestras a ser analizadas se prepararon agregándoles los volúmenes correspondientes de buffer de siembra 5X y calentándolas por 3-5 min. a 100°C. Como buffer de corrida se usó Tris-glicina-SDS 1X. Los marcadores de peso molecular usados fueron de 6,5 a 175 kDa (NEB).

7.3- Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie Blue

La tinción de los geles se realizó sumergiendo el gel en una solución de Coomassie Brilliant Blue R250 0.25g en 100 ml de Metanol:Agua:Acido acético (5:4:1 V/V) durante 15 minutos con agitación suave. Luego se destiñó con la misma solución sin el colorante hasta obtener la intensidad de las bandas deseada. Por último, se transfirió a un papel de cromatografía Whatmann 3 MM (Whatmann, Alemania), se lo cubrió con polietileno y se secó a 80°C con vacío durante al menos 1 hora.

7.4- Ensayos de Western Blot

Extractos proteicos (20-80 μg) fueron resueltos en geles SDS-PAGE al 8-12% y luego electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (Amersham-C). La transferencia se hizo en cuba de inmersión (Bio-Rad) utilizando Tris-glicina 1x, 20 % metanol durante 1-1,5 hs a 80-100 volts. Las membranas fueron incubadas durante 1 h con solución de bloqueo (5 % leche descremada o 4% soroalbúmina bovina en buffer TBS-T) y luego con los correspondientes anticuerpos primarios durante 1-2 hs a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T, se incubaron durante 1 h con los correspondientes segundos anticuerpos y se volvieron a lavar. Como sustrato para la peroxidasa se usó el *kit* de quimioluminiscencia Renaissance (NEN-Dupont). Los anticuerpos se diluyeron en 5% leche descremada o 0,4% soroalbúmina. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron sueros de cabra, anti-Fc de IgGs de conejo o ratón acopladas a peroxidasa (Amersham)

8- Ensayos bioquímicas

8.1- Ensayos de actividad adenilil ciclasa

La actividad adenilil ciclasa se determinó como fue descripto por Flawiá y col. (1983). Los ensayos fueron realizados como al menos por triplicado utilizando 30-50 μg de proteína de extractos de levaduras o 10-15 μg de proteína de extracto de *T. cruzi* en presencia de 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mM Mg^{+2} o Mn^{+2} , 5 mM IBMX, 1 mM AMPc y 1 mM $\text{ATP}\alpha\text{-}[^{32}\text{P}]$ 200 cpm/pmol. Las incubaciones se realizaron por 20 min a 37°C en un volumen total de 200 μl . La reacción se detuvo por el agregado de 40 mM ATP, 10 mM AMPc y 2500-4000 cpms $[^3\text{H}]\text{-AMPc}$ y calentamiento a 100 °C

Se agrego 1 ml de agua destilada (H_2O_d) y la muestra se paso por la columna de intercambio iónico Dowex AG50W X4 200-400 Mesh (BioRad). La columna se lavó secuencialmente con 1ml y 2ml de H_2O_d y se eluyó con 6 ml de H_2O_d sobre una columna Alúmina (Sigma). La columna de alúmina se lavó con 1 ml de imidazol 0,1 M pH 7,5 y se eluyó con 4 ml de la misma solución. Al eluyente se le agrego 5 ml de liquido de centelleo Ultima gold®

8.2- Ensayos de actividad fosfodiesterasa

La actividad de fosfodiesterasa de AMPc se ensayó según el método de Thompson y Appleman (1974) con la modificación introducida por Londesborough (1976). A menos que sea indicado, la reacción se llevó a cabo durante 10 minutos a 30° en presencia de 20 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 1 o 50 μM AMPc y [³H]-AMPc 50000 cpm/ensayo en un volumen de 100 μl. La reacción se detuvo por calentamiento a 100° C durante 1 minuto e inmediatamente se 40 μl de veneno de serpiente (King cobra) 2mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH 8 produciéndose la segunda reacción por 30 minutos. Esta se detuvo por el agregando 20 μl de una solución 50 mM EDTA y 5mM Adenosina.

A continuación se agregó 1 ml de una suspensión que contenía 33% de resina de intercambio iónico AG1-X4 (200–400 mesh) y 30 % de etanol en agua. Se agitó bien, se dejó sedimentar y se tomaron 0,5 ml del sobrenadante al que se le agregaron 2 ml de líquido de centelleo Ultima gold®.

Se utilizó 1 μM AMPc para los ensayos de inhibición, estimulación por Ca²⁺-calmodulina y competencia con GMPc. Los últimos dos ensayos también se realizaron con 50 μM AMPc.

RESULTADOS

Resultados

Modulo I.

1- Análisis molecular del gen *TczAC*

Como fue mencionado en datos preliminares, a partir de una biblioteca genómica de *T. cruzi* construida en el bacteriófago lambda Fix II se aisló una gen correspondiente a una adenilil ciclasa. Este gen de 3942 pares de bases (pb) denominado *TczAC*, codifica para una enzima de 1313 aminoácidos con un peso molecular esperado de 143 kDa (Figura 19)

Se ha reportado que las adenilil ciclasas de tripanosomátidos presentan una estructura diferente a las enzimas de mamíferos con un extremo amino-terminal extracelular, un único dominio transmembrana, y un dominio catalítico carboxilo-terminal. Para determinar si *TczAC* presentaba una estructura similar a la previamente descrita en estos organismos, la secuencia proteica de la misma se analizó con distintos programas que predicen la presencia de dominios funcionales y transmembrana. El programa DAS predijo 5 dominios hidrofóbicos entre los aminoácidos 1-38, 608-628, 658-679, 830-852 y 1281-1307 (Figura 19 y 20). El primer dominio hidrofóbico corresponde a un posible péptido señal, el cual presenta una secuencia de corte entre los aminoácidos 37 y 38 (Figura 19). En este contexto, para que *TczAC* presente una estructura análoga a la previamente descrita para las adenilil ciclasas de tripanosomátidos solo debe tenerse en cuenta el dominio transmembrana con mayor probabilidad de ocurrir (830-852). Sin embargo, al comparar estas secuencias con regiones consideradas dominios transmembrana de la adenilil ciclasa de mamíferos Cyal (de 12 pasos transmembrana) la posibilidad de que los otros dominios actúen también como pasos transmembrana no puede descartarse (Figura 20). Datos similares se obtuvieron utilizando los programas TMPRED, SPLIT y PRED-TMR. Por otro lado, y como ha sido observado en todas las adenilil ciclasas de tripanosomátidos, *TczAC* posee un único dominio catalítico (Figura 19).

```

1  M A V G W V A V W P R E R R A C A A S R C L F V A L L L L
30 L D L P Y A V A Q P S G G D R V V K V V S F E F D F T L L
59 D A F F R N I M A G F K A S L H S R N N S I M N G V R V E
88 I V E K K T K F T N Y A I D L S A A L K D E N D I F A V V
117 G H C G D K L L L N I K D V L A E R D V V A F S P F T G S
146 S L V R G W N P N F Y F L R A E P A A E L L A L L R Y A L
175 A H L R V R R L G F M Y L Q G V S F G D R E Y A Q A Q R V
203 M S E R N L T F S G V F S V E S S V T G G A R K E V F D A
233 A W E A F A D T R P Q A V I V F G S P I T D T A E F F R R
262 M L T D R R T A G A Y L L A P S L L Q E L V L R V W R A A
291 V A G G V E F V P G Q V I T T G T N P L A K D T Q Y E A I
320 Q R F Q E V M R A Y L T H S G Q K D Y A D K D H F L K D D
349 G D G E M M V A G W I A G E V L S Q A L G S R E W V K D R
378 K S F L A S L Y N Q R R Y M V D D I V I G D Y G G E C K A
407 G A A S Q G A A C R C N Q G G R T V Y I K K F V E S F R A
436 V Y A D W G T L V V P L S E C E A S G L M L R G T L N G V
465 G F M L V D I P P V S K V I S E L R K G F Y G G R M M H N
494 A F L I T S D E V S M Q L I S S T R N G A P D A L R E T M
523 E A K R V D F V G G V V T E A M L E M E G V D F I D P L L
552 L E P R L N R F R R N V M C L S P T L E Q Q F F V L A E Y
581 L G N A S G G S A H A V I R S G E A A A M A D V L R R S L
610 L T F G V S L A S A T L L A G G D A L V D H L P V E G D V
639 F V V G L S A G D A G A I A R H V S S S H G G V R V F V V F
667 L E F A L L H A E F V A A F R D G A G A D R V V F A T S L
697 P H W N D R G S A S E T A R K F A A A V T R E E D R T P L
726 S L M S F A A T R L V H T A L S R M Y R V S A E Q L A D F
755 F Y N N V A V A V D D M L Y G P F A D G R A C P A T E S G
784 A G C G R N Y G A T R I S V W P L A R A L D P A V P E L F
813 P A V T P S M K Y A D P A A G G L T A R L L I G V I A G C
842 A A A L L L V A V L R Y F S H S S R D N A N A P K E R L H
871 P V T L V F T D I E S S T A L W A A C P E T M P D A V A T
900 H H R L I R S L I A K Y R C Y E V K T I G D S F M I A C K
929 S A F A A V Q L V R E L Q Q V F L Q H D W G T S V I D D A
958 Y R M F E E D R A E E D A E Y V P P T A R L D A A V Y R Q
987 Y W N G L R V R V G V H T G L C D I R H D E V T K G Y D Y
1016 Y G G T S N M A A R T E S V G N G G Q V L L T R A A Y F A
1045 L S T A E R E Q V E V T A L G A V A L R G V P K L V E M Y
1074 Q L D A V P G R V V A G L R L D K D D G A V D D Y S D C A
1013 S G S S G A S R N T C Y E S A V S F I S G L M S P Y A S R
1132 Q R A G V L E S L C R R W R V R V V E K G V M S Y D D Y C
1161 A A L V E R L A G R V S R V I G Y R V D G L S G V S L A E
1190 I A A A S A V S S Q R Q S R I R S F Q F I G R S G S S S C
1219 T E L S S V V S P V D G S E A L P Q E S L V C P I V M R P
1248 T V L R E L G W R V H V S S V T S Y S D S L D P D A M R P
1277 R G H E V C V T C Q L S F F L S V D V L L C F S D G A I F
1306 V G S P S I P Q

```

Figura 19. Secuencia proteica de la adenilil ciclasa TczAC. Las letras resaltadas en gris corresponden al posible péptido señal. Los aminoácidos subrayados indican los posibles dominios transmembrana. Las letras blancas resaltadas en negro muestran el dominio transmembrana más probable. El recuadro indica el dominio catalítico.

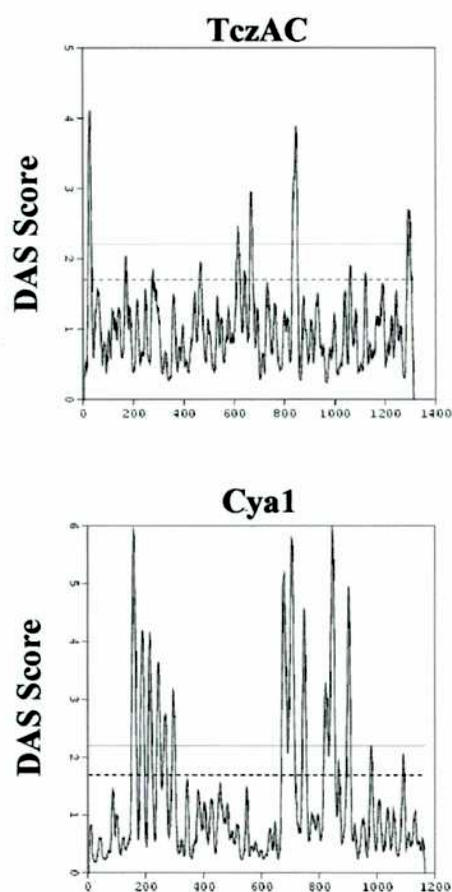


Figura 20. Dominios hidrofóbicos de TczAC y Cya1. Se muestran los resultados obtenidos con el programa DAS de análisis de dominios hidrofóbicos. Cya1, adenilil ciclasa de mamíferos de 12 pasos transmembrana.

La alineación de la secuencia proteica de TczAC utilizando los algoritmos BLASTP y ClustalW demostró que presenta entre un 60-67% de identidad con otras adenilil ciclasas descritas en *T. cruzi* y entre un 35-48% con las enzimas de *L. donovani* y de *T. brucei* respectivamente (Tabla IV). De forma contraria, la identidad de TczAC con adenilil ciclasas de mamíferos fue menor a un 25% presentando incluso una mayor homología con receptores guanilil ciclasa (Tabla IV). Se analizó también la identidad con la adenilil ciclasa ACG de *Dyctiostelium discoideum*, la cual presenta una estructura análoga a la descrita para las enzimas de tripanosomátidos. A pesar de esto, ACG también mostró baja identidad de secuencia con TczAC (25%). Un análisis detallado indicó que la región correspondiente al dominio catalítico es la más conservada, con una identidad de hasta un 80% (Tabla IV). Por el contrario, la región

amino-terminal es la menos conservada (<57%) y no presenta similitud alguna con las enzimas de mamíferos.

<i>Organismo (gen)</i>	Proteína entera	Dominio catalítico	Dominio amino-terminal
<i>T. cruzi</i> (ADC1)	67%	75%	57%
<i>T. cruzi</i> (ADC4)	60%	73%	49%
<i>T. equiperdum</i> (eESAG4c)	58%	61%	—
<i>T. brucei</i> (GRESAG4.3)	43%	58%	34%
<i>T. congolense</i> (TcADCYC1)	48%	57%	—
<i>L. donovani</i> (RacA)	35%	53%	34%
<i>H. sapiens</i> (GCRP)	24%	27%	NS
<i>D. discoideum</i> (ACG)	25%	25%	NS
<i>B. taurus</i> (AC1 Cya1)	23%	<20%	NS

Tabla IV. Porcentajes de identidad de la secuencia aminoacídica de TczAC entera, su dominio catalítico o su extremo amino-terminal con distintas enzimas. Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa BLATP. Excepto el receptor guanilil ciclasa (GCRP) todas las secuencias corresponden a adenilil ciclasas con los números de acceso al GenBank AJ012096, T30876, P26338, Q99280, Z67964, U17042, NP_000897, M87278 y P26338 respectivamente.

A pesar de la baja identidad de secuencia de TczAC con las adenilil ciclasas de mamíferos, todos aquellos aminoácidos que tienen una función fundamental para la actividad catalítica se encuentran altamente conservados. Entre ellos se incluyen los residuos de unión a cationes divalentes, los residuos de unión al sustrato y los residuos involucrados en la especificidad por ATP (Figura 21). Por el contrario, los aminoácidos involucrados en la interacción con el activador forskolina o con las subunidades α o β de las proteínas G no están presentes en la secuencia de TczAC, lo cual sugiere la presencia de un mecanismo regulador diferente para esta enzima (Figura 21).

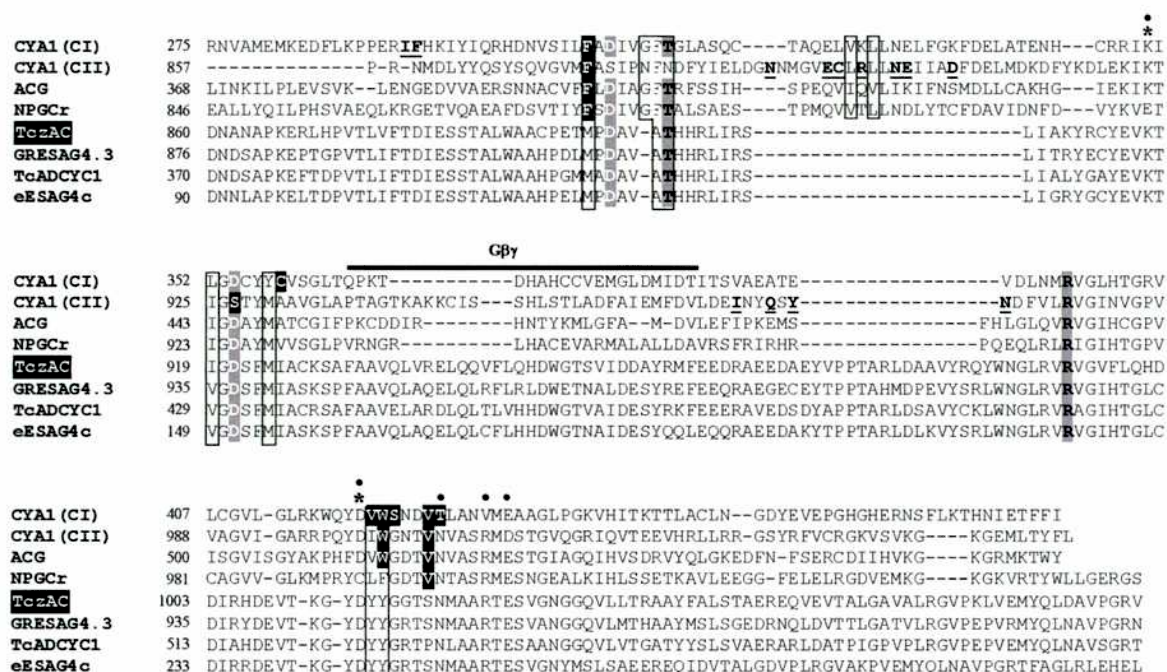


Figura 21. Alineación del dominio catalítico de TczAC. Las secuencias se alinearon utilizando el programa ClustalW. Los residuos en negrita y subrayados representan aminoácidos involucrados en la interacción con la subunidad Gα, las letras blancas resaltadas en negro corresponden a residuos de unión con forskolina, las letras blancas resaltadas en gris a residuos de unión a metales divalentes, las letras negras resaltadas en gris son residuos implicados en la unión a pirofosfato. Los recuadros muestran los aminoácidos del bolsillo hidrofóbico. Los asteriscos denotan los residuos que confieren especificidad para el ATP y los puntos negros muestran aquellos aminoácidos involucrados en la interacción con el ATP. La línea negra muestra la supuesta región de interacción con la subunidad Gβγ.

2- Organización genómica y transcripción de *TczAC* en *T. cruzi*

Las adenilil ciclasas descriptas en *T. brucei* y *L. donovani* son parte de una familia multigénica. En *T. cruzi*, *TczAC* fue la primera adenilil ciclasa reportada en el banco de secuencias GenBank. Sin embargo, al poco tiempo de ingresada al menos 7 nuevas secuencias fueron reportadas, demostrando que este parásito también posee una familia multigénica de adenilil ciclasas. Para confirmar esto se realizaron ensayos de Southern blot en los cuales ADN genómico de *T. cruzi* fue digerido con distintas enzimas de restricción e hibridado con una sonda correspondiente a la secuencia completa del gene *TczAC*. La figura 22A muestra un complejo patrón de bandas para enzimas de restricción que tienen un bajo numero de corte dentro del gen, observándose incluso más de una banda con enzimas que no cortan dentro de la secuencia de *TczAC* (Hind III y Xho I). Estos resultados confirman que *TczAC* es parte de una familia multigénica.

Para obtener más información sobre la organización genómica de *TczAC* se utilizó la técnica de electroforesis de campo pulsante en geles de agarosa (PFGE). Se separaron cromosomas enteros de *T. cruzi* y se hibridaron con la sonda correspondiente al gen *TczAC* completo. La figura 22B muestra tres bandas cromosómicas de 1,67, 1,34 y 1,22 Mbp reconocidas por esta sonda, indicando que los distintos genes que codifican para adenilil ciclasas se encuentran distribuidos en el genoma de *T. cruzi* en más de un cromosoma.

La expresión de *TczAC* en epimastigotes de *T. cruzi* fue estudiada por ensayos de Northern blot. Se determinó que al menos 3 bandas de ~ 5.8, 4.7 y 3.9 Kb eran reconocidas por la sonda correspondiente a *TczAC* (Figura 23), demostrando que más de una isoforma se expresan en este estadio del parásito.

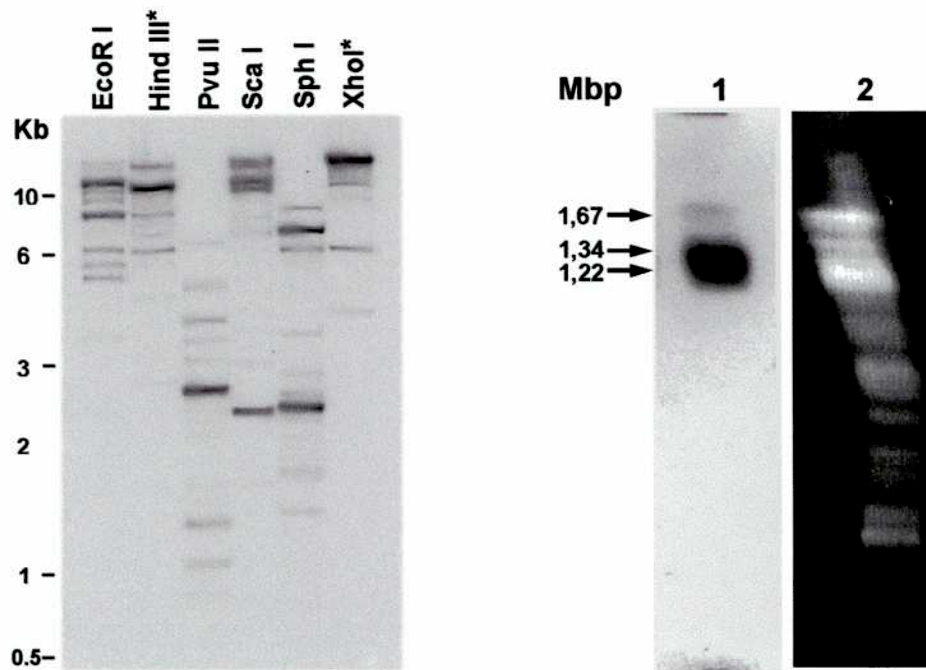


Figura 22. Southern blot y PFGE: A, ADN genómico de *T. cruzi* se digirió con las enzimas de restricción indicadas, se separó en geles de agarosa, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con una sonda correspondiente al gen *TczAC* completo. Los asteriscos muestran las enzimas de restricción que no cortan dentro de la secuencia de *TczAC*. B, Cromosomas enteros de *T. cruzi* se separaron en geles de agarosa de campo pulsante, se transfirieron e hibridaron con la misma sonda utilizada en los ensayos de Southern blot. Las flechas indican las bandas cromosómicas reconocidas por la sonda. 1, Autorradiografía de la membrana hibridada. 2, Gel teñido con bromuro de etidio.

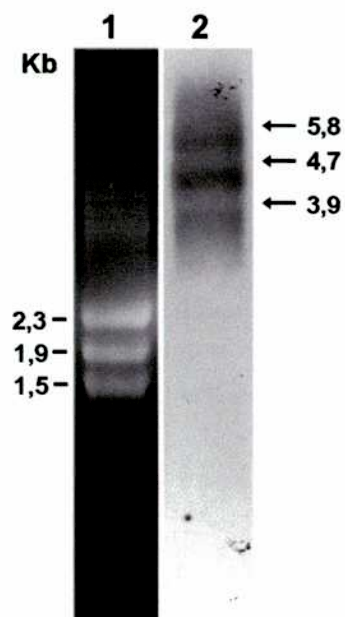


Figura 23. Northern blot: ARN total de epimastigotes se separó en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con la sonda correspondiente al gen *TczAC* completo. 1, Gel teñido con bromuro de etidio. Se indican las bandas correspondientes a los ARN ribosomales. 2, Autorradiografía del gel hibridado. Se indican las bandas reconocidas por la sonda específica.

3- Caracterización bioquímica de TczAC

3.1- Complementación y propiedades bioquímicas

La funcionalidad del gen *TczAC* se demostró por su capacidad de complementar la cepa de levaduras T503A. Esta cepa presenta una adenilil ciclasa termosensible insertada en el alelo *cyr1-2* y es incapaz de crecer a 34°C (temperatura de restricción) en ausencia de AMPc externo. Para los ensayos de complementación, el gen completo *TczAC* o el dominio catalítico del mismo se subclonaron en el vector de expresión en levaduras pYES2. Las construcciones obtenidas se utilizaron para transformar la cepa de levaduras T503A y se verificó la capacidad de las células de crecer a la temperatura restrictiva en ausencia de AMPc externo. Como control positivo se utilizó el vector pYES llevando insertado el gen endógeno de la levadura *Cyr1* y como control negativo el vector pYES vacío. Como se muestra en la figura 24 las levaduras transformadas con el gen *TczAC* completo mostraron una reversión del fenotipo similar a la observada con el gen endógeno *Cyr1*. Por otro lado, el dominio catalítico de *TczAC* solo mostró una reversión parcial del fenotipo y el vector vacío no fue capaz de crecer a la temperatura de restricción. A 30°C no se observaron diferencias de crecimiento entre las distintas levaduras (Figura 24).

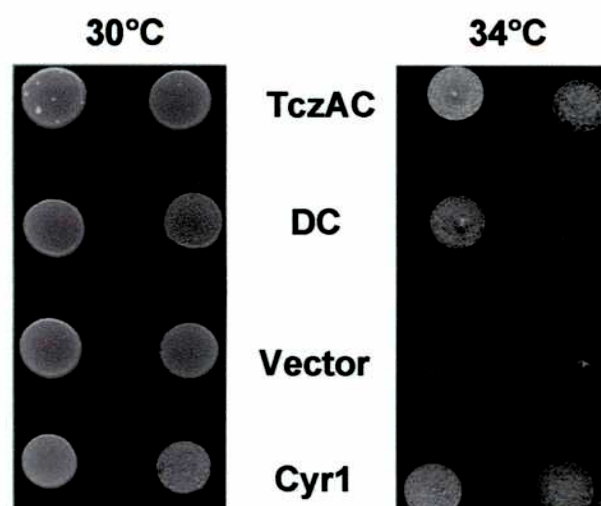


Figura 24. Ensayo de complementación en levaduras. Levaduras deficientes en actividad adenilil ciclasa, cepa T503A, fueron transformadas con el vector pYES vacío (Vector), portando el gen *TczAC* completo (TczAC), el dominio catalítico del mismo (DC) o el gen de la adenilil ciclasa de levaduras *Cyr1* (*Cyr1*). Se analizó el crecimiento de las levaduras a 30°C y 34°C, en ausencia de AMPc exógeno.

Como primera aproximación para estudiar las propiedades bioquímicas de TczAC, se prepararon extractos solubles y de membrana de la cepa control y de las distintas levaduras transformadas, y se midió la actividad adenilil ciclasa en los mismos. Como se observa en la figura 25 las levaduras sin transformar y las transformadas con el vector vacío no mostraron una actividad adenilil ciclasa significativa. Por el contrario las levaduras transformadas con el gen *TczAC* entero mostraron la mayor actividad, la cual se encontró asociada a la fracción particulada. La actividad del dominio catalítico de TczAC fue baja y estuvo presente tanto al extracto particulado como al extracto soluble (Figura 25). La baja actividad observada con este dominio explicaría la complementación parcial del fenotipo obtenida con el mismo. Por otro lado, la asociación del dominio catalítico a la membrana podría indicar el anclaje de TczAC a la membrana plasmática a través de los residuos hidrofóbicos localizados en el extremo carboxilo-terminal (Figura 20). El gen endógeno *Cyr1* mostró una muy baja actividad en los extractos, la cual no correlacionó con el crecimiento de las células observado a 34°C (Figura 24). Es posible pensar que, como esta enzima está correctamente regulada en las levaduras, una baja actividad de la misma sería suficiente para producir los niveles de AMPc necesarios para el crecimiento.

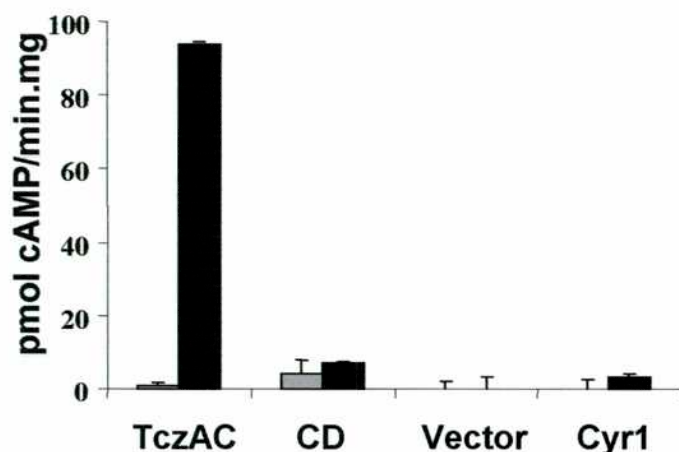


Figura 25. Ensayo de actividad adenilil ciclasa en extractos de las levaduras transformadas. La actividad adenilil ciclasa fue ensayada en extractos solubles (barras grises) y particulados (barras negras) de las levaduras T503A transformadas con el vector vacío (Vector) o portando el gen *TczAC* completo (TczAC), su dominio catalítico (DC) o el gen endógeno *Cyr1* (Cyr1).

La caracterización bioquímica de TczAC se realizó en membranas de las levaduras transformadas con el gen *TczAC* completo. En estos extractos TczAC mostró tener una actividad constitutiva entre 8 y 10 veces mayor en presencia del cofactor Mn^{+2} que de Mg^{+2} (Figura 26).

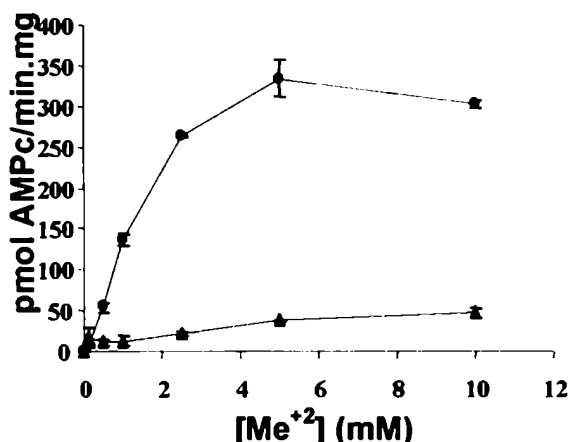


Figura 26. Dependencia de Mn^{+2} y Mg^{+2} de TczAC. Las membranas de las levaduras transformadas con el gen *TczAC* entero fueron ensayadas para actividad adenilil ciclasa en presencia de distintas concentraciones de los cationes divalentes Mg^{+2} (▲) y Mn^{+2} (●).

Además, se determinó que presenta una baja afinidad por su sustrato con una K_m para ATP de $406 \pm 55 \mu M$ (Figura 27), valor que se encuentra dentro de los reportados para adenilil ciclasas de tripanosomátidos (Naula y col., 2001). Un exceso de GTP hasta 20 veces mayor en concentración que de ATP no tuvo ningún efecto sobre la actividad adenilil ciclasa de TczAC indicando que esta es específica para ATP.

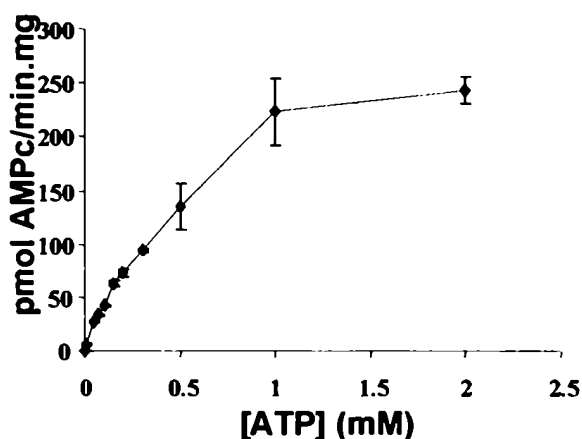


Figura 27. Dependencia de sustrato de TczAC. Las membranas de las levaduras transformadas con el gen *TczAC* entero fueron ensayadas para actividad adenilil ciclasa en presencia de distintas concentraciones de ATP.

Se sabe que el Zn^{+2} se une al sitio A de las adenilil ciclasas de mamíferos produciendo un efecto inhibitorio sobre la actividad de las mismas (Tesmer y Sprang, 1998). En TczAC los sitios de unión a metales A y B se encuentran conservados (Figura 21). Para determinar si el Zn^{+2} podía inhibir la actividad de TczAC, se realizaron ensayos de actividad adenilil ciclasa en presencia de concentraciones crecientes de este catión. A partir de estos ensayos se determinó que el Zn^{+2} actúa como un fuerte inhibidor de TczAC con una IC_{50} de $7 \pm 2 \mu M$ (Figura 28).

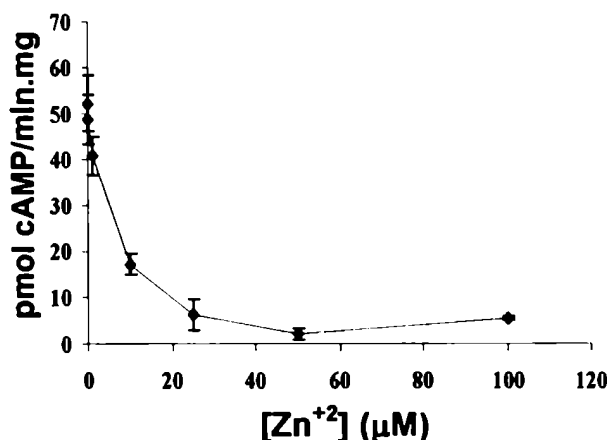


Figura 28. Inhibición de TczAC por Zn^{+2} . Las membranas de las levaduras transformadas con el gen *TczAC* entero fueron ensayadas para actividad adenilil ciclasa en presencia de distintas concentraciones de Zn^{+2} .

Para profundizar en la caracterización del mecanismo catalítico de TczAC se analizó el efecto del inhibidor del sitio P, 2'-deoxyadenosina 3'-monofosfato (deoxy-AMP), sobre su actividad. Estos inhibidores son derivados de adenosina o adenina que inhiben a las adenilil ciclasas de mamíferos al unirse al sitio de reconocimiento del anillo purina (Dessauer y Gilman, 1997; Désaubry y col., 1996; Tesmer y col. 2000)). En el caso de TczAC se observó que el deoxy-AMP inhibe su actividad con una IC_{50} aproximada de 100 μM . Este valor de inhibición se encuentra entre los valores reportados para las adenilil ciclasas de mamíferos ($<1 \mu M$; Désaubry y col., 1995) y las de bacterias ($>1 mM$; Johnson y Shoshani, 1990).

Como pudo predecirse de su secuencia proteica, ni la forskolina ni los reguladores de proteínas G, como GTP- γS , AlF_3^- , toxina de cólera y toxina pertussis, tuvieron efecto alguno sobre la actividad de TczAC (datos no presentados). Esto concuerda con lo reportado en membranas de *T. cruzi* y *T. brucei* (Torruela y col., 1986; Eisenchlos y col., 1986; Martin y col., 1978; Taylor y col., 1999).

Se investigó posteriormente el efecto del péptido GDF sobre la actividad de esta enzima. Como se describió en la introducción, este péptido es capaz de estimular la actividad adenilil ciclasa en membranas de epimastigotes de *T. cruzi* (Fraidenraich y

col., 1993). La estructura, número de genes y variabilidad de las regiones extracelulares de las adenilil ciclasas de tripanosomátidos permite pensar que estas podrían actuar directamente como receptores. Por esta razón se realizaron ensayos de actividad enzimática en presencia de distintas concentraciones del péptido. Hasta una concentración de 100 μM , el GDF no tuvo efecto sobre la actividad de TczAC indicando que no actuaría regulando la actividad de la misma. Sin embargo, estos experimentos no permiten descartar la posibilidad de que este péptido actúe en forma indirecta o a través de otra isoforma de esta familia.

3.2- Estimulación por Ca^{+2}

Durante la caracterización bioquímica de TczAC se determinó que el Ca^{+2} estimula entre 2 y 3 veces la actividad de la misma, con una $K_m = 224 \pm 26 \mu\text{M}$ (Figura 29). La respuesta al calcio fue dosis dependiente, requirió la presencia de Mg^{+2} o Mn^{+2} y presentó un comportamiento bifásico ya que concentraciones mayores a 1 mM produjeron una inhibición de la actividad enzimática.

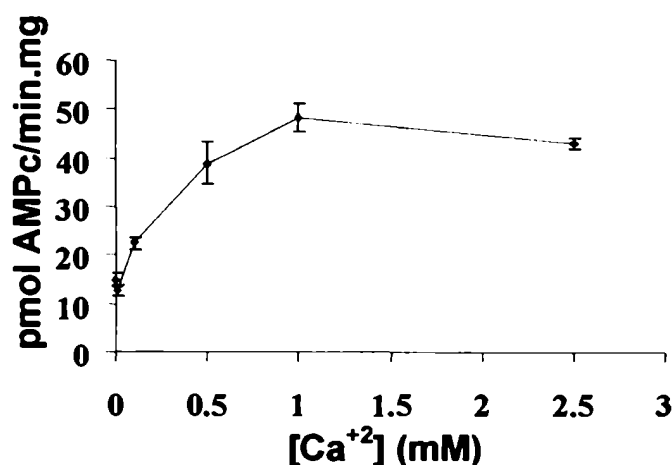


Figura 29. Estimulación de TczAC por Ca^{+2} . La actividad de TczAC fue ensayada en presencia de distintas concentraciones de Ca^{+2} en membranas de las levaduras transformadas con el gen completo.

En mamíferos, la activación por calcio de las adenilil ciclasas siempre está mediada por calmodulina. Para estudiar si este era el caso de TczAC se realizaron experimentos de actividad enzimática en presencia de los antagonistas de calmodulina trifluofenazina, fluperazina y clorpromazina. Como se observa en la figura 30 estos compuestos inhibieron la enzima solo a concentraciones mayores a 100 μM , con valores de IC_{50} de 250 ± 11 , 210 ± 4 y 286 ± 7 μM respectivamente. Las altas concentraciones de inhibidores requeridas indicarían que la inhibición de la enzima por los mismos podría ser inespecífica.

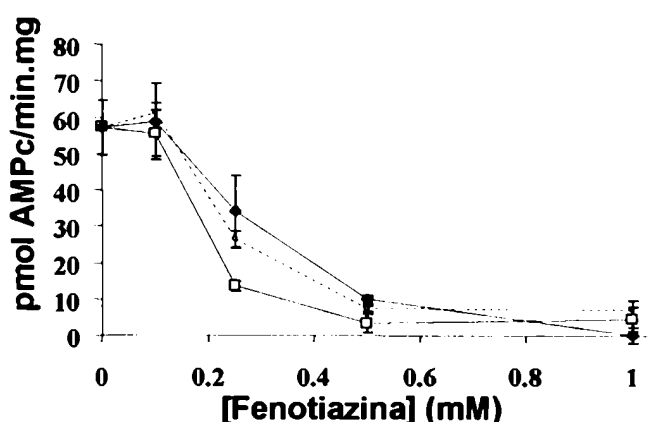


Figura 30. Inhibición de TczAC por fenotiazinas. La respuesta de TczAC a clorpromazina (---○---), flufenazina (◆) y trifluoperazina (□) fue ensayada en presencia de 1 mM Ca^{+2} en membranas de las levaduras transformadas con el gen completo.

Para estudiar más detalladamente el mecanismo de activación por Ca^{+2} se realizaron ensayos de actividad adenilil ciclasa en presencia de distintas concentraciones de calmodulina y en presencia de una concentración de calcio en el rango de la K_m . En estos ensayos no se observó una mayor estimulación de la actividad de TczAC con respecto al control en presencia de calmodulina (Figura 31). Cuando se realizaron ensayos de competencia en presencia de 500 μM de Ca^{+2} y concentraciones crecientes de un péptido correspondiente al dominio de unión de calmodulina de la CAMK II, tampoco se observó inhibición (Figura 31). Estos resultados indicaban que la estimulación de TczAC por Ca^{+2} no estaba mediada por calmodulina.

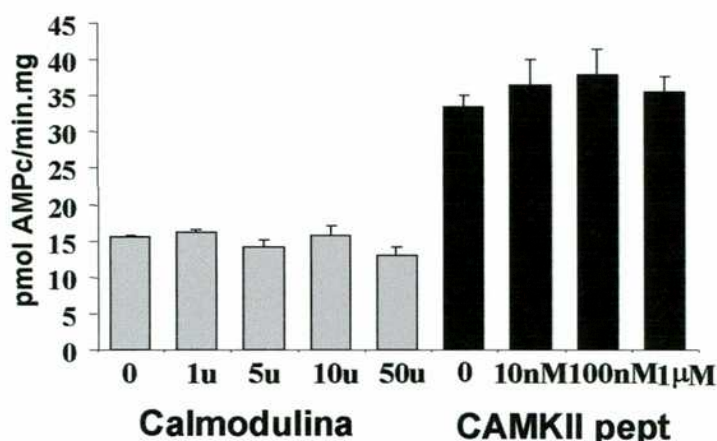


Figura 31. Efecto de calmodulina y del dominio de unión a calmodulina de la CAMKII sobre la estimulación por Ca^{+2} de TczAC. Para estudiar el efecto de la calmodulina sobre TczAC se realizaron ensayos en presencia de $250 \mu\text{M}$ Ca^{+2} y distintas concentraciones de calmodulina. Una unidad, definida por el proveedor, corresponde a 25 ng de proteína. Los ensayos de inhibición con el péptido correspondiente al dominio de unión de la calmodulina de la CAMKII se realizaron en presencia de 1 mM Ca^{+2} y distintas concentraciones del péptido.

Sin embargo, existía la posibilidad de que calmodulina endógena estuviera asociada a las membranas de las levaduras transformadas y enmascarara el efecto de la proteína exógena. Esto ha sido reportado en membranas de cerebro bovino en las cuales la actividad adenilil ciclasa no puede ser estimulada por calmodulina a menos que las mismas sean intensamente lavadas con EGTA para remover los complejos Ca^{+2} -calmodulina asociados. Para descartar esta posibilidad las membranas de las levaduras recombinantes fueron lavadas por 30 minutos con 5 mM EGTA y 1 M NaCl. En estas membranas la actividad adenilil ciclasa también fue estimulada por Ca^{+2} en forma independiente de calmodulina (figura 32A). Por el contrario, en las membranas de cerebro lavadas con EGTA la estimulación por calcio fue dependiente de calmodulina (Figura 32B). Estos resultados confirman que la estimulación de TczAC por Ca^{+2} no esta mediada por calmodulina.

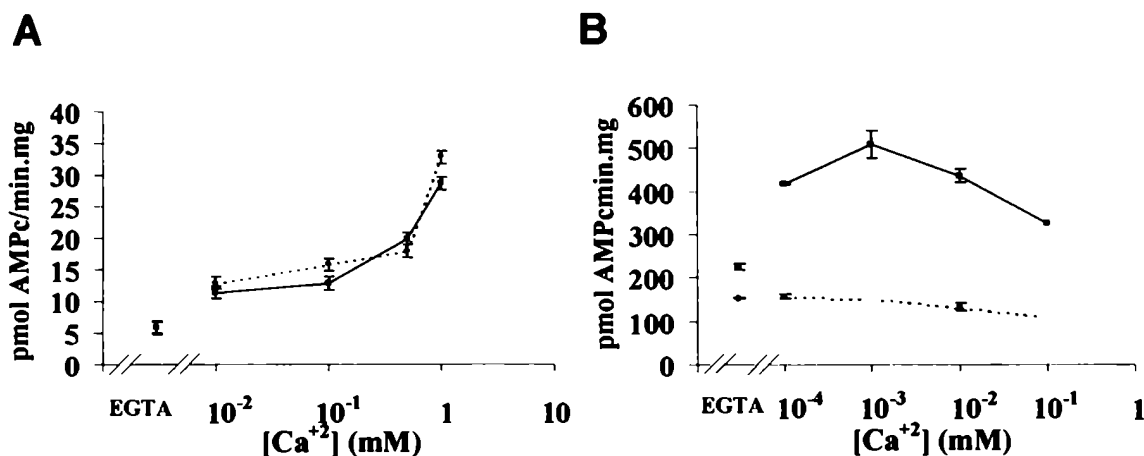


Figura 32. Efecto de Ca²⁺ y calmodulina sobre la actividad de TczAC en membranas lavadas con EGTA. Las membranas de las levaduras transformadas con el gen *TczAC* entero (A), o de cerebro bovino (B), fueron lavadas por 30 minutos con EGTA 5 mM para remover los complejos Ca²⁺-calmodulina endógenos. La actividad adenilil ciclasa se midió con distintas concentraciones de Ca²⁺ en ausencia (●) o presencia (○) de 50 unidades de calmodulina.

La caracterización bioquímica de TczAC demostró que el Zn²⁺ tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la adenilil ciclasa (Figura 28) mientras que el Ca²⁺ posee un efecto estimulador independiente de calmodulina (Figura 31 y 32). Estos resultados podían indicar que ambos iones divalentes actuaban uniéndose a un mismo sitio. Con el fin de estudiar esto, se llevaron a cabo ensayos de inhibición con Zn²⁺ en presencia de distintas concentraciones de Ca²⁺. Como muestra la figura 15, incluso en concentraciones 200 veces mayores, el Ca²⁺ no tuvo efecto sobre la inhibición producida por el Zn²⁺ (Figura 33). Estos experimentos demuestran que ambos iones no compiten por el mismo sitio de unión o que el Zn²⁺ tiene una afinidad mucho mayor por el mismo.

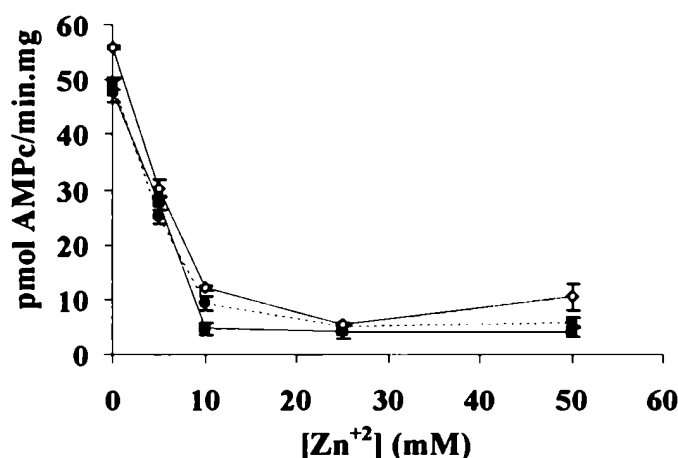


Figura 33. Efecto del Ca²⁺ sobre la inhibición por Zn²⁺ de TczAC. La actividad de TczAC se midió en presencia de distintas concentraciones de Zn²⁺ en ausencia (■) o presencia de Ca²⁺ 250 µM (○).

La concentración de calcio requerida para la estimulación de TczAC fue similar a la reportada para la adenilil ciclasa de *T. brucei* ESAG4 (Paindavoine y col., 1992), pero superior a los niveles intracelulares de Ca^{+2} reportados en *T. cruzi*. Con el fin de determinar si la regulación mediada por el catión divalente era fisiológica para este parásito, se analizó la actividad adenilil ciclasa en membranas de epimastigotes y tripomastigotes de dicho organismo. En estos ensayos se observó que el Ca^{+2} era capaz de estimular la actividad adenilil ciclasa solo en membranas de los parásitos en el estadio infectivo tripomastigotes (Figura 34). La estimulación fue dosis dependiente y con un máximo a una concentración de Ca^{+2} de 100 nM, la cual se encuentra dentro del rango fisiológico. La estimulación observada fue sólo de 45-50% sobre la actividad basal. Esta menor activación puede deberse a la presencia de varias adenilil ciclasas en las membranas de *T. cruzi*, muchas de las cuales podrían no ser activadas por este segundo mensajero.

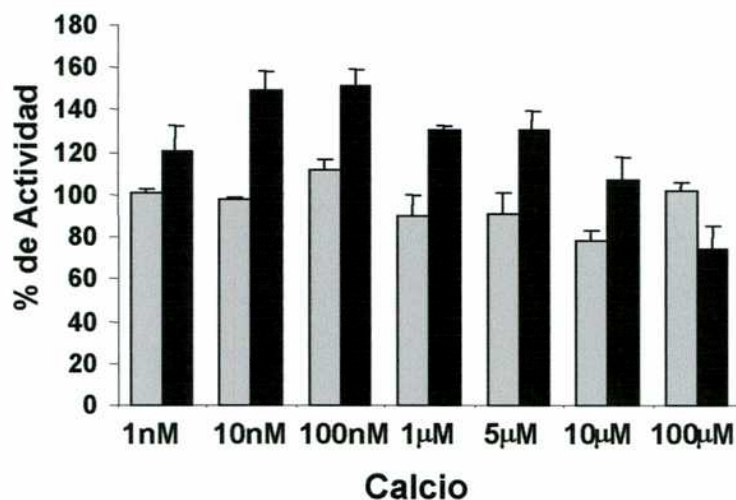


Figura 34. Efecto del Ca^{+2} sobre la actividad adenilil ciclasa de membranas de *T. cruzi*. La actividad adenilil ciclasa se ensayó en membranas del estadio epimastigote (barras grises) o tripomastigote (barras negras) de *T. cruzi* en presencia de distintas concentraciones de Ca^{+2} . La actividad esta representada como porcentaje de activación con respecto al control sin Ca^{+2} .

4- Expresión de *TczAC* en distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*

En tripanosomátidos, la expresión génica está regulada principalmente a nivel del ARN mensajero (ARNm). El procesamiento post-transcripcional y la regulación de la estabilidad de los ARNm constituyen los principales mecanismos de control. En estos organismos se han reportado un gran número de genes que presentan una expresión diferencial en los distintos estadios. Entre ellos se encuentra la adenilil ciclasa ESAG4 de *T. brucei* que también es regulada por Ca^{+2} en forma de calmodulina independiente y solo se expresa en el estadio sanguíneo de este parásito (Paidavoiné y col., 1992). Para determinar si la diferente regulación de *TczAC* observada en los distintos estadios de *T. cruzi* se debía a una expresión diferencial de la misma, se realizó una amplificación de ARNm de los distintos estadios utilizando la técnica de RT-PCR. Para obtener una señal específica para *TczAC*, se utilizó un oligonucleótido capaz de aparearse con la región 5' no codificante (ACAS-Fw) y otro capaz de aparearse con una región amino-terminal de *TczAC* (AM9-Rv). Se observó la presencia del ARN mensajero correspondiente a *TczAC* en todos los estadios del ciclo de vida del parásito (Figura 35). Siendo la estabilidad del mensajero el principal mecanismo de control de la expresión génica es posible sugerir que la activación diferencial de *TczAC* en las distintas formas de *T. cruzi* se debe a una diferente regulación de la misma y no a cambios en sus niveles de expresión. Sin embargo, no es posible descartar con estos experimentos la existencia de un mecanismo de regulación de los niveles de esta proteína.

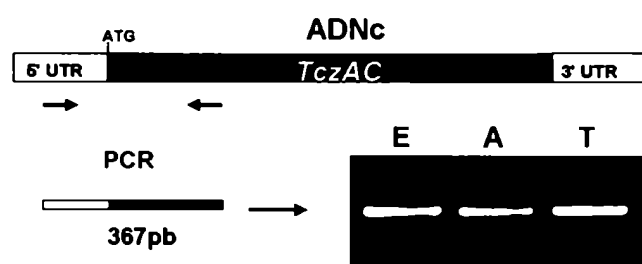


Figura 35. Expresión de *TczAC* en los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. Se obtuvo ADNc utilizando ARN total de los distintos estadios de *T. cruzi* y la enzima transcriptasa reversa. Se analizó la presencia de transcritos de *TczAC* amplificando el ADNc con un oligonucleótido correspondiente a la región 5' no codificante (5'UTR) del gen y otro correspondiente a la región amino-terminal del mismo.

5- Dimerización del dominio catalítico de TczAC

El mecanismo catalítico de las adenilil ciclasas de mamíferos involucra la interacción de los dominios CI y CII. Esta interacción permite la formación de un bolsillo hidrofóbico necesario y suficiente para la actividad de estas enzimas. En el caso de los tripanosomátidos la estructura de las adenilil ciclasas no permite la formación de este bolsillo a menos que exista una interacción entre dos dominios catalíticos correspondientes a enzimas diferentes. Durante los últimos años se ha sugerido que la dimerización podría ser un mecanismo regulatorio de las adenilil ciclasas en estos organismos. Este mecanismo se ha propuesto a partir de datos obtenidos por ensayos de coexpresión en ovocitos de distintas isoformas de adenilil ciclasas de *L. donovani* (Sanchez y col., 1995), por patrones de columnas de exclusión molecular de adenilil ciclasas *T. brucei* y también por el hecho que forzando la dimerización a través de cierres de leucina de una adenilil ciclasa de *T. brucei* se produce un incremento de la actividad catalítica (Naula y col., 2001). A partir de estos datos se decidió utilizar la técnica de doble híbrido en levaduras para determinar si TczAC era capaz de formar dímeros.

La técnica de doble híbrido, desarrollada por Stanley Fields y colaboradores (Fields y Song, 1989), permite detectar *in vivo* interacciones entre proteínas. Esta técnica se basa en la existencia de factores de transcripción formados por dos dominios, uno de interacción con el ADN y otro de activación de la transcripción. Se determinó que al separar los dominios estos pueden reasociarse recobrando su función. Teniendo en cuenta este hecho, se crearon sistemas en los cuales se clonaron los dos dominios del factor de transcripción en vectores de expresión diferentes. A estos dos vectores se les puede subclonar genes de interés en fusión con los respectivos dominios para determinar si interaccionan. La interacción entre las proteínas codificadas se traduce en la reasociación de los dominios del factor de transcripción y la recuperación de su función (Figura 36). Esto se visualiza a partir de genes reporteros cuya expresión es fácilmente detectable, como por ejemplo genes que permiten revertir la auxotrofia a un determinado aminoácido o el gen *LacZ* que permite detectar actividad β -galactosidasa.

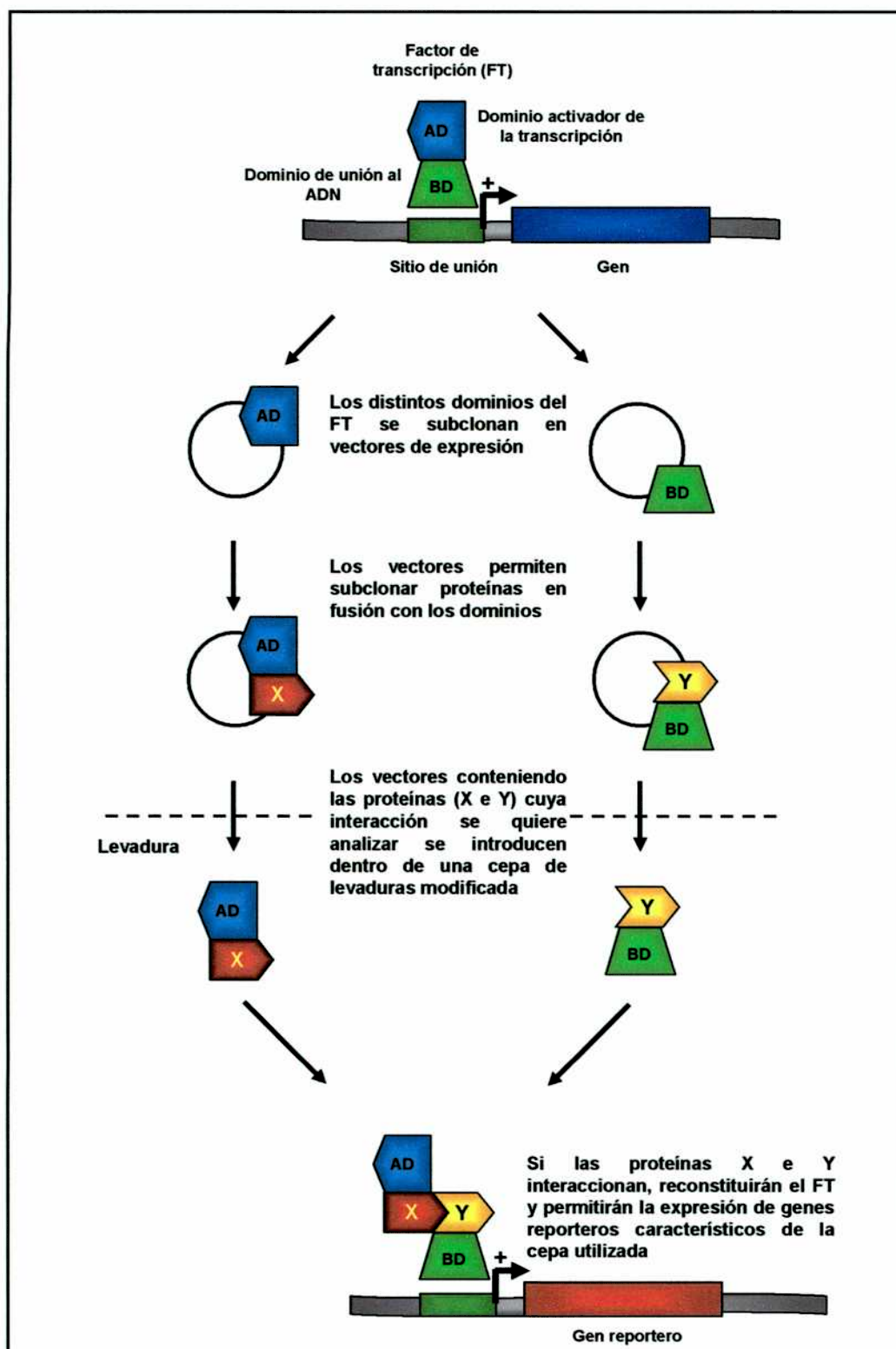


Figura 36. Esquema del sistema de doble híbrido en levaduras. Las proteínas X e Y son las incógnitas cuya interacción se quiere determinar.

Para este experimento la región correspondiente al dominio catalítico (DC) de TczAC se amplificó por PCR y se subclonó en dos vectores de expresión en levaduras, el pBTM116 (trp^+) y el pGAD (leu^+ ; Figura 37). El pBTM116 permite la expresión de la proteína en fusión con el dominio LexA de unión al ADN (Figura 38). En este caso la proteína de fusión no presenta señal de localización nuclear (NLS) y se localiza predominantemente en el citoplasma lo cual reduce el ruido de fondo. Por otro lado, el vector pGAD permite la fusión de la proteína con el dominio de activación de la transcripción GAL4 (Figura 38). Además de esto posee una señal de localización nuclear del virus SV40. Ambas construcciones se utilizaron para transformar levaduras de la cepa de L40 la cual presenta como genes reporteros el *HIS3* y el *LacZ* bajo un promotor GAL1 fusionado a varios dominios de unión a LexA. De esta manera si ambas proteínas de fusión interactúan, el híbrido formado se localiza en el núcleo en donde induce la expresión de ambos genes reporteros rescatando la auxotrofia a histidina de la cepa y produciendo la expresión de la enzima β -galactosidasa.

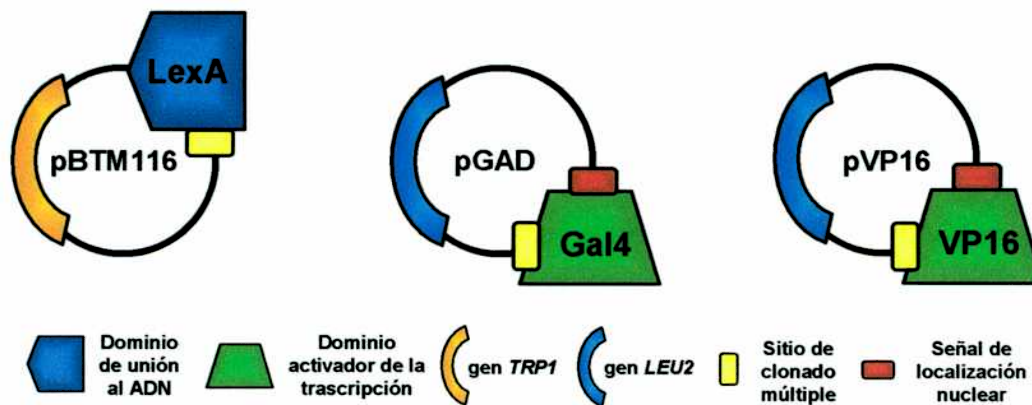


Figura 37. Vectores utilizados en los ensayos de doble híbrido en levaduras. pBTM116 permite la fusión con el dominio de unión al ADN LexA, presenta el gen *TRP1* que permite revertir la auxotrofia de la cepa para triptofano y no presenta señal de localización nuclear. pGAD y pVP16 permiten la fusión con el dominio activador de la transcripción Gal4 o VP16 respectivamente, presentan el gen *LEU2* que permite revertir la auxotrofia al aminoácido leucina, y presentan señal de localización nuclear. El dominio activador de la transcripción VP16 posee una mayor fuerza activadora de la transcripción que el dominio Gal4.

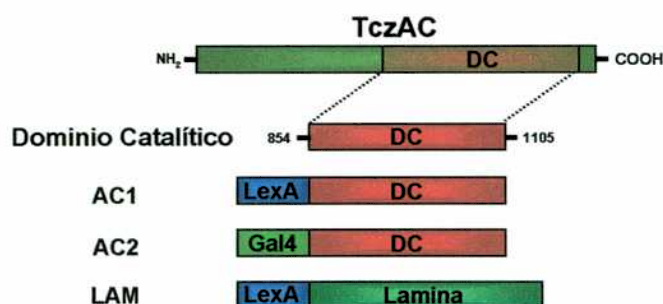


Figura 38. Esquema de las construcciones utilizadas en los ensayos de dimerización.

A modo de control, se determinó la expresión de la proteína de fusión TczAC-LexA utilizando anticuerpos específicos contra el dominio LexA (Figura 39A). Se realizaron ensayos de Western blot sobre tres clones transformados con la fusión DC-LexA (AC1) observándose que todos ellos expresaban una proteína del tamaño esperado (74kDa). Se analizó luego si el dominio catalítico expresado presentaba la conformación correcta, necesaria para la actividad catalítica, realizándose ensayos de actividad adenilil ciclasa en extractos solubles de las levaduras transformadas. Como se puede observar en la figura 39B, dos clones mostraron un aumento de actividad ciclasa con respecto al control sin transformar, mientras que uno no mostró actividad enzimática. En concordancia con las propiedades bioquímicas de la adenilil ciclasa de *T. cruzi*, la actividad ensayada fue dependiente de Mn^{+2} . Para los experimentos de doble híbrido se decidió utilizar el clon que presentó mayor actividad catalítica. Como un control adicional, se determinó que las fusiones aisladas AC1 y DC-Gal4 (AC2) no fueran capaces de activar *per se* la expresión de los genes reporteros.

Las levaduras transformadas con las distintas construcciones y los correspondientes controles fueron seleccionadas en medios sin histidina. En este medio solo pueden crecer aquellas levaduras que muestran una reasociación entre los dominios del factor de transcripción dada por la interacción entre las proteínas de fusión. Se observó que las levaduras que expresaban ambas fusiones con el dominio catalítico, AC1 y AC2, eran capaces de crecer en ausencia de este aminoácido indicando una interacción entre ambas proteínas (Figura 40A). De forma contraria, las levaduras que

sólo expresaban una fusión o aquellas transformadas con los plásmidos vacíos no fueron capaces de revertir el fenotipo his^- de la cepa original (Figura 40A).

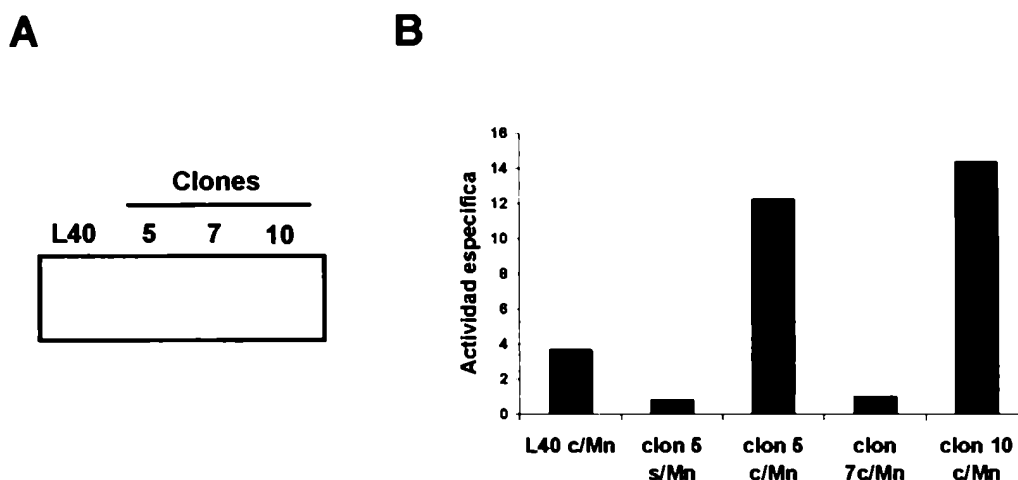


Figura 39. Control de expresión y actividad de la fusión LexA-DC. A, La expresión de la fusión entre el dominio catalítico de TczAC y el dominio LexA se estudió por Western blots utilizando un anticuerpo comercial anti-LexA en extractos solubles de 3 clones de levaduras L40 transformadas. B, La conformación del dominio catalítico se verificó determinando la actividad adenilil ciclasa en los mismos extractos.

Para verificar si la interacción entre los dominios catalíticos era específica fue necesario ensayar si la fusión AC2 era capaz o no de interaccionar con una proteína no relacionada. Para esto, las levaduras que expresaban dicha fusión fueron cotransformadas con el vector pBTM116 llevando la proteína no relacionada lamina en fusión con el dominio LexA (figura 38). Las levaduras que expresaban las fusiones AC2 y lamina-LexA (LAM) no fueron capaces de revertir el fenotipo his^- de la cepa original confirmando que la interacción entre los dominios catalíticos de TczAC era específica.

La interacción se confirmó mediante ensayos de actividad β -galactosidasa en cultivos líquidos de las levaduras no transformadas y transformadas con las distintas construcciones. Como muestra la figura 40B la mayor actividad enzimática se observó en las levaduras que expresaban ambas fusiones, AC1 y AC2. No se observaron diferencias significativas entre las levaduras sin transformar, las levaduras transformadas con uno solo de los vectores y el control de especificidad.

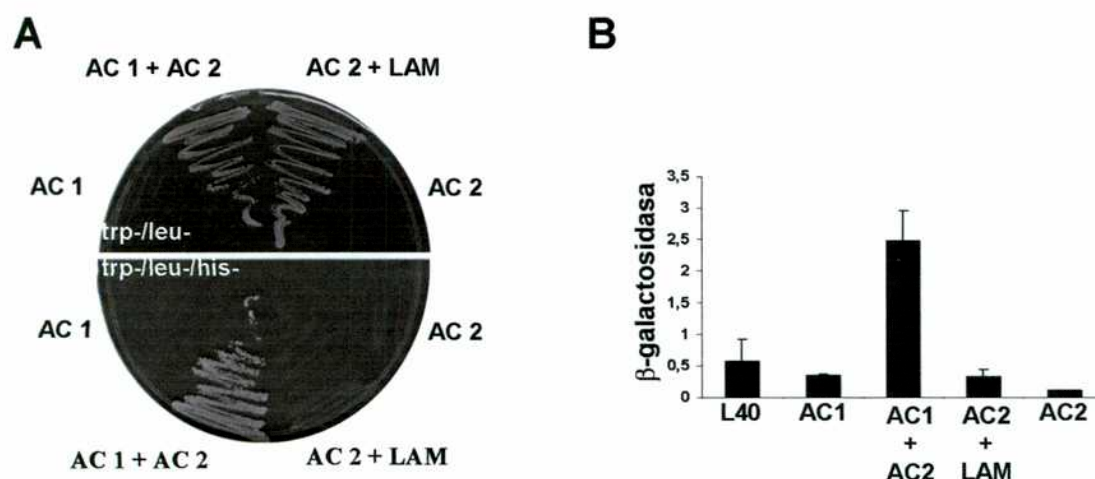


Figura 40. Dimerización de los dominios catalíticos de TczAC. Levaduras de la cepa L40 fueron transformadas con las construcciones AC1 o AC2 o con ambas construcciones AC1 + AC2. Como control de interacción específica se contranformó las levaduras que expresaban AC2 con la construcción Lamina-LexA, AC2 + LAM. **A**, Reversión de la auxotrofia a histidina de la cepa L40 por la interacción AC1-AC2. **B**, Actividad β -galactosidasa en cultivos de las levaduras transformadas.

Es importante señalar que si las dos fusiones presentan el mismo dominio catalítico, y estos interaccionan entre sí, existen tres híbridos posibles, AC1-AC1, AC1-AC2 y AC2-AC2. Por esta razón, es válido esperar que la actividad β -galactosidasa para el dímero AC1-AC2 sea mayor a la observada.

6- Identificación de proteínas que interactúan con el dominio catalítico de TczAC

Como fue presentado en la sección 1 de resultados, TczAC carece de los elementos involucrados en la regulación por proteínas reguladoras típicas de estas enzimas, como proteínas G y CAP. Esto, y la ausencia de secuencias homólogas a dichas proteínas en los bancos de datos de tripanosomátidos, permite sugerir que la regulación de las adenilil ciclasas en estos organismos es diferente a la regulación descrita para las enzimas de eucariotas superiores. A fin de identificar posibles reguladores intracelulares de la enzima TczAC de *T. cruzi*, se utilizó la técnica de rastreo por doble híbrido en levaduras.

En este experimento, levaduras que expresaban la fusión AC1, utilizada en los ensayos de dimerización, se cotransformaron con una biblioteca de expresión de epimastigotes de *T. cruzi* construida en el vector pVP16 (leu⁺) (Figura 37). Este vector permite la expresión en fusión con el dominio de activación de la transcripción, el VP16. Las levaduras cotransformadas fueron seleccionadas como fue descrito en los ensayos de dimerización (Resultados sección 5), obteniéndose 133 clones capaces de crecer en ausencia de histidina. Para descartar falsos positivos producidos por reversiones en la auxotrofia a histidina, estos clones fueron ensayados para el segundo marcador de interacción, la expresión de β -galactosidasa. Luego de someter los clones de levaduras a ensayos de actividad β -galactosidasa en placa se encontraron sólo 33 clones positivos.

Para identificar cuales de estos clones presentaban una interacción específica se realizó el control de interacción con la proteína lamina. En este caso fue necesario inducir la pérdida del vector pBTM116-DC (trp⁺) en las levaduras cotransformadas. Se realizaron ciclos de crecimiento en medios con triptofano y la pérdida del plásmido en las colonias se verificó determinando su incapacidad de crecer en ausencia de este aminoácido. Una vez eliminado el vector pBTM116-DC las levaduras se retransformaron con el vector pBTM116-LAM y se analizó la interacción con la proteína no relacionada. Sólo 13 clones mostraron una interacción específica con el sitio catalítico de la TczAC.

Las secuencias de los clones específicos se amplificaron por PCR utilizando dos oligonucleótidos pertenecientes al vector pVP16 que flaqueaban dicho inserto. Los fragmentos de PCR fueron purificados, subclonados en el vector pGEM-Teasy y secuenciados.

Inicialmente, sólo dos de las secuencias obtenidas mostraron homología con proteínas de función conocida, ellas correspondían al clon 40 y 117 (entre ellos, el 40 era particularmente interesante por razones que se detallarán en la siguiente sección). Recientemente el laboratorio ha tenido acceso al genoma de *T. cruzi* con una representatividad 3x (TIGR, <http://www.tigr.org/tdb/mdb/tcdb/>), lo que ha permitido volver a analizar los clones aislados. El análisis de estas secuencias ha permitido identificar nuevas proteínas que podrían tener un papel importante en la regulación de la actividad de TczAC.

En la siguiente Tabla se resume el análisis de las secuencias obtenidas.

Clon #	Longitud del inserto (pb)	Proteína del genoma (aa)	Dominios funcionales (#)	Homología (# en el GenBank)
2	819	273	NI	NS
8	555	224	NI	NS
12	369	164	NI	NS
20	453	457	WD (4), Snc (1) y Coiled coil (1)	TipD (3122952) y Appl α , β y γ (BAC55090, NP_0841222 y BAC55091)
22	118	261	pGAM (1) y SixA (1)	Fosfoglicerato mutasa (Q8L1Z79)
23	609	777	WD (6) y Coiled coil (1)	Proteína asociada a microtúbulos (XP_223715) y proteínas similares a la β -transducina (AAL37299)
29	639	353	TM (1)	GlcNa-transferasa (AAM34294)
33	486	559	Coiled coil (1)	NS
35	504	415	Snc (1) y Coiled coil (3)	NS

Continúa en la próxima hoja.

Clon #	Longitud del inserto (pb)	Proteína del genoma (aa)	Dominios funcionales (#)	Homología (# en el GenBank)
40	450	580	NI	Paraflagellar rod
41	540	224	NI	NS
54	444	297	AAA	Quinasa asociada a Rho (NP_776877) y proteína asociada al receptor de benzodiazepina (NP_004749)
117	717	344	Coiled coil (1) y M6PRD (1)	Sustrato de PKC(AAH43600), Proteína de unión a Ca^{+2} con dominios EF-Hand (NP_496073) y Proteína de unión a calmodulina (NP_680444)

Tabla V. Análisis de las secuencias identificadas por rastreo de doble híbrido en levaduras. pb, pares de bases, aa, aminoácidos, NI, no identificados, NS, no significativo. WD, dominio de repeticiones de los aminoácidos tripropano-aspartico, coiled coil, dominio de interacción entre proteínas, pGAM, dominio presente en las familias de fosfoglicerato mutasa, SixA, dominio presente en fosfatasa de histidina, TM, dominio transmembrana, Snc, dominio presente en ATPasas involucradas en la segregación cromosomal, AAA, dominio ATPasa M6PRD, dominio presentes en receptores de manosa-6-fosfato.

6.1- Análisis de la interacción entre TczAC y la proteína paraflagellar rod

El clon 40 mostró homología con una proteína de función conocida, la paraflagellar rod (PAR) (Maga y Lebowitz, 1999; Bastin y col., 1999). Esto fue particularmente interesante ya que la PAR es una proteína estructural del flagelo de *T. cruzi*.

Inicialmente el movimiento fue la función atribuida a esta organela, sin embargo, en los últimos años se ha determinado que un gran número de proteínas de distintas vías señalización se encuentran específicamente localizadas en la misma, razón por la cual se ha propuesto que el flagelo estaría involucrado en sensor el ambiente extracelular. En *T. brucei* se ha reportado la localización específica de ciertas adenilil ciclasas en el flagelo, sugiriendo que esta organela sería importante para la señalización mediada por AMPc. Por otro lado, se ha demostrado que la proteína paraflagellar rod es capaz de unir calmodulina en forma dependiente de Ca^{+2} , sugiriendo su participación en

la vía de señalización mediada por este catión. La interacción entre PAR y TczAC podría ser así un nexo importante entre las vías de señalización por AMPc y Ca^{+2} .

Para confirmar si la proteína PAR completa era capaz de interaccionar con TczAC, se diseñaron dos oligonucleótidos a partir de la secuencia nucleotídica de la PAR A reportada en el GenBank. La secuencia completa del gen se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *T. cruzi*. y se subclonó en el vector pVP16 para ser expresada como fusión con el dominio LexA (PAR, Fig. 41). Con esta construcción se transformaron las levaduras que expresaban la fusión AC1 (Fig. 41) utilizada en los ensayos de dimerización y doble híbrido, y se analizó la capacidad de crecer en ausencia de histidina. Nuevamente como control de interacción específica se analizó la interacción de ambos genes con la proteína no relacionada lamina (Figura 41). Como se observa en la figura 42A TczAC interaccionó con la proteína paraflagellar rod de manera específica.

La interacción se verificó por medio de ensayos de β -galactosidasa en placa y en medio líquido (Fig. 42 A y B), obteniéndose los mismos resultados.



Figura 41. Esquema de las construcciones utilizadas en los ensayos de interacción de TczAC con paraflagellar rod.

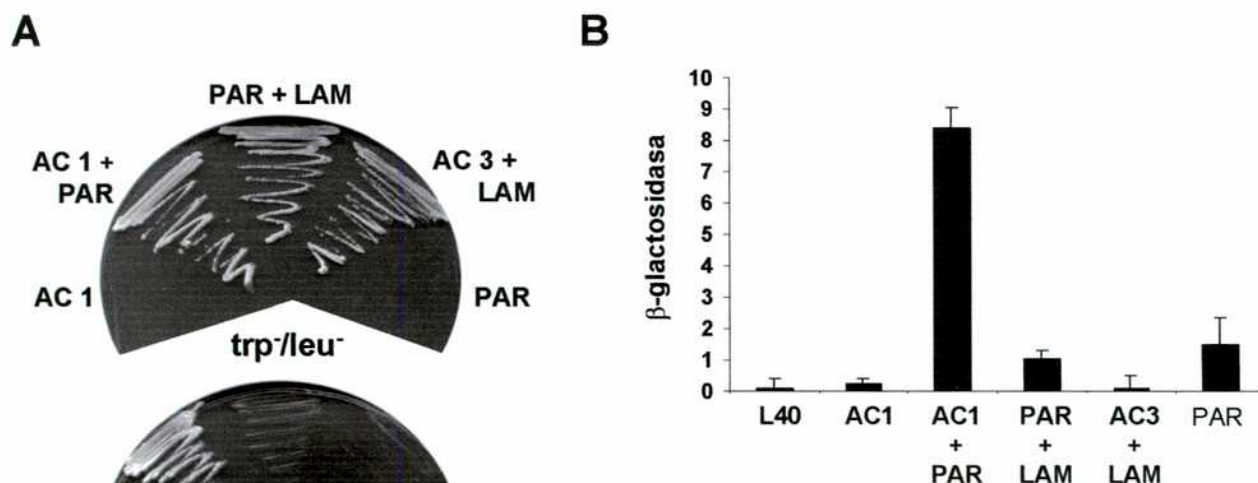


Figura 42. Interacción de TczAC con paraflagellar rod. Las levaduras de la cepa L40 fueron transformadas con las construcciones AC1, PAR o con ambas construcciones AC1 + PAR. Como controles de interacción específica se contrastransformaron las levaduras que expresaban AC3 y las que expresaban PAR con la construcción Lamina-LexA (AC3 + LAM y PAR + LAM respectivamente). **A**, Reversión de la auxotrofia a histidina de la cepa L40 por la interacción AC1-AC2 y ensayo de actividad β -galactosidasa en las placa de las levaduras crecidas en presencia de histidina (*trp⁻/leu⁻*). **B**, Actividad β -galactosidasa en cultivos de las levaduras transformadas.

6.2- Expresión de paraflagellar rod en *E. coli*

Para determinar si la proteína PAR era capaz de regular la actividad de TczAC *in vitro* se intentó obtener la proteína recombinante utilizando un sistema de expresión en bacterias *E. coli*. Se amplificó por PCR el gen PAR y se lo subclonó en el vector de expresión en bacterias pMAL. Este vector permite la expresión como proteína de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP) regulada por un promotor de polimerasa del fago T7. La construcción fue utilizada para transformar la cepa de bacterias BL21.

Las bacterias transformadas con la construcción se crecieron en medio líquido y se indujo la expresión de la proteína recombinante con isopropil- β -D-thiogalactopiranosido (IPTG). La presencia de la proteína de fusión se analizó por SDS-

PAGE, determinándose que se encontraba asociada a la fracción particulada formando cuerpos de inclusión (Fig. 43A). Estos cuerpos de inclusión fueron purificados por tratamientos con detergentes y lisozima para ser finalmente solubilizados en urea 8M.

La purificación de proteínas de fusión con la MBP se realiza a través de resinas de amilosa. Para ello es necesario que la MBP presente la conformación correcta. Por esta razón, la PAR-MBP obtenida de los cuerpos de inclusión fue renaturalizada por diálisis gradual hasta la eliminación total de la urea. La proteína recombinante renaturalizada fue purificada en las resinas de amilosa (Fig. 43B) y se utilizó posteriormente en ensayos de actividad adenilil ciclasa en membranas de las levaduras transformadas con el gen *TczAC*. En dichos experimentos no se observó regulación de la actividad de TczAC por la PAR-MBP lo cual podría indicar un mecanismo indirecto de regulación, una función no regulatoria de la misma o una conformación incorrecta de la proteína de fusión (datos no presentados).

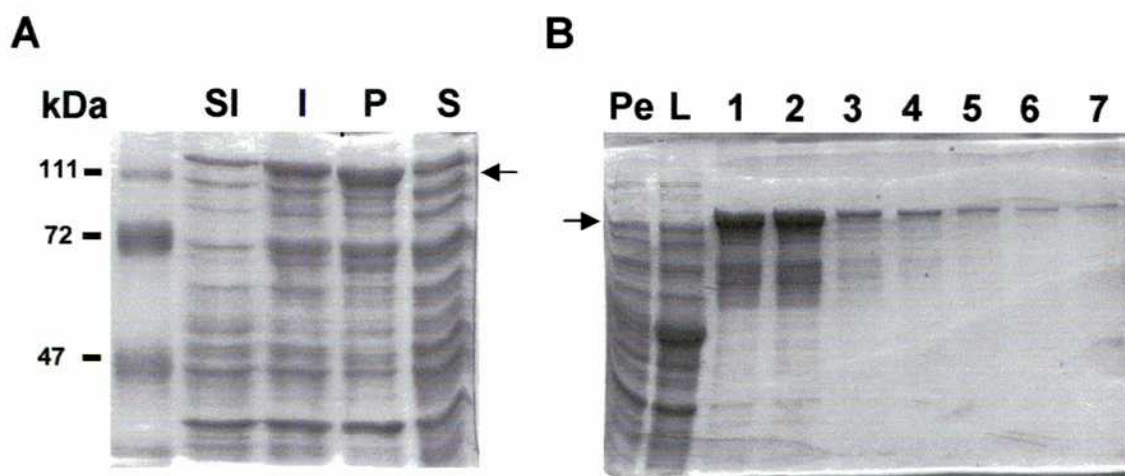


Figura 43. Expresión de paraflagellar rod en *E. coli*. El gen entero de la paraflagellar rod se subclonó en el vector pMAL para ser expresado como proteína de fusión a la MBP. El vector se utilizó para transformar la cepa de bacterias BL21. **A**, Extracto total de bacterias sin inducir (SI) o inducidas (I) con IPTG o pellet (P) y sobrenadante (S) obtenido por sonicación y centrifugación de bacterias inducidas se corrieron en geles de acrilamida los cuales fueron teñidos con coomassie. **B**, Los cuerpos de inclusión fueron purificados de los pellets de bacterias inducidas, la proteína fue renaturalizada y purificada en columnas de amilosa. Pe, percolado de la columna, L, lavado, 1-7 fracciones eluidas de la columna de afinidad. Las flechas indican la proteína de fusión MBP-PAR.

7- Obtención de un sistema para la búsqueda de inhibidores específicos de TczAC en *Sacchamomyces pombe*

Debido a la importancia del AMPc para el crecimiento y la diferenciación en *T. cruzi* y a las características particulares de las adenilil ciclasas de este organismo, dichas enzimas podrían ser explotadas como un blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

La presencia de múltiples isoformas de adenilil ciclasas expresadas en *T. cruzi* dificultaba la búsqueda de inhibidores específicos de una isoforma particular en este organismo y el análisis de la inhibición por pérdida de reversión en el fenotipo termosensible de las levaduras T503A no era suficientemente claro. Por esto, se decidió desarrollar un nuevo sistema para la búsqueda y caracterización de compuestos capaces de inhibir específicamente a TczAC.

En este nuevo proyecto se decidió utilizar levaduras *S. pombe*. En estas células la adenilil ciclasa forma parte de una vía de señalización en respuesta a glucosa. La activación de un receptor de glucosa (*git3*) produce a su vez la activación de la adenilil ciclasa (*git2*) a través de una subunidad $G\alpha$ (*gpa2*; Landry y Hoffman, 2000; Welton y Hoffman, 2000; Isshiki y col., 1992). El aumento en los niveles de AMPc induce la activación de la PKA (*git6*) la cual, entre otras funciones, produce la represión del gen que codifica para la enzima de gluconeogénica fructosa-1,6-bifosfatasa, *fbp1* (Figura 44; Maeda y col., 1994; Hoffman y Winston, 1991). La elección de este sistema se realizó debido a la existencia de una cepa de *S. pombe* (CHP495) que presenta una delección en el gen de la adenilil ciclasa (Welton y Hoffman, 2000). Además de ello, la cepa posee el gen *fbp1* reemplazado por el gen URA4 y una construcción del gen LacZ bajo el promotor *fbp1* insertada en su genoma (Figura 44). Con estas características, dicha cepa permite la complementación de una adenilil ciclasa externa, cuya actividad se puede medir *in vivo* de dos maneras muy simples: por su capacidad de crecer en el ácido 5'-fluoro-orótico (5'-FOA) y por ausencia de actividad β -galactosidasa. El producto del gen URA4 convierte el ácido 5'-FOA en dos metabolitos que son tóxicos para la célula. De esta manera, el 5'-FOA produce la muerte de células que expresan dicho gen. En la cepa CHP495 un aumento en los niveles de AMPc produce una represión del gen URA4

debido a que este se encuentra bajo la regulación del promotor *fbp1*. Así, la presencia de una adenilil ciclasa funcional que aumenta los niveles de AMPc permite el crecimiento de las células en presencia de este compuesto. Por otro lado, el gen *LacZ* se encuentra bajo la regulación del mismo promotor y un aumento en los niveles de AMPc genera una disminución de su expresión observándose así una menor actividad enzimática. Es importante mencionar que, además de los fenotipos asociados a la cepa mutante, las levaduras *S. pombe* presentan otra respuesta a cambios en los niveles de AMPc. Se ha demostrado que este segundo mensajero actúa como un inhibidor de la mitosis, de manera tal que bajos niveles del mismo llevan a una división celular temprana y a una disminución en la longitud de la célula. De manera contraria, altos niveles de AMPc producen un retardo en la mitosis dando lugar a células alargadas (Kishimoto y Yamashita, 2000).

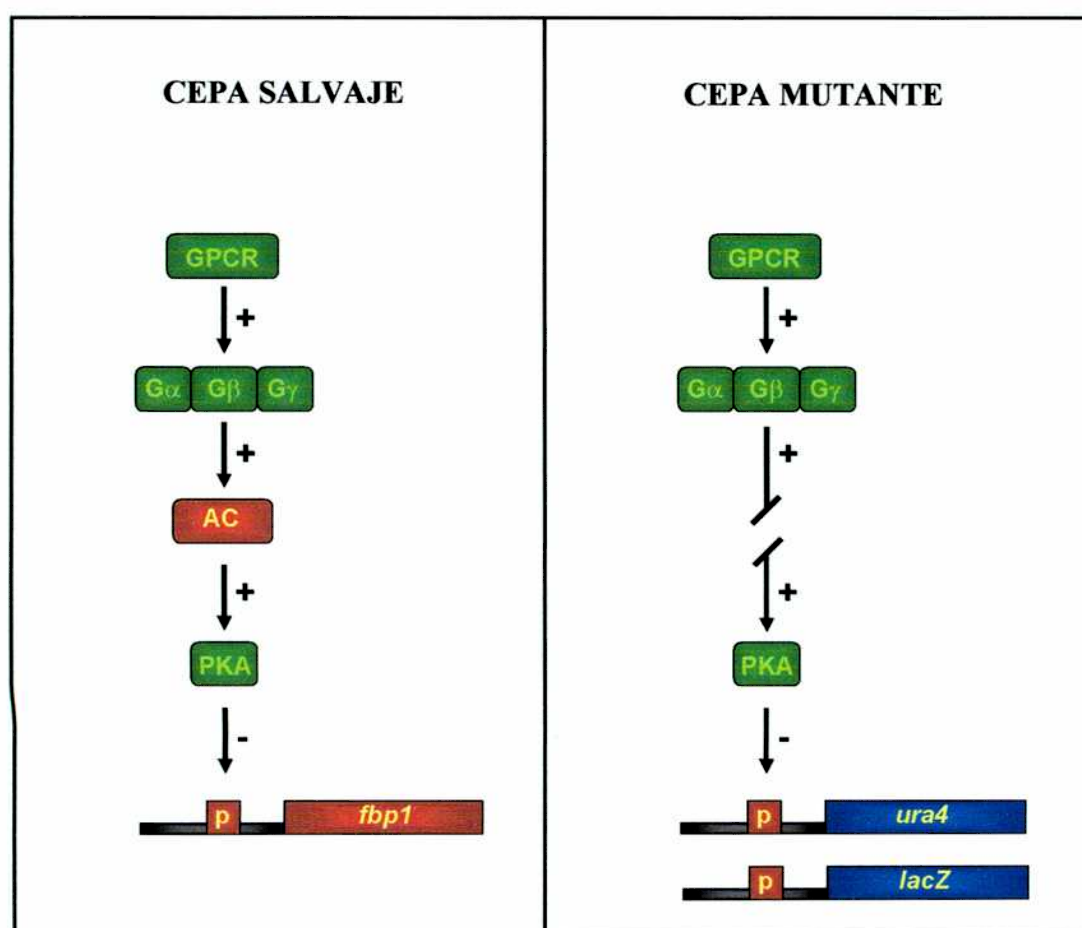


Figura 44. Esquema de la vía de transducción de señales mediada por AMPc en *S. pombe* salvaje y en la cepa mutante CHP495. GPCR, receptor acoplado a proteína G; p, promotor de *fbp1*.

Las características de la cepa CHP495 la hacían sumamente útil para la búsqueda de inhibidores de adenilil ciclasa. Así, si TczAC era capaz de complementar dicha cepa, variaciones en los niveles de su actividad podían ser fácilmente medidos por cambios en la longitud celular, crecimiento en 5'-FOA y variaciones en los niveles de actividad β -galactosidasa, sin obviamente descartar la posibilidad de medir directamente los niveles de actividad enzimática.

Para realizar este proyecto el gen correspondiente a *TczAC* se amplificó por PCR y se subclonó en el vector de expresión en levaduras pTOPO_{NMT1} bajo el promotor fuerte de expresión constitutiva NMT1. La construcción se utilizó para transformar la cepa CHP495. La capacidad de crecer en medios conteniendo 5'-FOA, la actividad enzimática y la longitud fue analizada en 3 clones positivos. Todos ellos fueron insensibles al 5'-FOA, presentaron actividad adenilil ciclasa y una mayor longitud que las células control, indicando la capacidad de la enzima TczAC de complementar la mutación. La figura 45 muestra los resultados obtenidos para el clon con mayor actividad adenilil ciclasa.

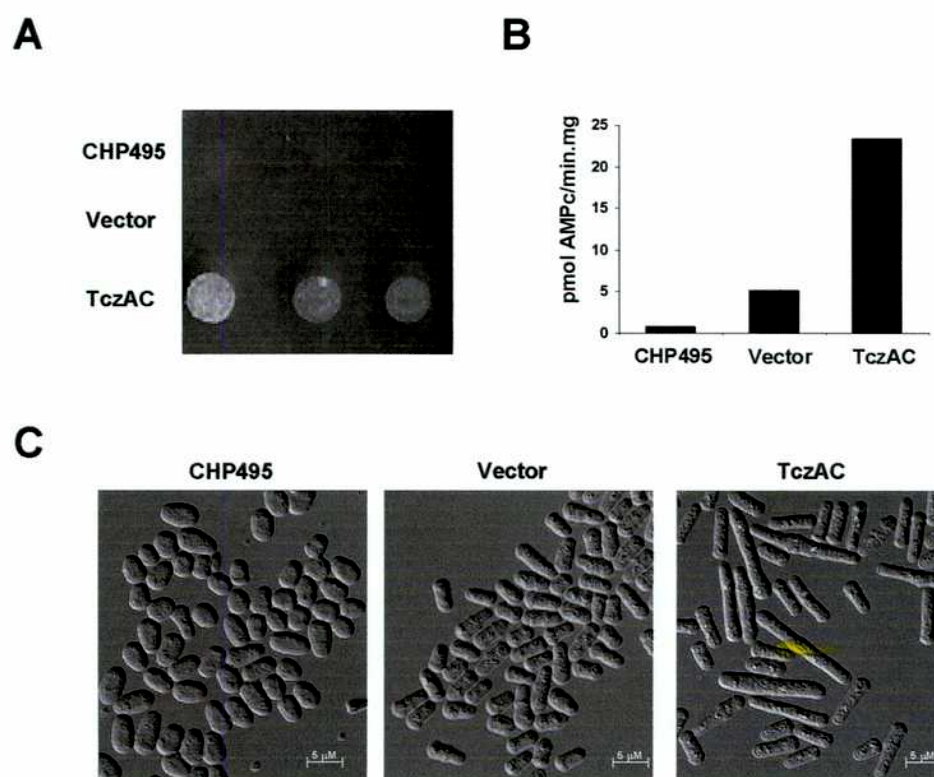


Figura 45. Respuesta de la cepa CHP495 a la expresión de TczAC. Las levaduras CHP495 deficientes en actividad adenilil ciclasa fueron transformadas con el vector TOPO_{NMT1} vacío o portando el gen *TczAC* entero. **A**, Crecimiento en 5'-FOA. **B**, Actividad adenilil ciclasa. **C**, Longitud celular.

La gran longitud de las células transformadas con el plásmido pTOPO_{NMT1}-*TczAC* indicaba una fuerte actividad adenilil ciclasa en estas células. Niveles tan elevados de AMPc podrían llegar a enmascarar ciertos tipos de inhibición. Por esta razón se decidió obtener nuevas construcciones utilizando vectores pTOPO con promotores más débiles que el NMT1. Dos nuevos vectores, pTOPO_{NMT41} y pTOPO_{NMT81}, fueron utilizados. Estos vectores presentan promotores que derivan del NMT1 pero poseen deleciones dentro del sitio promotor que disminuye su actividad, siendo la fuerza de los mismos NMT1>NMT41>NMT81. Dos nuevas construcciones, pTOPO_{NMT41}-*TczAC* y pTOPO_{NMT81}-*TczAC*, fueron obtenidas y utilizadas para transformar la cepa de levaduras CHP495. Como se observa en las figuras 46 y 47, a medida que disminuyó la fuerza del promotor disminuyó la actividad enzimática y la longitud de las células, demostrando que ambos parámetros pueden ser utilizados indistintamente como indicadores de la actividad adenilil ciclasa.

Se pudo observar que el mayor tamaño en las células se debía a una inhibición de la mitosis ya que las células alargadas poseían un solo núcleo (Figura 47 DAPI). Esto concuerda con lo reportado por Kishimoto y Yamashita (2000). Se observó también una rápida disminución de la actividad adenilil ciclasa y de la longitud de la célula al disminuir la fuerza del promotor, siendo las células transformadas con el vector TOPO_{NMT81}-*TczAC* prácticamente iguales a las levaduras sin adenilil ciclasa (Figura 46 y 47). Datos preliminares indican que el 5'-FOA y la actividad β -galactosidasa seguirían la misma tendencia. Todos estos resultados sugieren que, como era esperado, el sistema de expresión en *S. pombe* podría ser de gran utilidad para la búsqueda de inhibidores específicos de isoformas de adenilil ciclasas, ya que las variaciones en los niveles de AMPc pueden ser fácilmente detectadas.

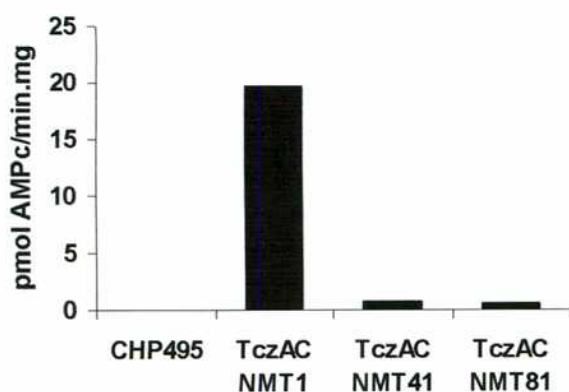


Figura 46. Actividad adenilil ciclasa en membranas de levaduras transformadas con las distintas construcciones TOPO-*TczAC*. La actividad adenilil ciclasa se ensayó en membranas de las levaduras transformadas con el gen *TczAC* bajo el promotor NMT1, NMT41 o NMT81.

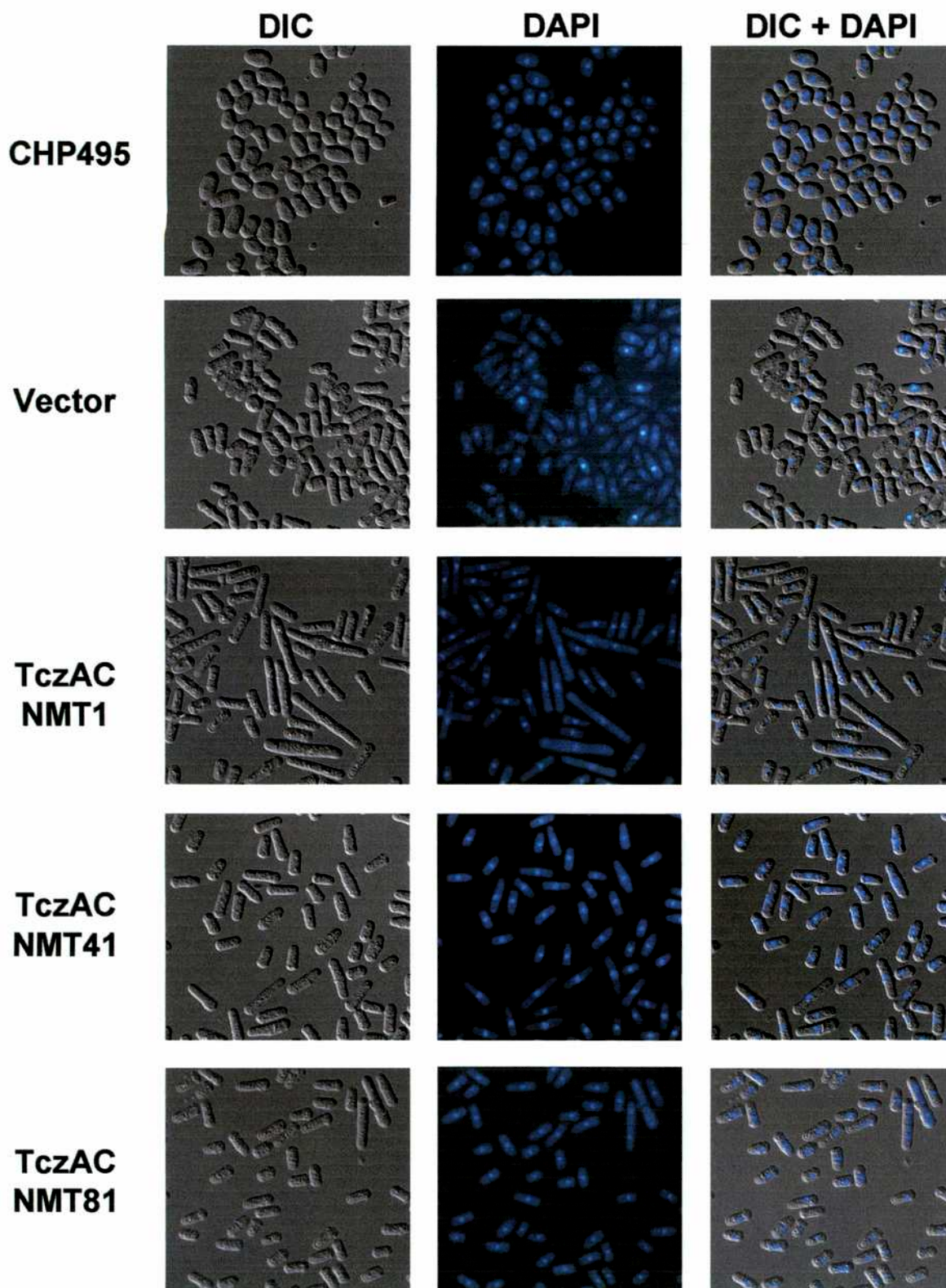


Figura 47. Efecto de la expresión de distintas cantidades de TczAC sobre la longitud celular. Levaduras de la cepa CHP495 carentes de actividad adenilil ciclase se transformaron con el vector el gen *TczAC* bajo promotores de distinta fuerza y se analizó la longitud celular. La fuerza de los promotores utilizados es NMT1>NMT41>NMT81. Como control se incluyeron levaduras transformadas con el vector NMT1 vacío.

Modulo II

8- Clonado y caracterización de la fosfodiesterasa de AMPc TczPDE

Los niveles de AMPc celulares están regulados a través su síntesis por adenilil ciclasas y su degradación por fosfodiesterasas de AMPc. De esta manera, el nivel de este segundo mensajero dentro de la célula es siempre un balance entre la actividad de ambas enzimas. Con el objetivo de identificar un gen que codificase para una fosfodiesterasa de AMPc de *T. cruzi*, se utilizó la secuencia correspondiente al gen *TbPDE2B* para rastrear la base de datos del proyecto genoma de este parásito utilizando el programa Wu-Blast2 (<http://www.ebi.ac.uk/parasites/parasite-genome.html>). Se identificaron 3 secuencias que presentaban homología con el gen ingresado (AZ050569, AZ050205, AA952604). Las secuencias podían alinearse con *TbPDE2B* si superponerse entre sí, lo cual permitió diseñar distintos oligonucleótidos y llevar a cabo amplificaciones por PCR utilizando ADN genómico de *T. cruzi* (Figura 48). De las amplificaciones realizadas, solo aquella utilizando los iniciadores PD2Fw y 5'PDint dió una banda del tamaño esperado (1181pb). Esta banda fue subclonada en el vector pGEM-Teasy y al ser secuenciada mostró una alta homología con PDEs previamente identificadas. El fragmento fue utilizado como sonda para rastrear la biblioteca genómica de *T. cruzi* construida en el bacteriófago λ Fix II. Después de 3 rondas de rastreo se obtuvieron 10 clones positivos. A partir de 3 clones se obtuvo un marco de lectura abierto de 2790 pb que codificaba para una proteína de 929 aminoácidos y un peso molecular estimado de 103,4 kDa (Figura 49). Esta secuencia presento alta homología con fosfodiesterasas de tripanosomátidos y otros organismos, y fue denominada TczPDE (AY233464).

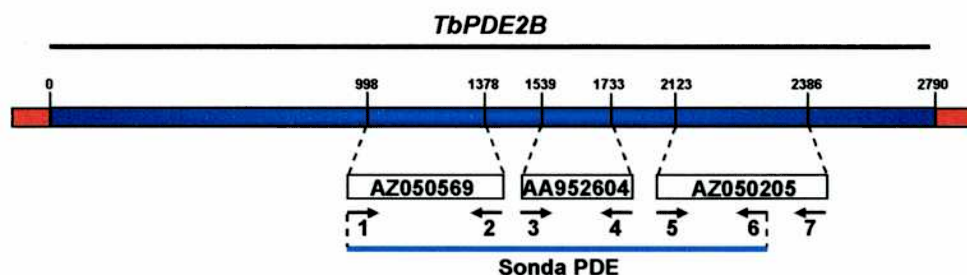


Figura 48. Esquema de la estrategia de clonado de TczPDE. Las secuencias identificadas en la base de secuencias de *T. cruzi* se alinearon con la secuencia de *TbPDE2B*. Las flechas indican los oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias identificadas y los oligonucleótidos utilizado para obtener la sonda. 1, PD2Fw, 2, PD2Rv, 3, PPD3Fw, 4, PD3Rv, 5, PDFw, 6, 5'PDint, 7 PDRv.

8.1- Análisis molecular del gen *TczPDE*

El análisis de la secuencia de TczPDE mostró que la proteína codificada presenta un posible péptido señal (aminoácidos 1-22), dos dominios GAF (aminoácidos 237-387 y 410-560) y un sitio catalítico altamente conservado (aminoácidos 669-840; Figura 49). Además, TczPDE contiene un posible sitio de fosforilación por PKA (KRKS) entre los aminoácidos 390-393 sugiriendo un posible mecanismo de regulación por fosforilación (Figura 49).

```

1  MAETGGRHLLLEALTLCEVILSRYKRCGLQVDEAETKAFQAVS
43  ERFHEITHATQGGNAAFVKPLNIIKMAPAIPTIGAVFQTPLE
85  SVTKLMEKCIDLCLPIKEVFIMLNEQISAVLRTKNTRTYLD
127 SGDDLLKDPVNGIAALVDERTPLGKTLFSTRPFSIAGTLYIP
169 LLHNETVIGCVENPSGRTDYHSQAIIEAVLRVAATVIHNAIE
210 SERLRWNKEKAEAMLEMATQLARDNLDEAVLANSIMNTAKVL
253 TESDRCSIFLVKDDTLEAHFEDGNIVAIPATGIAGYVAQTG
295 QTVKISDAYSDDRFRNREVDKATGYRTKTILCMPVTYEGSIVA
337 VAQLINKLDMVTESGLRLPRTFGKRDEELFQTFSMFAGASLR
379 NCRINEKLINENRNSDAILDVVTLLSNTDIRDVGIVRVHLH
421 GAKRLLYADRSALFLVDKERNELYSRIADSVAGKEIRFPCGQ
463 GIAGVVASNGIGENILDAYQDPRFRNREVDKQLGYRTQALLCE
505 PIVLNGEILAVVQLVNKLNEAGEVTVFTESDRETRVFSLFA
545 GISINNSHLLLEFAVKAGREMMELNENRALAGGRTGSLRNIKR
589 PLAITEAERQAVRDINLAHLDITSIDFDLFYLRENMEPLDA
631 AAAVAYRLIVGTGLPQKLRCRDDTLLNFILQCRKKYRNVPYH
673 NFYHVVDVCQTIYTFLYKGAVCEKLTELDCFVLLVTALVHDL
715 DHMGLNNSFYLKTDSPLGILSSASGNASVLEVHHCNLAVEIL
757 SDPDSDVFEGLDAADRTLAYRSMIDCVLATDMAKHNELLNLF
799 LAAMEKPYQIGDVASRQMMMDVIVKAGDVSNTKPFDISRLW
841 AMAVTEEFYRQGDMEKEKGVEVLPMFDRSKNTELAQGQIGFI
883 DFVAGPFFKKIVSASLTGMQWTVERVESNRLEWQRTLDVKAA
925 GDGNK

```

Figura 49. Secuencia proteica de la fosfodiesterasa TczPDE. Los aminoácidos en negrita y subrayados indican el putativo péptido señal. Las letras resaltadas en gris corresponden a los dominios GAF. Las letras blancas resaltadas en negro muestran el consenso de fosforilación por PKA. El recuadro indica el dominio catalítico.

Utilizando el algoritmo de Kyte y Doolittle y los programas DAS, TM-PRED y SPLIT, se determinó que TczPDE no presenta dominios hidrofóbicos excepto el posible péptido señal. Por otro lado, los dominios GAFs no son una característica única de esta enzima sino también han sido reportados en otras fosfodiesterasas como las familias mamíferos PDE2, 5, 6, 10 y 11 (Fujishige y col., 1999; Yuasa y col., 2000) y algunos miembros de la familia TbPDE2 de *T. brucei*.

La secuencia nucleotídica de *TczPDE* mostró una identidad significativa solo con las enzimas de la familia TbPDE2 de *T. brucei* (Tabla VI). De manera contraria, la secuencia aminoacídica mostró también una identidad considerable con todas las familias de fosfodiesterasas de mamíferos (Tabla VI). La mayor identidad se encontró dentro del dominio catalítico y también dentro de los dominios GAF (Tabla VI). Estos resultados incluirían a TczPDE dentro de las fosfodiesterasas de Clase I.

PDE	Gen entero	Proteína entera	Dominio catalítico	GAF A (A)	GAF A (B)	GAF B (A)	GAF B (B)
TbPDE1	-	15%		-	-	-	-
TbPDE2A	65%	69%	79%	-	33%	-	61%
TbPDE2B	67%	69%	78%	82%	42%	40%	88%
TbPDE2C	60%	66%	77%	83%	42%	39%	87%
PDE1A		17%	30%	-	-	-	-
PDE2A		18%	29%	19%	38%	17%	36%
PDE3A		10%	27%				
PDE4A		16%	33%	-	-	-	-
PDE5A		20%	30%	36%	22%	35%	22%
PDE6C		19%	29%	26%	20%	32%	18%
PDE7A		20%	32%				
PDE8A		13%	34%				
PDE9A		15%	30%	-	-	-	-
PDE10A		23%	29%	14%	38%	32%	42%
PDE11A	-	24%	33%	42%	31%	42%	31%

Tabla VI. Porcentajes de identidad de TczPDE con las PDEs de *T. brucei* y mamíferos. Las secuencias se compararon utilizando los programas BLASTP y ClustalW. Excepto las PDEs de *T. brucei* todas las secuencias corresponden a enzimas humanas. Los dominios GAF A y B de TczPDE se compararon con los dominios GAF A (A) y B (B) de las PDEs de mamíferos. GenBank #: AAL58095, AAG23160, AAG43461, AAK33016, NM_005019, NM_002599, AJ005036, NM_006202, NM_001083.2, NP_006195, L12052, XM_031443, AY196299, AF127479, AB036704.

8.2- Organización genómica y expresión de *TczPDE*

En ensayos de Southern blot utilizando una sonda que abarca el gen *TczPDE* completo, se observó que con 3 de las 6 enzimas de restricción utilizadas (*Bgl* II, *Kpn* I, y *Pvu* II) la sonda reconocía mas bandas de las esperadas (Figura 50A). Por otro lado, en ensayos de PFGE se observó la presencia de 3 bandas cromosómicas de 0,91, 0,94 y 1.11 Mbp reconocidas por la misma sonda (Figura 50B). Estos datos demostraron que *TczPDE* es parte de una familia multigénica.

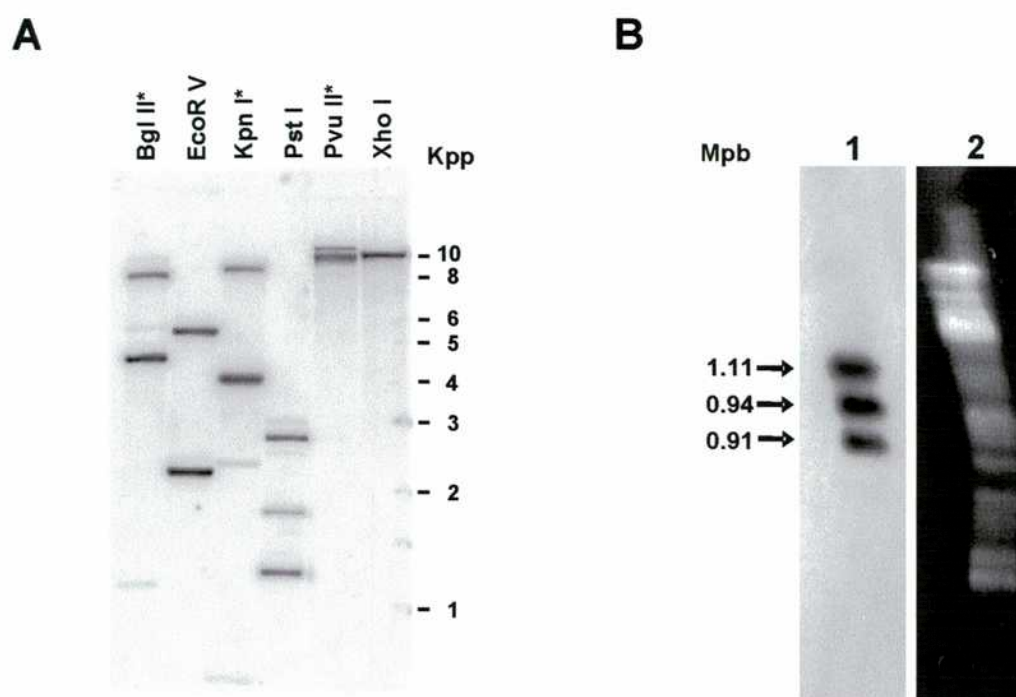


Figura 50. Southern blot y PFGE: A, ADN genómico de *T. cruzi* se digirió con las enzimas de restricción indicadas, se separó en geles de agarosa, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con una sonda correspondiente al gen *TczPDE* completo. Los asteriscos muestran las enzimas de restricción que presentan un mayor número de bandas que las esperadas a partir de la secuencia. B, Los cromosomas enteros de *T. cruzi* se separaron en geles de agarosa de campo pulsante, se transfirieron e hibridaron con la misma sonda utilizada en los ensayos de Southern blot. Las flechas indican las bandas cromosómicas reconocidas por la sonda. 1, Autorradiografía de la membrana hibridada. 2, Gel teñido con bromuro de etidio.

La secuenciación de los extremos 5' y 3' no codificantes mostró la presencia de un putativo gen *NHP2/RS6* río abajo de *TczPDE* (Figura 51; Pogacic y col., 2002; Henras y col., 1998). Esto fue interesante, ya que el gen correspondiente a la

fosfodiesterasa TbPDE2A de *T. brucei* presenta una organización genómica análoga, con el mismo gen localizado río abajo y a una distancia similar (Figura 51). Estos resultados sugerirían un origen evolutivo común para dichas enzimas.

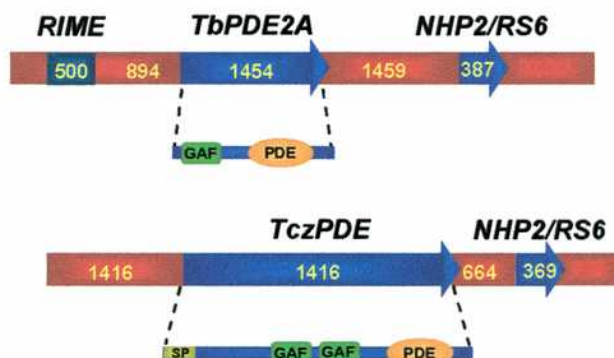


Figura 51. Esquema de la disposición genómica de *TczPDE* y *TbPDE2A*. En negro se indican las regiones codificantes. En gris las regiones no codificantes. El esquema está realizado a escala y los números indican pares de bases. PDE, dominio catalítico

La expresión de *TczPDE* en epimastigotes de *T. cruzi* se estudió por ensayos de Northern blot. Se observó la presencia de dos bandas de ~ 4 y 4.9 Kpb, lo cual indica que más de una isoforma es expresada en este estadio del parásito (Figura 52).

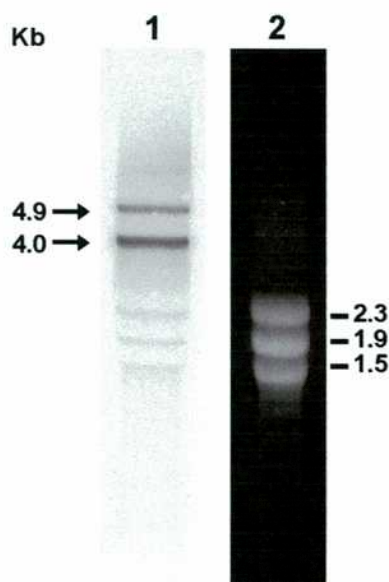


Figura 52. Northern blot: ARN total de epimastigotes se separó en geles desnaturizantes de agarosa-formaldehído, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con la sonda correspondiente al gen *TczPDE* completo. 1, Autorradiografía del gel hibridado. Se indican las bandas reconocidas por la sonda específica. 2, Gel teñido con bromuro de etidio. Se indican las bandas correspondientes a los ARN ribosomales.

9- Ensayos de complementación en levaduras deficientes de fosfodiesterasas de AMPc

Para determinar si el gen *TczPDE* codificaba para una proteína funcional se realizaron ensayos de complementación en las cepas de levaduras J106 y PM943. En ambas cepas los genes *PDE1* y *PDE2* que codifican para fosfodiesterasas de AMPc han sido deletados y como consecuencia de ello son sensibles al choque térmico. Por esta característica estas cepas de levaduras han sido ampliamente utilizadas para la identificación y caracterización de fosfodiesterasas (Atienza y Colicelli, 1998; Pillai y col., 1993). Para estos ensayos, el gen *TczPDE* se amplificó por PCR y se subclonó en el vector de expresión en levaduras pADNS bajo el promotor constitutivo de la alcohol deshidrogenasa, *ADH1*. Se transformaron levaduras de ambas cepas con la construcción obtenida y se analizó la respuesta de las mismas al choque térmico. Como muestra la figura 53 las levaduras PM943 transformadas con el gen *TczPDE* fueron capaces de crecer después de una incubación a 55°C por 30 minutos, revirtiendo así el fenotipo sensible de estas cepas. De forma contraria, las levaduras no transformadas y aquellas transformadas con el vector vacío no fueron capaces de crecer en estas tras el golpe térmico (Figura 53). Los mismos resultados se obtuvieron con la cepa J106.

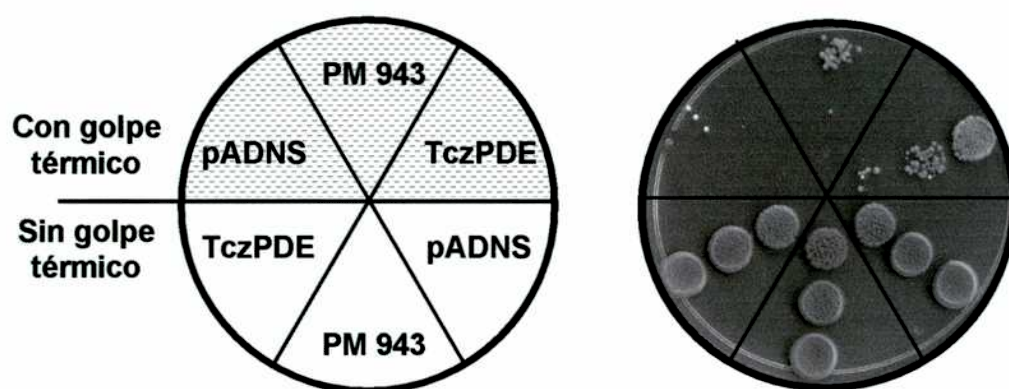


Figura 53. Ensayo de complementación en levaduras. Levaduras carentes de fosfodiesterasas de AMPc (cepa PM943), fueron transformadas con el vector pADNS vacío (pADNS), portando el gen *TczPDE* completo (*TczPDE*). Se analizó la respuesta de las células a un choque térmico de 55°C por 30 minutos.

La actividad fosfodiesterasa de AMPc fue ensayada en extractos solubles y particulados de las levaduras salvajes y transformadas. Las levaduras transformadas con el gen *TczPDE* mostraron una alta actividad enzimática, mientras que los controles no mostraron una actividad significativa (Figura 54). De manera interesante, se observó que la mayor parte de la actividad de TczPDE se encontraba asociada a la fracción particulada.

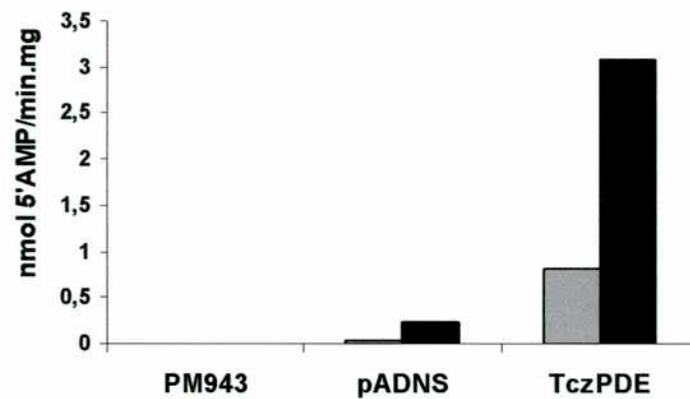


Figura 54. Ensayo de actividad fosfodiesterasa de AMPc en extractos de las levaduras transformadas. La actividad se ensayó en extractos solubles (barras grises) y particulados (barras negras) de levaduras PM943 no transformadas o transformadas con el vector vacío (pADNS) o portando el gen *TczPDE* (TczPDE).

En conjunto, estos resultados demuestran que el gen *TczPDE* codifica para una proteína funcional con actividad fosfodiesterasas de AMPc capaz de revertir el fenotipo asociado a mutantes de las levaduras deficientes en dichas enzimas.

10- Expresión de TczPDE en *E. coli* y obtención de un antisuero específico contra TczPDE

La secuencia correspondiente al gen *TczPDE* fue subclonada en el vector de expresión en bacterias pMAL. Con la construcción obtenida se transformaron bacterias de la cepa BL21 y se indujo la expresión de la proteína recombinante como fue detallado en la sección 6.2 de resultados. En las bacterias inducidas se observó que la proteína recombinante se encontraba asociada a los cuerpos de inclusión (Figura 55A). Como consecuencia de esto, la proteína expresada tuvo que ser purificada por desnaturalización/renaturalización (ver resultados sección 6.2).

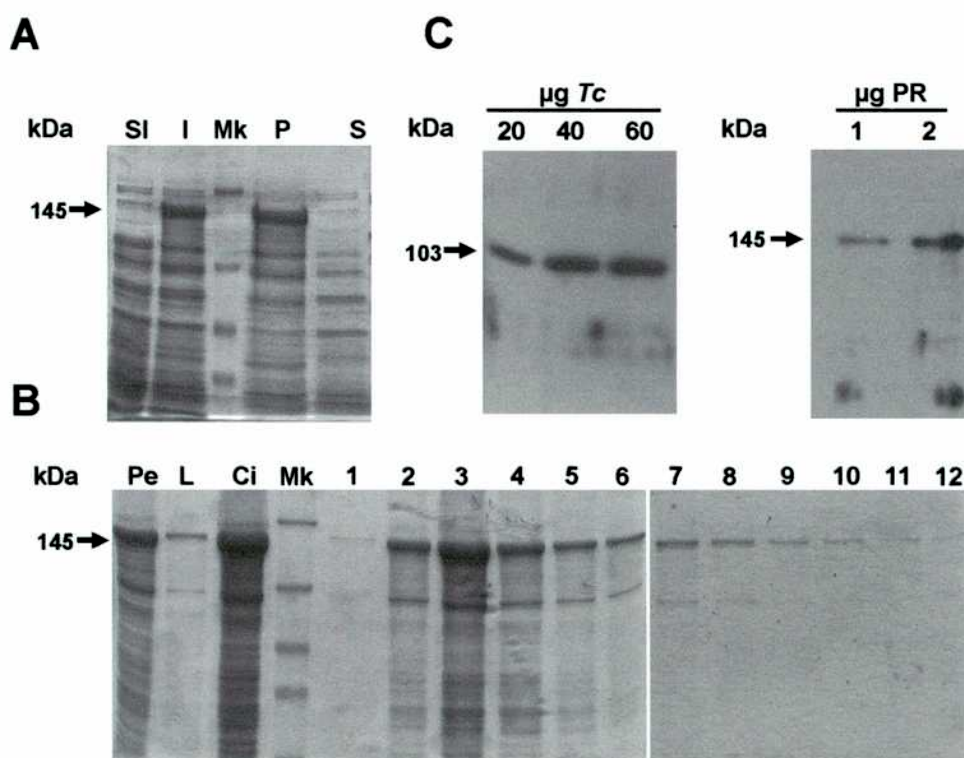


Figura 55. Expresión de TczPDE en *E. coli* y caracterización del antisuero específico. A, Extracto total de bacterias sin inducir (SI) o inducidas (I) con IPTG o pellet (P) y sobrenadante (S) obtenido por sonicación y centrifugación de bacterias inducidas se corrieron en gels de acrilamida los cuales fueron teñidos con coomassie. B, Los cuerpos de inclusión fueron purificados de pellets de bacterias inducidas, la proteína fue renaturalizada y purificada en columnas de amilosa. Pe, percolado de la columna, Ci, cuerpos de inclusión renaturalizados, L, lavado, 1-12 fracciones eluidas de la columna de afinidad. C, Ensayos de Western blot utilizando el antisuero específico obtenido en ratón. Tc, extracto crudo de *T. cruzi*, PR, proteína recombinante

La proteína purificada (Figura 55B) fue utilizada para inmunizar ratones de la cepa BALB/C. Después de 3 inmunizaciones en presencia de adyuvante de Freund se obtuvo un antisuero capaz de reconocer específicamente la proteína recombinante expresada en bacterias y una proteína del peso molecular esperado en extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi* (Fig. 55C y D)

11- Asociación de TczPDE a membranas de las levaduras transformadas

La asociación de TczPDE a las membranas de la levadura se estudió por medio de ensayos de Western blot. Utilizando el antisuero específico contra TczPDE se determinó la presencia de una banda del tamaño esperado tanto en el extracto soluble como en el particulado de las levaduras transformadas (Figura 56A). Sin embargo, la banda fue mucho mas intensa en la fracción particulada (Figura 56A).

Para determinar si TczPDE representaba una proteína periférica o una proteína integral de membrana, los extractos particulados de las levaduras recombinantes se lavaron secuencialmente con NaCl 1 M, colato de sodio 0,1 %, colato de sodio 0,5 % y urea 8 M y se analizaron los extractos por Western blot. Como se observa en la figura 56B, sólo se observó una leve liberación de TczPDE de la membrana con urea 8 M, sugiriendo que esta corresponde a una proteína integral de membrana. La presencia de la proteína en el extracto soluble de levaduras podrían deberse a la alta expresión de la misma en este organismo.

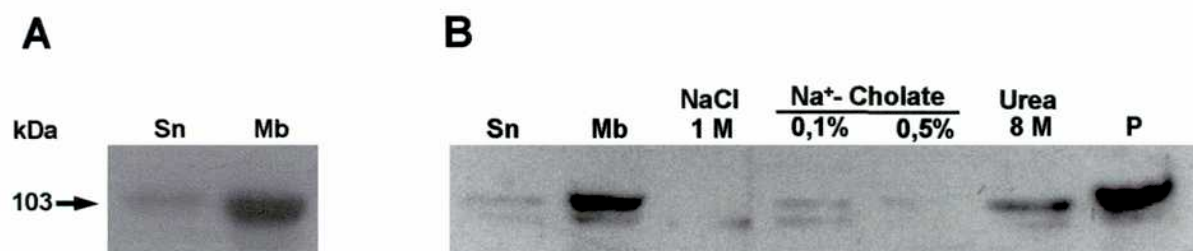


Figura 56. Localización de TczPDE en membrana de las levaduras PM943 transformadas. A, Se prepararon extractos solubles (Sn) y particulados (Mb) de las levaduras transformadas con el gen *TczPDE* entero. La presencia de TczPDE se determinó por ensayos de Western blot utilizando el antisuero específico. B, Las membranas de las levaduras fueron lavadas sucesivamente con NaCl 1 M, Colato de sodio 0,1%, 0,5 % y Urea 8 M. Las distintas fracciones fueron analizadas por Western blot para determinar la liberación de TczPDE de la membrana. Mb, membrana preextraída, P, pellet post-extraído

12- Caracterización bioquímica de TczPDE

La caracterización bioquímica de TczPDE se realizó en membranas de las levaduras transformadas. Se encontró que esta enzima posee una alta afinidad por AMPc con una K_m de $7.3 \pm 0.9 \mu M$ (Figura 57A) y una actividad 2-3 veces mayor en presencia del cofactor Mn^{+2} en vez de Mg^{+2} (Figura 57B). Por otro lado, TczPDE no fue capaz de hidrolizar GMPc en un amplio rango de concentraciones (1 nM a 10 mM), y este segundo mensajero no tuvo efecto alguno sobre la actividad de la enzima. Estos resultados sugieren que TczPDE es una fosfodiesterasa específica para AMPc cuya actividad no es regulada por GMPc. La alta afinidad de TczPDE por el AMPc confirma que esta enzima es parte las fosfodiesterasas de Clase I.

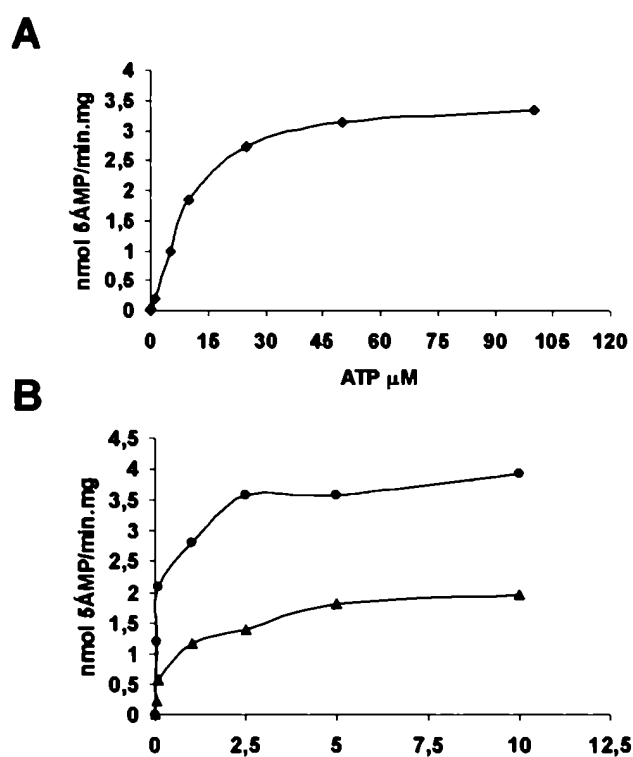


Figura 57. Características bioquímicas de TczPDE. Las membranas de las levaduras transformadas con el gen *TczPDE* entero fueron ensayadas para actividad fosfodiesterasa de AMPc adenilil ciclase en presencia de distintas concentraciones de AMPc (A) o en presencia de distintas concentraciones de los cationes divalentes Mg^{+2} ($\blacktriangle$) y Mn^{+2} (B).

En *T. cruzi* se ha reportado la presencia de una fosfodiesterasa de AMPc soluble capaz de ser estimulada por el complejo Ca^{+2} -calmodulina (Tellez-Iñon y col., 1985). Para analizar si este complejo regulaba la actividad de TczPDE se realizaron ensayos de actividad fosfodiesterasa con distintas concentraciones de calcio y calmodulina. Incluso cuando se utilizaron membranas lavadas con EGTA para remover posibles complejos Ca^{+2} -calmodulina endógenos, no se observó estimulación con Ca^{+2} o calmodulina. De la misma manera, las fenotiazinas clorpromazina y flufenazina no fueron capaces de inhibir la actividad de la enzima. Estos resultados concuerdan con el hecho de que la secuencia de TczPDE carece de los dominios involucrados en la unión al complejo Ca^{+2} -calmodulina y apoyan la presencia de múltiples isoformas de PDEs en *T. cruzi*.

Las PDEs descritas en *T. brucei* presentan distinta sensibilidad a los inhibidores específicos de las enzimas de mamífero. Como se muestra en la tabla VII, de los inhibidores ensayados sobre TczPDE, sólo el dipiridamole mostró una inhibición a baja concentración. La papaverina, el EHNA y el vinpocetine fueron inhibidores débiles de TczPDE. Por otro lado, el IBMX, la teofilina, el zaprinast y el rolipram no inhibieron la actividad de la enzima de manera significativa.

Inhibidor	Familia de mamíferos inhibida	IC ₅₀ para mamíferos (μM)	IC ₅₀ para TczPDE (μM)
Vinpocetine	1	20	134 ± 19
EHNA	2	0.8	217 ± 4
GMPc	3	-	NI
Rolipram	4	2	>500
Zaprinast	5, 6, 9	0.45, 0.15, 35	>500
Dipiridamole	5, 6, 8, 10	0.9, 0.38, 4.5, 1.1	17 ± 4
Papaverina	NS	5-25	111 ± 17
IBMX	NS	2-50	> 1,000
Teofilina	NS	-	NI

Tabla VII. Efecto de inhibidores específicos de fosfodiesterasas sobre la actividad de TczPDE. NS, no selectivo, NI, sin inhibición. IBMX, 3-isobutil-1-metilxantina, EHNA, eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil) adenosin-hidrocloruro.

13- Fraccionamiento subcelular de TczPDE en *T. cruzi*

Como se describió previamente, el flagelo de tripanosomátidos parece ser importante para la señalización mediada por AMPc ya que ciertas enzimas de esta vía se encuentran localizadas o interaccionan con proteínas específicas de dicha organela (Paindavoine y col., 1992; esta tesis). Con el fin de estudiar si este también podía ser el caso de TczPDE se realizó un fraccionamiento subcelular de epimastigotes de *T. cruzi*. Los parásitos se lizaron y los extractos fueron sometidos a centrifugaciones sucesivas a distintas velocidades como fue descrito por Gomez y col. (Gomez y col., 1989). Las diferentes fracciones se analizaron por Western blot utilizando el antisuero específico contra TczPDE, un anticuerpo que reconoce la proteína paraflagellar rod del flagelo y un anticuerpo contra una proteína no relacionada, la arginina quinasa. De manera interesante, TczPDE mostró el mismo patrón de distribución en las distintas fracciones que la paraflagellar rod, estando principalmente asociada al flagelo y la mitocondria (Figura 58A). Paraflagellar rod es una proteína específica de flagelo y su localización en mitocondria, al igual que TczPDE podría deberse a una contaminación de la fracción con dicha organela. Contrariamente, la arginina quinasa se encontró principalmente en la fracción soluble y también asociada a organelas mas pequeñas como ha sido previamente observado (Pereira y col., comunicación personal).

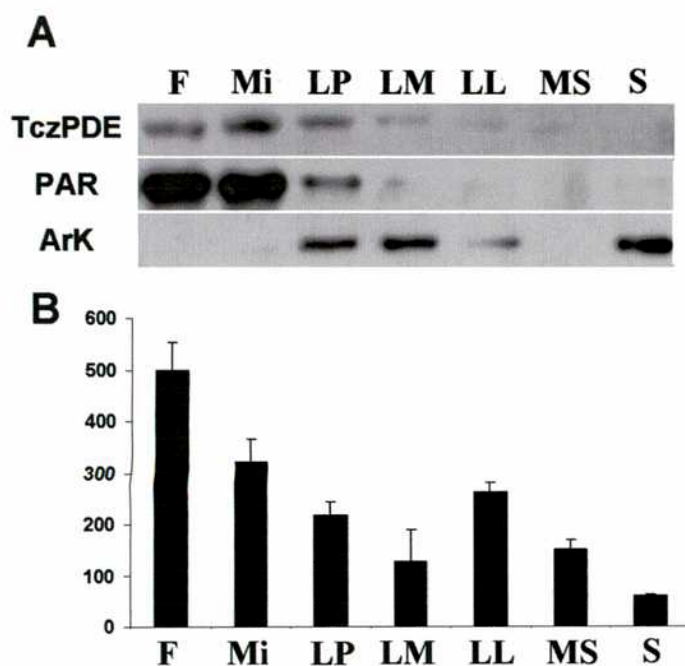


Figura 58. Fraccionamiento subcelular de TczPDE en epimastigotes de *T. cruzi*. A, Ensayos de Western blot sobre las distintas fracciones del fraccionamiento subcelular utilizando el antisuero específico contra TczPDE (TczPDE), un anticuerpo específico contra la proteína de flagelo, paraflagellar rod (PAR) y un anticuerpo específico contra la proteína arginina quinasa (ArK). F, flagelo, Mi, mitocondria, LP, fracción lisosomal pesada, LM, lisosomal mediano, LL, fracción lisosomal liviana, MS, microsomas, S, sobrenadante. B, Actividad fosfodiesterasa de AMPc en las distintas fracciones

La actividad fosfodiesterasa de AMPc medida en las distintas fracciones concordó con los resultados obtenidos por Western blot (Figura 58B).

14- Inmunolocalización de TczPDE en epimastigotes de *T. cruzi*

La localización subcelular de TczPDE en epimastigotes de *T. cruzi* se determinó por utilizando de microscopía laser confocal. Para estos experimentos los epimastigotes se adhirieron a portaobjetos, se fijaron con paraformaldehído y se permeabilizaron con metanol frío. Los parásitos se incubaron con el antisuero específico contra TczPDE. Como control de permeabilización se utilizó un anticuerpo específico contra α -tubulina. La posición de los núcleos se determinó utilizando DAPI. Con el anticuerpo anti-TczPDE se observó una señal fuerte asociada a la membrana plasmática (Figura 59) que fue aún más intensa en el flagelo (Figura 59A, flechas blancas). Por otro lado, con el anticuerpo anti-tubulina se observó una señal uniformemente distribuida en toda la célula (Figura 59B). No se observó señal alguna cuando se utilizó el suero preinmune (Figura 59C) o el anticuerpo secundario solo (datos no mostrados).

Para confirmar la asociación de TczPDE al flagelo, los epimastigotes fueron sometidos a dos tratamientos antes de ser fijados. En el primero las células fueron suavemente permeabilizadas con buffer fosfato conteniendo 1 % Triton X-100 para liberar las proteínas citoplasmáticas (Godsel y Engman, 1999). Como muestra la figura 60A y B después de la permeabilización la mayor parte de la señal se encontró asociada al flagelo. En el segundo tratamiento se prepararon citoesqueletos tratando las células con buffers conteniendo NP-40 0,5 % como fue descrito por Esfeld y Gull (Esfeld y Gull, 2001). En los citoesqueletos la señal de TczPDE permaneció asociada al flagelo de la misma manera que la señal observada para la paraflagelar rod utilizada como control de localización flagelar (Figura 60C y D). Estos resultados indican que TczPDE se encuentra localizada en la membrana plasmática de *T. cruzi* y concentrada principalmente en el flagelo.

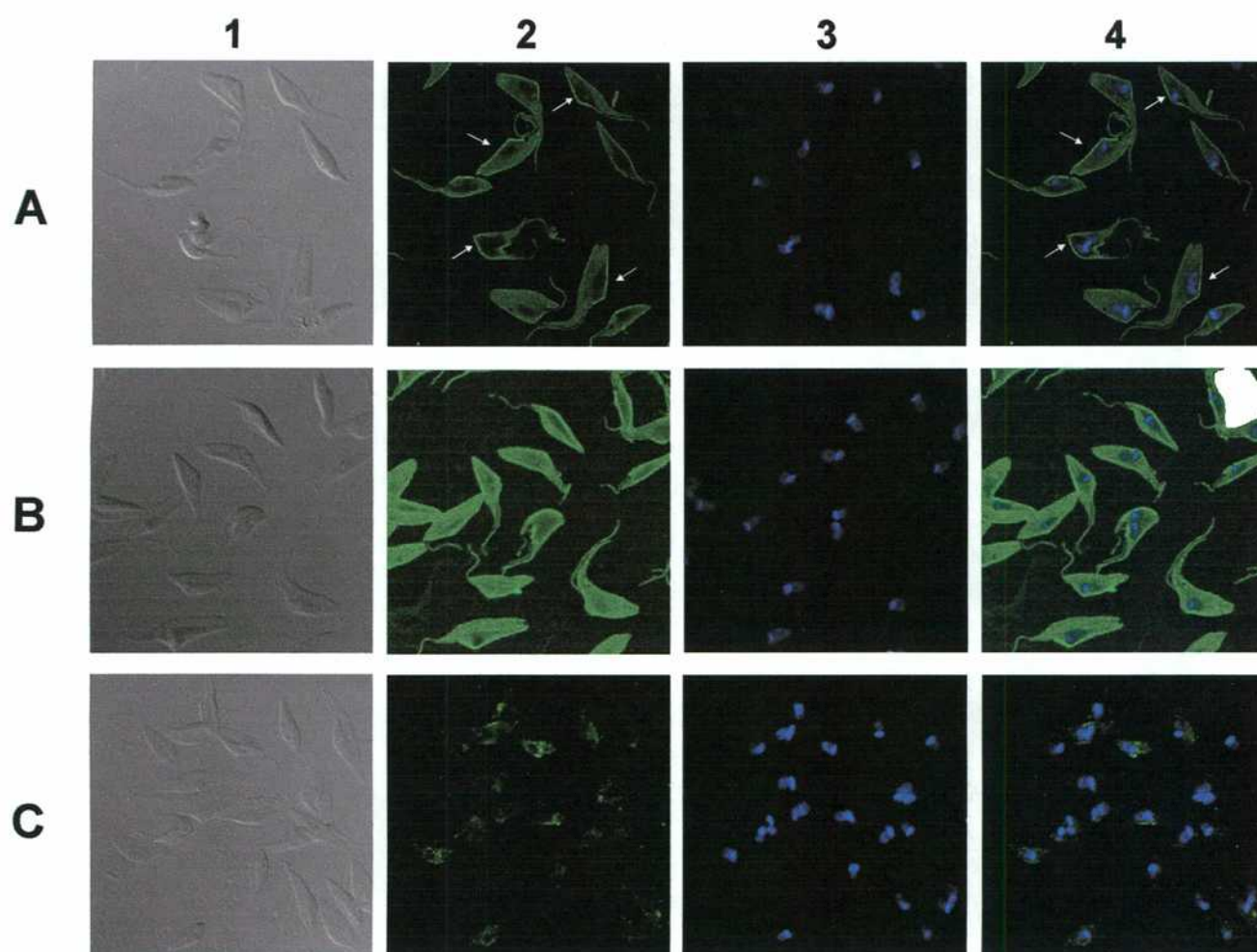


Figura 59. Inmunolocalización de TczPDE en epimastigotes de *T. cruzi*. Los epimastigotes se adherieron a portaobjetos, se fijaron con paraformaldehído y se permeabilizaron con metanol frío antes de ser incubados con los distintos anticuerpos. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio láser confocal. **A**, Antisuero contra TczPDE. **B**, Anticuerpo contra paraflagelar rod. **C**, Suero preinmune. **1**, Contraste de fase (DIC). **2**, Anticuerpo específico. **3**, DAPI. **4**, Imágenes 2 y 3 superpuestas. Las flechas señalan las regiones en donde la señal de TczPDE es más intensa.

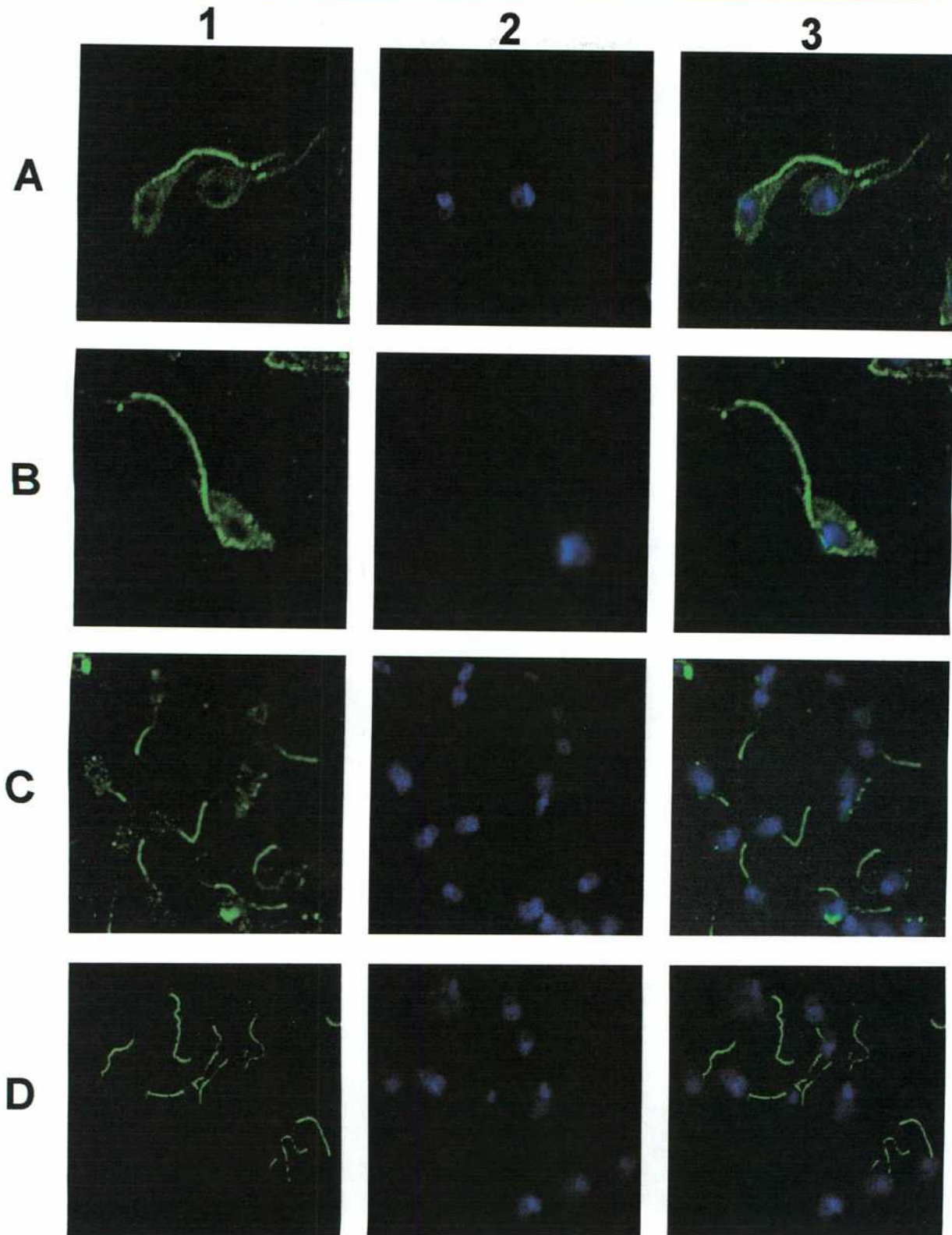


Figura 60. Asociación de TczPDE al flagelo de epimastigotes de *T. cruzi*. Para verificar la asociación de TczPDE al flagelo los epimastigotes de *T. cruzi* fueron pretratados con detergentes antes de ser fijados e incubados con el anticuerpo primario. **A y B**, Parásitos suavemente permeabilizados con 1 % Triton X-100 y revelados con el antisuero contra TczPDE. **C**, Citoesqueletos preparados lavando las células con 0,5 % NP-40 y revelados con el antisuero contra TczPDE. **D**, Citoesqueletos preparados lavando las células con 0,5 % NP-40 y revelados con el anticuerpo contra paraflagellar rod. **1**, Anticuerpo específico. **2**, DAPI. **3**, Imágenes 1 y 2 superpuestas.

DISCUSIÓN

Discusión

Modulo I

En este se trabajo estudió y caracterizó TczAC, un nuevo miembro de la familia de adenilil ciclasas de *T. cruzi*. Esta enzima presenta dos características únicas, es la primera adenilil ciclasa regulada por Ca^{+2} en este parásito, e interacciona con la proteína de flagelo paraflagellar rod.

TczAC muestra todas las características de las adenilil ciclasa de tripanosomátidos. Presenta un único dominio catalítico altamente conservado y un dominio amino-terminal variable. Presenta además una muy baja identidad con las enzimas de mamíferos, encontrándose conservados sólo aquellos aminoácidos necesarios para la actividad catalítica. Con respecto a la estructura de TczAC, esta podría ser análoga a la previamente descrita para estas enzimas o diferenciarse de las mismas por poseer un dominio transmembrana compuesto de tres pasos hidrofóbicos en lugar de uno. En ambos casos, la estructura estaría compuesta por un gran dominio amino-terminal extracelular, un dominio transmembrana (de 1 o 3 pasos) y un único dominio catalítico carboxilo-terminal, siendo similar a la estructura de los receptores guanilil ciclasa de membrana.

Por ensayos de Southern blot y PFGE se confirmó que *TczAC* es parte de una gran familia de genes. El amplio repertorio de genes que codifican para adenilil ciclasas en *T. cruzi* se corroboró por análisis *in silico* utilizando el genoma de este parásito recientemente adquirido en el laboratorio. Los ensayos de Northern blot demostraron que varias isoformas se expresan en el estadio epimastigote de este parásito. Así, si estas enzimas actúan como receptores sensoriales, la multiplicidad de isoformas le permitiría al parásito reconocer distintos ligandos o señales y responder a los mismos de manera diferente, generando las respuestas necesarias para adaptarse a los cambios en el ambiente.

Se ha reportado que el dominio catalítico de TcADC1, otra adenilil ciclasa de *T. cruzi*, es capaz de complementar una cepa de *E. coli* carente de actividad adenilil

ciclasa. En estas condiciones el dominio catalítico de TcADC1 presenta actividad adenilil ciclasa. En este trabajo se demostró que TczAC es capaz de complementar una cepa de levaduras carente en actividad adenilil ciclasa. En este caso, el dominio catalítico solo produjo una complementación parcial y la enzima entera fue necesaria para una complementación total del fenotipo de la cepa. La enzima entera tuvo entre 10 y 15 veces mas actividad que el dominio catalítico, indicando que la proteína completa es necesaria para alcanzar la máxima actividad enzimática.

Estudios bioquímicos demostraron que TczAC presenta una respuesta a los cationes divalentes Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} similar a la previamente descrita para las adenilil ciclasas de mamíferos. La enzima es entre 8 y 10 veces más activa con Mn^{+2} que con Mg^{+2} y es fuertemente inhibida por Zn^{+2} .

La inhibición por inhibidores del sitio P es otra característica común de muchas adenilil ciclasas. Este tipo de inhibidores se unen al sitio de unión al anillo de purina del ATP e inhiben específicamente las adenilil ciclasas. En tripanosomátidos estos compuestos sólo fueron ensayados para la enzima GRESAG 4.3 sobre la cual no tuvieron efecto (Naula y col. 2001). De manera contraria, el inhibidor del sitio P, 2'-deoxy-3'-AMP, fue capaz de inhibir la actividad de TczAC a una concentración que se encuentra entre la reportada para mamíferos (Désaubry y col., 1996) y la reportada para bacterias (Johnson y Shoshani, 1990). Estos resultados, y el hecho de que los aminoácidos esenciales para la actividad catalítica de las adenilil ciclasas de mamíferos se encuentran conservados en TczAC, sugieren un cierto grado de conservación en el mecanismo catalítico de síntesis de AMPc.

Una característica particular de TczAC es que es activada por Ca^{+2} . Este resultado es sumamente interesante ya que el Ca^{+2} y el AMPc han sido las principales señales descritas en el proceso de diferenciación de tripanosomátidos (Rangel-Aldao y col., 1988; Fraidenraich y col., 1993; Garcia y col., 1995; Ouassi y col., 1995; Rolin, y col., 1993; Vasella y col., 1997; Stojdl y Clarke, 1996; Lammel y col., 1996). Más interesante aún es el hecho de que la estimulación de TczAC por Ca^{+2} este diferencialmente regulada en los distintos estadios de este parásito. La presencia de una adenilil ciclasa activable por Ca^{+2} también ha sido reportada en el parásito *T. brucei*. Dicha enzima se expresa solamente en el estadio sanguíneo de este organismo. Existe

así un claro entrecruzamiento entre las ambas vía de señalización en tripanosomátidos, sin embargo, el mecanismo de activación por Ca^{+2} todavía no es claro. Se observó que el Ca^{+2} no compite con el Zn^{+2} y que de TczAC no puede ser estimulada por calmodulina bovina, ni competida por el dominio de unión a calmodulina de la CAMKII, indicando que la activación de TczAC por calcio es independiente de este modulador. Considerando que la secuencia de TczAC carece de dominios involucrados en la unión de Ca^{+2} es posible postular la existencia de una proteína de unión a Ca^{+2} distinta de la calmodulina capaz de regular la actividad de esta enzima.

Hasta el día de hoy, muy poco se sabe del mecanismo catalítico de las adenilil ciclasas de tripanosomátidos. Resultados obtenidos mediante ensayos bioquímicos de enzimas de *L. donovani* (Sanchez y col., 1995) y *T. brucei* (Naula y col., 2001) han permitido proponer que estas enzimas podrían actuar como dímeros. Utilizando el sistema de doble híbrido en levaduras se demostró la dimerización de TczAC a través de su dominio catalítico. Los resultados presentados sugieren que la dimerización sería un mecanismo común de las adenilil ciclasas de tripanosomátidos que podría permitirles adoptar una estructura similar a la al dominio catalítico de las adenilil ciclasas de mamíferos, formado por la interacción de los dominios catalíticos CI y CII presentes en la misma proteína.

Utilizando la técnica de rastreo por doble híbrido en levaduras se identificaron distintas proteínas capaces de interaccionar específicamente con la adenilil ciclasa TczAC. Debido a las características de la biblioteca de expresión utilizada, inicialmente sólo fueron identificados pequeños fragmentos de las proteínas que interaccionaban con TczAC. Esto dificultó el análisis de los clones positivos ya la mayoría de ellos no presentaban homología con proteínas de función conocida y carecían de dominios funcionales dentro de la secuencia identificada. Recientemente, el acceso al genoma de *T. cruzi* permitió identificar las secuencias genómicas correspondientes a dichos clones. Se determinó que varios de ellos poseen dominios funcionales conservados y presentan homologías con proteínas conocidas. El clon 117 posee homología con proteínas de unión a Ca^{+2} que presentan dominios *EF-Hand* y proteínas de unión a calmodulina. Así, aunque la secuencia aún no se encuentra completa, este clon resulta potencialmente interesante ya que podría tener un papel importante en la regulación de la actividad de TczAC mediada por calcio. Por otro lado, los clones 20 y 23 poseen varios dominios

WD. Estos dominios se encuentran presentes en la subunidad β de las proteínas G, dónde fueron inicialmente identificados, y en un gran número de proteínas con funciones diversas. Excepto por los dominios WD, estos clones no presentan homología de secuencia con subunidades $G\beta$. De la misma manera, la homología con las proteínas descritas en la Tabla V es baja (~25%) y restringida principalmente a los mismos dominios. Nuevos experimentos serán necesarios para determinar la función de los distintos clones y la relevancia de su interacción con TczAC.

Entre los clones identificados, el correspondiente a la paraflagellar rod fue de gran interés. Esto se debe a que la paraflagellar rod es una proteína que constituye una estructura filamentosa única de tripanosomátidos, también llamada *parafagellar rod*, que se extiende a lo largo del flagelo en forma paralela al axonema (Figura 61; Landfear y Ignatushchenko, 2001; Bastin y col., 1999; Maga y LeBowitz, 1999). El flagelo de tripanosomátidos, inicialmente descrito como una organela sólo responsable del movimiento, parece tener una función fundamental en la transducción de señales en estos organismos (Landfear y Ignatushchenko, 2001). Apoyando esta hipótesis, la adenilil ciclase ESAG4 de *T. brucei* es una de las proteínas de señalización localizada en esta organela (Paindavoine y col., 1992). Así, la interacción de TczAC con la paraflagellar rod podría indicar que esta adenilil ciclase también se localiza específicamente en el flagelo. De manera interesante, TczAC y ESAG4 son las únicas adenilil ciclasas de tripanosomátidos que son activadas por calcio y que poseen una regulación estadio específica. Además de esto, se ha reportado que gran parte de las proteínas que unen calcio se encuentran específicamente localizadas en el flagelo y también que la proteína paraflagellar rod es capaz de unir calmodulina de manera dependiente de Ca^{+2} . Todos estos resultados permiten postular que el flagelo podría ser una organela importante para el entrecruzamiento entre las vías de señalización por AMPc y Ca^{+2} . Es posible pensar que la regulación de TczAC por este catión, y probablemente la de ESAG4, podría estar mediada por la parflagellar rod. Aunque es especulativo, este podría ser un nuevo mecanismo de regulación de las adenilil ciclasas. Será necesario determinar si la paraflagellar rod actúa directamente, como un puente para la interacción con otras proteínas, o solamente esta involucrada en el anclaje de TczAC.

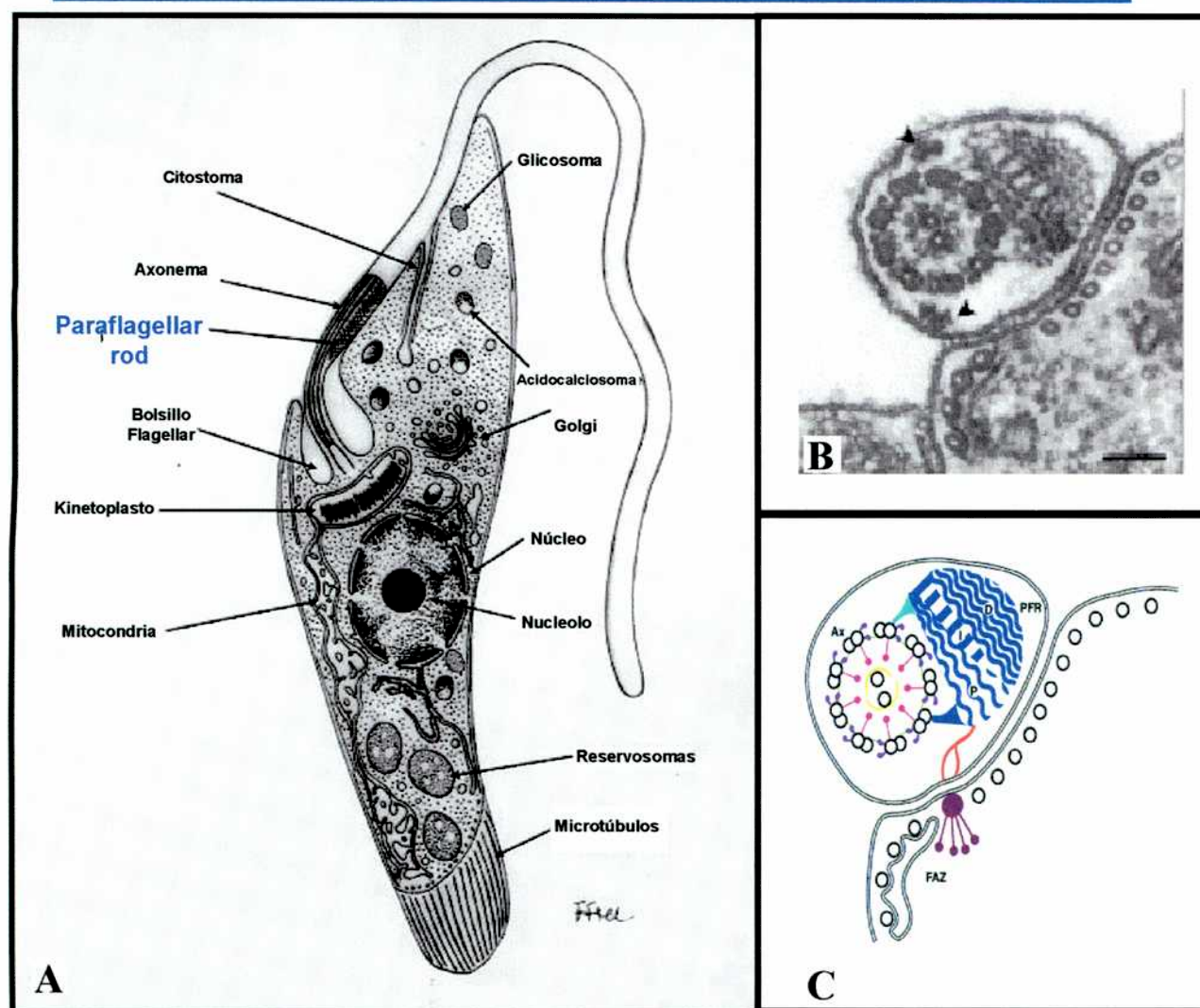


Figura 61. Estructura subcelular del estadio epimastigote de *T. cruzi*. A, Estructuras subcelulares. B, Microscopía electrónica de la estructura del flagelo. C, Esquema de las estructura del flagelo. PFR, paraflagellar rod.

Por otro lado, se desarrolló un sistema heterólogo de expresión de TczAC en *S. pombe*, el cual podría ser de gran utilidad para la identificación de inhibidores específicos de esta y otras adenilil ciclasas. Se determinó que TczAC es capaz de complementar una cepa de levaduras *S. pombe* carente de actividad adenilil ciclasa y que la actividad de esta enzima puede ser determinada indirectamente por análisis de la longitud celular, de la actividad galactosidasa y de la sensibilidad al 5'-FOA. Futuros experimentos serán necesarios para correlacionar estas tres variables con la inhibición de TczAC por compuestos específicos.

Modulo II

Durante este trabajo también se identificó y caracterizó TczPDE, la primer fosfodiesterasa de AMPc de *T. cruzi*. Esta enzima se encuentra localizada en la membrana plasmática y concentrada en el flagelo, lo cual constituye una característica única dentro de las fosfodiesterasas descritas en tripanosomátidos.

El análisis de la secuencia nucleotídica del gen *TczPDE* sólo mostró homología con los genes de fosfodiesterasas descritos en *T. brucei*. De manera contraria, la secuencia proteica de esta enzima mostró homología con todas las familias de fosfodiesterasas de mamíferos. El análisis de la secuencia proteica de TczPDE demostró que presenta un posible péptido señal, dos dominios GAF de unión a GMPc y un dominio catalítico altamente conservado. Por secuencia y estructura TczPDE se encuentra principalmente relacionada con las enzimas TbPDE2B y TbPDE2C (Rascon y col., 2002; Zoraghi y Seebeck, 2002). Sin embargo, la organización genómica de la misma es diferente a la del gen *TbPDE2B* (Rascon y col., 2002) en el cual dos genes idénticos se encuentran ordenados en tándem, y análoga a la del gen *TbPDE2A*, el cual presenta el gen *NHP2/RS6* río abajo (Zoraghi y col., 2001). Estos resultados indicarían que TczPDE comparte un origen evolutivo común con las fosfodiesterasas de la familia TbPDE2 de *T. brucei*.

Ensayos de Southern blot y PFGE demostraron que *TczPDE* es parte de una familia multigénica. Los resultados obtenidos por análisis de secuencias genómicas confirman la presencia de una familia de genes de fosfodiesterasas en *T. cruzi* e indican que la misma está compuesta por un número de isoformas menor que la familia de adenilil ciclasas. La presencia de múltiples isoformas también fue observada por ensayos de Northern blot. Estos resultados correlacionan con lo reportado para *T. brucei* en donde dos familias de fosfodiesterasas han sido identificadas (Seebeck y col., 2001).

Por ensayos de complementación en levaduras se demostró que el gen *TczPDE* codifica para una fosfodiesterasa funcional. La enzima recombinante expresada en levaduras se encontró fuertemente asociada a la membrana. Esta presentó una alta afinidad por el AMPc y no fue capaz de hidrolizar GMPc. La actividad fue entre 2 y 3

veces mayor en presencia de Mn^{+2} que de Mg^{+2} e insensible al Ca^{+2} , a la calmodulina y a los compuestos fenotiazínicos indicando que no es regulada por este modulador.

Durante las últimas décadas, los inhibidores específicos de fosfodiesterasas han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de muchas enfermedades. En *T. brucei*, algunos de estos inhibidores son capaces de bloquear la proliferación de los parásitos en cultivo (Zoraghi y Seebeck, 2002; Zoraghi y col., 2001). Así, la búsqueda de compuestos que sean capaces de bloquear la actividad de las fosfodiesterasas de AMPc en *T. cruzi* es de gran interés ya que podrían ser utilizados como una terapia alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. De los distintos inhibidores ensayados sobre TczPDE, sólo el dipiridamole mostró una inhibición a bajas concentraciones. La papaverina, el EHNA, y el vinpocetine fueron inhibidores débiles de la enzima, mientras que el IBMX, el rolipram, la teofilina y el zaprinast no inhibieron significativamente la actividad de la misma.

Como fue mencionado previamente, TczPDE presenta dos dominios GAF de unión a GMPc en su extremo amino-terminal. Sin embargo, y en forma análoga a las enzimas de la familia TbpPDE2 de *T. brucei*, el GMPc no tiene ningún efecto sobre la actividad de esta enzima (Rascon y col., 2002, Zoraghi y col., 2001). Distintas evidencias sugieren que los dominios GAF tendrían otras funciones además de la unión de GMPc. Se ha demostrado que estos dominios son capaces de unir AMPc en *Anabaena* (Kanacher y col., 2002) y se ha sugerido que también podrían unir otras moléculas (Torphy, 1998; Mehats y col., 2002). Recientemente, también se ha reportado que estos dominios están involucrados en la dimerización de fosfodiesterasas de mamíferos de las familias PDE2, 5 y 6 (Martinez y col., 2002; Muradov y col., 2003). En un futuro, sería interesante determinar si estos dominios tendrían una función similar en TczPDE.

La presencia de múltiples fosfodiesterasas y el gran número de adenilil ciclasas descritas en tripanosomátidos indica que la multiplicidad de los componentes de la vía del AMPc tiene un papel fundamental en la regulación de este camino de señalización. La presencia de múltiples isoformas con distintas propiedades regulatorias y distintos patrones de expresión permite a una célula responder de manera diferente a una amplia gama de señales extracelulares (Schwartz, 2001; Houslay y Milligan, 1997). El hecho

de que TczPDE sea parte de una familia multigénica y que no sea soluble ni esté regulada por Ca^{+2} -calmodulina, como la actividad previamente descrita en este organismo (Tellez-Iñon y col., 1985), apoyaría esta hipótesis.

Otra consecuencia importante de la multiplicidad de isoformas es la posibilidad de compartimentalización de las mismas. Muchas evidencias sugieren que el AMPc actúa a través de gradientes locales o microdominios (Zaccolo y col., 2002; Zaccolo y Pozan; 2002; Rich y col., 2001). La regulación espacio-temporal de este segundo mensajero permite a la célula producir una respuesta específica y restringida sin generar efectos secundarios no deseados. Para generar una respuesta local es necesaria la formación de complejos de señalización locales y la distribución subcelular específica de las distintas isoformas. En mamíferos, esto es llevado a cabo principalmente por la distribución diferencial de la PKA y las fosfodiesterasas de AMPc. La PKA se encuentra anclada a distintas organelas a través de las AKAPs lo cual le permite un efecto localizado (Felicello y col., 2001; Colledge y Scott, 1999). Por otro lado, la distribución de las distintas isoformas de fosfodiesterasas permite la formación de una señal local limitando la difusión del segundo mensajero a otras regiones de la célula. En tripanosomátidos, la localización flagelar de ciertas adenilil ciclasas (Paindavoine y col., 1992) indicaría que la compartimentalización también tendría un papel importante en la señalización mediada por AMPc. Si esto es así, distintas fosfodiesterasas deberían presentar distintos patrones de distribución dentro del parásito. La localización de TczPDE en la membrana y la presencia de otra/s isoformas solubles en *T. cruzi* apoyan esta hipótesis (Tellez-Iñon y col., 1985; este trabajo). Aún más interesante es el hecho de que TczPDE se encuentra concentrada en el flagelo. Estos resultados junto con lo observado para TczAC aportan una evidencia más de que el flagelo posee una función crucial en la señalización mediada por AMPc. La presencia de adenilil ciclasas y fosfodiesterasas de AMPc en esta organela podrían permitir sintetizar localmente el segundo mensajero y limitar su difusión, generando así una señal de AMPc localizada. Nuevos experimentos serán necesarios para confirmar esta hipótesis y demostrar la importancia fisiológica de las señales locales de AMPc en *T. cruzi*.

CONCLUSIONES

Conclusiones

En este trabajo se caracterizó la adenilil ciclasa TczAC.

Se determinó que TczAC está altamente conservada con las adenilil ciclasas previamente descritas en tripanosomátidos y posee todas las características de las mismas.

Se determinó que TczAC es una enzima funcional, capaz de complementar una mutante de levaduras *S. cerevisiae* deficiente en actividad adenilil ciclasa.

Se demostró que TczAC responde los cationes divalentes Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} de la misma manera que las adenilil ciclasas de mamíferos.

Se determinó que TczAC es estimulada por Ca^{+2} en forma calmodulina independiente.

Se demostró la existencia de una regulación diferencial por Ca^{+2} de la actividad adenilil ciclasa en distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*.

Se estudió la expresión de *TczAC* a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi*, determinándose que este gen se expresa a en todos los estadios del parásito.

Se determinó que TczAC dimeriza a través de su dominio catalítico.

En ensayos de doble híbrido en levaduras se identificaron posibles reguladores intracelulares de TczAC.

Se desarrolló un sistema heterólogo en *S. pombe* para la búsqueda de inhibidores específicos de TczAC.

Se identificó en gen TczPDE que codifica para una la primer fosfodiesterasa de AMPc de *T. cruzi*.

- Se determinó que TczPDE está altamente conservada con las PDEs descritas en tripanosomátidos y que presenta una homología significativa con las PDEs de mamíferos.

Mediante ensayos de complementación en levaduras *S. cerevisiae* deficientes de actividad fosfodiesterasa de AMPc se demostró TczPDE es una enzima funcional TczPDE.

Se determinó que la proteína expresada en levaduras se asocia fuertemente a membrana.

Se demostró que TczPDE es una fosfodiesterasa específica de AMPc, más activa en presencia de Mn^{+2} que de Mg^{+2} e insensible a Ca^{+2} y calmodulina.

Se obtuvo un antisuero policlonal que reconoce la proteína recombinante TczPDE en bacterias y una única banda de tamaño esperado en *T. cruzi*.

Se verificó la presencia de TczPDE en la membrana de las levaduras por ensayos de Western blot.

Se determinó que la proteína se encuentra fuertemente asociada a la membrana y sólo puede ser liberada con urea.

Por ensayos de fraccionamiento subcelular se observó que TczPDE colocaliza con la proteína de flagelo paraflagellar rod.

Se determinó la presencia de TczPDE en la membrana de epimastigotes de *T. cruzi* por microscopía laser confocal.

Se demostró la asociación de TczPDE al flagelo de *T. cruzi* por tratamientos de permeabilización y preparación de citoesqueleto.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

- Aboagye-Kwarteng T, ole-MoiYoi OK, Lonsdale-Eccles JD.** Phosphorylation differences among proteins of bloodstream developmental stages of *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem. J.* 1991; **275**, 7-14.
- Ajioka J, Swindle J.** The calmodulin-ubiquitin (CUB) genes of *Trypanosoma cruzi* are essential for parasite viability. *Mol Biochem Parasitol* 1996; **78**, 217-225.
- al-Chalabi KA, Ziz LA, al-Khayat B.** Presence and properties of cAMP phosphodiesterase from promastigote forms of *Leishmania tropica* and *Leishmania donovani*. *Comp Biochem Physiol B.* 1989; **93**, 789-792.
- Alexandre S, Paindavoine P, Hanocq-Quertier J, Paturiaux-Hanocq F, Tebabi P, Pays E.** Families of adenylate cyclase genes in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; **77**, 173-182.
- Anant JS, Ong OC, Xie HY, Clarke S, O'Brien PJ, Fung BK.** In vivo differential prenylation of retinal cyclic GMP phosphodiesterase catalytic subunits. *J Biol Chem.* 1992; **267**, 687-690.
- Ang KL, Antoni FA.** Reciprocal regulation of calcium dependent and calcium independent cyclic AMP hydrolysis by protein phosphorylation. *J Neurochem.* 2002; **81**, 422-433.
- Artymiuk PJ, Poirrette AR, Rice DW, Willett P.** A polymerase I palm in adenylyl cyclase? *Nature.* 1997; **388**, 33-34.
- Atienza JM, Colicelli J.** Yeast model system for study of mammalian phosphodiesterases. *Methods.* 1998; **14**, 35-42.
- Bakalara N, Seyfang A, Baltz T, Davis C.** *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: life cycle-regulated protein tyrosine phosphatase activity. *Exp Parasitol.* 1995; **81**, 302-312.
- Bastin P, MacRae TH, Francis SB, Matthews KR, Gull K.** Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. *Mol Cell Biol.* 1999; **19**, 8191-8200.
- Bastin P, Stephan A, Raper J, Saint-Remy JM, Oppendoes FR, Courtoy PJ.** An M(r) 145,000 low-density lipoprotein (LDL)-binding protein is conserved throughout the Kinetoplastida order. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; **76**, 43-56.
- Beard MB, Huston E, Campbell L, Gall I, McPhee I, Yarwood S, Scotland G, Houslay MD.** In addition to the SH3 binding region, multiple regions within the N-terminal noncatalytic portion of the cAMP-specific phosphodiesterase, PDE4A5, contribute to its intracellular targeting. *Cell Signal.* 2002; **14**, 453-465.
- Beard MB, O'Connell JC, Bolger GB, Houslay MD.** The unique N-terminal domain of the cAMP phosphodiesterase PDE4D4 allows for interaction with specific SH3 domains. *FEBS Lett.* 1999; **460**, 173-7.
- Berridge M, Lipp P, Bootman M.** Calcium signalling. *Curr Biol.* 1999; **9**, 157-159.
- Berridge MJ.** Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol.* 1997; **499**, 291-306.

Bieger B, Essen LO. Structural analysis of adenylate cyclases from *Trypanosoma brucei* in their monomeric state. *EMBO J.* 2001; **20**, 433-445.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; **7**, 1513-1523.

Bootman MD, Berridge MJ. The elemental principles of calcium signaling. *Cell.* 1995; **83**, 675-678.

Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ. The organisation and functions of local Ca(2+) signals. *J Cell Sci* 2001; **114**, 2213-2222.

Boshart M, Mottram JC. Protein phosphorylation and protein kinases in trypanosomatids. In: *Hide Trypanosomiasis and Leishmaniasis CAB International* 1997, 227-244.

Botsford JL, Harman JG. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev.* 1992; **56**, 100-122.

Bringaud F, Vedrenne C, Cuvillier A, Parzy D, Baltz D, Tetaud E, Pays E, Venegas J, Merlin G, Baltz T. Conserved organization of genes in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; **94**, 249-264.

Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; **96**, 79-84.

Burns JM, Parsons M, Rosman DE, Reed SG. Molecular cloning and characterization of a 42-kDa protein phosphatase of *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem.* 1993; **268**, 17155-17161.

Callahan SM, Cornell NW, Dunlap PV. Purification and properties of periplasmic 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. A novel zinc-containing enzyme from the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *J Biol Chem.* 1995; **270**, 17627-17632.

Cassel D, Shoubi S, Glusman G, Cukierman E, Rotman M, Zilberstein D. *Leishmania donovani*: Characterization of a 38-kDa membrane protein that cross-reacts with the mammalian G-protein transducin. *Exp Parasitol.* 1991; **72**, 411-417.

Cedro Fernandes E, Mauro Granjeiro J, Mikio Taga E, Meyer-Fernandes JR, Aoyama H. Phosphatase activity characterization on the surface of intact bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; **220**, 197-206.

Chagas, C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1909; **1**, 159-218.

Chaudhuri M. Cloning and characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase type 5 from *Trypanosoma brucei*. *Gene.* 2001; **266**, 1-13.

Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 2000; **10**, 322-328.

Colledge M, Scott JD. AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol.* 1999; **9**, 216-221.

Conti M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. *Mol Endocrinol.* 2000; **14**, 1317-1327.

- Coso OA, Diaz Anel A, Martinetto H, Muschietti JP, Kazanietz M, Fraidenraich D, Torres HN, Flawia MM. Characterization of a Gi-protein from *Trypanosoma cruzi* epimastigote membranes. *Biochem J*. 1992; **287**, 443-446.
- Coulter LJ, Hide G. *Trypanosoma brucei*: characterisation of a life cycle stage-specific G-protein. *Exp Parasitol*. 1995; **80**, 308-318.
- Danchin A. Phylogeny of adenylyl cyclases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1993; **27**, 109-162.
- De Castro SL, Luz MR. The second messenger cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in pathogenic microorganisms with special reference to protozoa. *Can J Microbiol*. 1993; **39**, 473-479.
- De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci*. 1999; **24**, 281-285.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 1998; **396**, 474-477.
- De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2002; **1**, 3.
- Dell KR, Engel JN. Stage-specific regulation of protein phosphorylation in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; **64**, 283-292.
- Desaubry L, Shoshani I, Johnson RA. 2',5'-Dideoxyadenosine 3'-polyphosphates are potent inhibitors of adenylyl cyclases. *J Biol Chem*. 1996; **271**, 2380-2382.
- Dessauer CW, Gilman AG. The catalytic mechanism of mammalian adenylyl cyclase. Equilibrium binding and kinetic analysis of P-site inhibition. *J Biol Chem*. 1997; **272**, 27787-27795.
- Docampo R, Moreno SNJ. The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol Today*. 1996; **12**, 61-65.
- Docampo R, Pignataro OP. The inositol phosphate/diacylglycerol signalling pathway in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 1991; **275**, 407-411.
- Docampo R. Calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res*. 1993; **26**, 189-196.
- Docampo, R, Moreno SN. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol Today*. 1999; **15**, 443-448.
- Dunlap PV, Callahan SM. Characterization of a periplasmic 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase gene, cpdP, from the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol*. 1993; **175**, 4615-4624.
- Dzeja C, Hagen V, Kaupp UB, Frings S. Ca²⁺ permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J*. 1999; **18**, 131-144.
- Eintracht J, Maathai R, Mellors A, Ruben L. Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A2 and arachidonic acid. *Biochem. J*. 1998; **336**, 659-666.

- Eisenschlos CD, Paladini AA, Molina y Vedia L, Torres HN, Flawia MM. Evidence for the existence of an Ns-type regulatory protein in *Trypanosoma cruzi* membranes. *Biochem J*. 1986; 237, 913-917.
- Engelberg D, Poradosu E, Simchen G, Levitzki A. Adenylyl cyclase activity of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is not regulated by guanyl nucleotides. *FEBS Lett*. 1990; 261, 413-418.
- Engman DM, Krause KH, Blumin JH, Kim KS, Kirchhoff LV, Donelson JE. A novel flagellar Ca²⁺-binding protein in trypanosomes. *J Biol Chem*. 1989; 264, 18627-18631.
- Engman DM, Sias SR, Gabe JD, Donelson JE, Dragon EA. Comparison of HSP70 genes from two strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1989; 37, 285-287.
- Erneux C, Van Sande J, Miot F, Cochaux P, Decoster C, Dumont JE. A mechanism in the control of intracellular cAMP level: the activation of a calmodulin-sensitive phosphodiesterase by a rise of intracellular free calcium. *Mol Cell Endocrinol*. 1985; 43, 123-134.
- Erondu NE, Donelson JE. Characterization of trypanosome protein phosphatase 1 and 2A catalytic subunits. *Mol Biochem Parasitol*. 1991; 49, 303-314.
- Ersfeld K, Gull K. Targeting of cytoskeletal proteins to the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*. 2001; 114, 141-148.
- Evers R, Cornelissen AWCA. The *Trypanosoma brucei* protein phosphatase gene: polycistronic transcription with the RNA polymerase II largest subunit gene. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18, 5089-5096.
- Feliciello A, Gottesman ME, Avvedimento EV. The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J Mol Biol*. 2001; 308, 99-114.
- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 1989; 340, 245-246.
- Fimia GM, Sassone-Corsi P. Cyclic AMP signalling. *J Cell Sci*. 2001; 114, 1971-1972.
- Flawia MM, Kornblihtt AR, Reig JA, Torruella M, Torres HN. Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase with membrane extracts from *Neurospora* and avian erythrocytes. *J Biol Chem*. 1983; 258, 8255-8259.
- Flawiá MM, Téllez-Iñón MT, Torres HN. Signal transduction mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 1997; 13, 30-33.
- Florio SK, Prusti RK, Beavo JA. Solubilization of membrane-bound rod phosphodiesterase by the rod phosphodiesterase recombinant delta subunit. *J Biol Chem*. 1996; 271, 24036-24047.
- Fraidenraich D, Pena C, Isola EL, Lammel EM, Coso O, Anel AD, Pongor S, Baralle F, Torres HN, Flawia MM. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an alpha D-globin fragment from *Triatoma* hindgut: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90, 10140-10144.
- Fujishige K, Kotera J, Yuasa K, Omori K. The human phosphodiesterase PDE10A gene genomic organization and evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains. *Eur J Biochem*. 2000; 267, 5943-5951.

- Gale M, Carter V, Parsons M. Translational control mediates the developmental regulation of the *Trypanosoma brucei* Nrk protein kinase. *J Biol Chem*. 1994; **269**, 31659–31665.
- Garcia ES, Gonzalez MS, de Azambuja P, Baralle FE, Fraidenraich D, Torres HN, Flawia MM. Induction of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis in the gut of the hematophagous insect vector, *Rhodnius prolixus*, by hemoglobin and peptides carrying alpha D-globin sequences. *Exp Parasitol*. 1995; **81**, 255-261.
- Garcia-Salcedo JA, Nolan DP, Gijon P, Gomez-Rodriguez J, Pays E. A protein kinase specifically associated with proliferative forms of *Trypanosoma brucei* is functionally related to a yeast kinase involved in the co-ordination of cell shape and division. *Mol Microbiol*. 2002; **45**, 307-319.
- Garrido MN, Bollo MI, Machado-Domenech EE. Carbachol stimulates inositol phosphate formation transiently in *Trypanosoma cruzi*. *Cell Mol Biol*. 1996; **42**, 221–225.
- Gbenle GO. *Trypanosoma brucei*: calcium-dependent endoribonuclease is associated with inhibitor protein. *Exp Parasitol*. 1990; **71**, 432-438.
- Ghansah TJ, Ager EC, Freeman-Junior P, Villalta F, Lima MF. Epidermal growth factor binds to a receptor on *Trypanosoma cruzi* amastigotes inducing signal transduction events and cell proliferation. *J Eukaryot Microbiol*. 2002; **49**, 383-390.
- Godsel LM, Engman DM. Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism. *EMBO J*. 1999; **18**, 2057-2065.
- Gomez EB, Santori MI, Laria S, Engel JC, Swindle J, Eisen H, Szankasi P, Tellez-Inon MT. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; **113**, 97-108.
- Gomez ML, Erijman L, Arauzo S, Torres HN, Tellez-Inon MT. Protein kinase C in *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms: partial purification and characterization. *Mol Biochem Parasitol*. 1989; **36**, 101-108.
- Goncalves MF, Zingales B, Colli W. cAMP phosphodiesterase and activator protein of mammalian cAMP phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1980; **1**, 107-118.
- Gong KW, Kunz S, Zoraghi R, Kunz Renggli C, Brun R, Seebeck T. cAMP-specific phosphodiesterase TbPDE1 is not essential in *Trypanosoma brucei* in culture or during midgut infection of tsetse flies. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; **116**, 229-232.
- Gonzales-Perdomo M, Romero P, Goldenberg S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Exp Parasitol*. 1988; **66**, 205-212.
- Graefe SE, Wiesgigl M, Gaworski I, Macdonald A, Clos J. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* Induces a Stress Response but No Stage Differentiation. *Eukaryot Cell*. 2002; **1**, 936-943.
- Grant KM, Hassan P, Anderson JS, Mottram JC. The *crk3* gene of *Leishmania mexicana* encodes a stage-regulated cdc2-related histone H1 kinase that associates with p12cks1. *J Biol Chem*. 1998; **273**, 10153–10159.

- Green HP, Del Pilar Molina Portela M, St Jean EN, Lugli EB, Raper J.** Evidence for a *Trypanosoma brucei* lipoprotein scavenger receptor. *J Biol Chem.* 2003; **278**, 422-7.
- Griffioen G, Thevelein JM.** Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. *Curr Genet.* 2002; **41**, 199-207.
- Hanahan D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983; **166**, 557-580.
- Harrison SA, Reifsnnyder DH, Gallis B, Cadd GG, Beavo JA.** Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardiotonic drugs. *Mol Pharmacol.* 1986; **29**, 506-514.
- Hashimoto Y, Sharma RK, Soderling TR.** Regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase by the autophosphorylated form of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 1989; **264**, 10884-10887.
- Hassan P, Fergusson D, Grant KM, Mottram JC.** The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; **91**, 337-351.
- Heath S, Hieny S, Sher A.** A cyclic AMP inducible gene expressed during the development of infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; **43**, 133-141.
- Henras A, Henry Y, Bousquet-Antonelli C, Noaillac-Depeyre J, Gelugne JP, Caizergues-Ferrer M.** Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J.* 1998; **17**, 7078-7090.
- Hide G, Gray A, Harrison CM, Tait A.** Identification of an epidermal growth factor receptor homologue in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 1989; **36**, 51-59.
- Ho YS, Burden LM, Hurley JH.** Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J.* 2000; **19**, 5288-5299.
- Hoffman CS, Winston F.** Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* gene occurs by a cAMP signaling pathway. *Genes Dev.* 1991; **5**, 561-571.
- Houslay MD, Milligan G.** Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci.* 1997; **22**, 217-224.
- Houslay MD.** Adaptation in cyclic AMP signalling processes: a central role for cyclic AMP phosphodiesterases. *Semin Cell Dev Biol.* 1998; **9**, 161-167.
- Hoyer LL, Cieslinski LB, McLaughlin MM, Torphy TJ, Shatzman AR, Livi GP.** A *Candida albicans* cyclic nucleotide phosphodiesterase: cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology.* 1994; **140**, 1533-1542.
- Hua SB, Wang CC.** Interferon-gamma activation of a mitogen-activated protein kinase, KFR1, in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 1997; **272**, 10797-10803.
- Huang H, Werner C, Weiss LM, Wittner M, Orr GA.** Molecular cloning and expression of the catalytic subunit of protein kinase A from *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 2002; **32**, 1107-1115.
- Huang Z, Ducharme Y, Macdonald D, Robichaud A.** The next generation of PDE4 inhibitors. *Curr Opin Chem Biol.* 2001; **5**, 432-438.

- Hurley JH. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 1999; **274**, 7599-7602.
- Hurley JH. The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. *Curr Opin Struct Biol.* 1998; **8**, 770-777.
- Isobe T, Holmes EC, Rudenko G. The Transferrin Receptor Genes of *Trypanosoma equiperdum* Are Less Diverse in Their Transferrin Binding Site than Those of the Broad-Host Range *Trypanosoma brucei*. *J Mol Evol.* 2003; **56**, 377-386.
- Isshiki T, Mochizuki N, Maeda T, Yamamoto M. Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a G alpha subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes Dev.* 1992; **6**, 2455-2462.
- Johnson RA, Shoshani I. Inhibition of *Bordetella pertussis* and *Bacillus anthracis* adenylyl cyclases by polyadenylate and "P"-site agonists. *J Biol Chem.* 1990; **265**, 19035-19039.
- Kanacher T, Schultz A, Linder JU, Schultz JE. A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *EMBO J.* 2002; **21**, 3672-80.
- Kaupp UB, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev.* 2002; **82**, 769-824.
- Kaur KJ, Ruben L. Protein translation elongation factor-1 alpha from *Trypanosoma brucei* binds calmodulin. *J Biol Chem.* 1994; **269**, 23045-23050.
- Kawamukai M, Ferguson K, Wigler M, Young D. Genetic and biochemical analysis of the adenylyl cyclase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Regul.* 1991; **2**, 155-164.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science.* 1998; **282**, 2275-2279.
- Kishimoto N, Yamashita I. Cyclic AMP regulates cell size of *Schizosaccharomyces pombe* through Cdc25 mitotic inducer. *Yeast.* 2000; **16**, 523-529.
- Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today.* 2000; **16**, 381-387.
- Kramer RH, Molokanova E. Modulation of cyclic-nucleotide-gated channels and regulation of vertebrate phototransduction. *J Exp Biol.* 2001; **204**, 2921-31.
- Lacombe ML, Podgorski GJ, Franke J, Kessin RH. Molecular cloning and developmental expression of the cyclic nucleotide phosphodiesterase gene of *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem.* 1986; **261**, 16811-16817.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; **227**, 680-685.
- Lagnado L. Signal amplification: let's turn down the lights. *Curr Biol.* 2002; **12**, 215-217.
- Labiberte F, Liu S, Gorseth E, Bobechko B, Bartlett A, Lario P, Gresser MJ, Huang Z. In vitro PKA phosphorylation-mediated human PDE4A4 activation. *FEBS Lett.* 2002; **512**, 205-208.

- Lalli E, Sassone-Corsi P.** Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem.* 1994; **269**, 17359-17362.
- Lammel EM, Barbieri MA, Wilkowsky SE, Bertini F, Isola EL.** *Trypanosoma cruzi*: involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. *Exp Parasitol.* 1996; **83**, 240-249.
- Landfear SM, Ignatushchenko M.** The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; **115**, 1-17.
- Landry S, Pettit MT, Apolinario E, Hoffman CS.** The fission yeast *git5* gene encodes a Gbeta subunit required for glucose-triggered adenylate cyclase activation. *Genetics.* 2000; **154**, 1463-1471.
- Lewit-Bentley A, Rety S.** EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2000; **10**, 637-643.
- Li y Wang CC.** A PHO80-like cyclin and a B-type cyclin control the cell cycle of procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 2003; [publicación electrónica anticipada].
- Lia S, Wilsonb ME, Donelson JE.** *Leishmania chagasi*: a gene encoding a protein kinase with a catalytic domain structurally related to MAP kinase. *Exp. Parasitol.* 1996; **82**, 87-96.
- Liu H, Maurice DH.** Phosphorylation-mediated activation and translocation of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinases. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and targeting. *J Biol Chem.* 1999; **274**, 10557-10565.
- Liu Y, Ruoho AE, Rao VD, Hurley JH.** Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; **94**, 13414-13419.
- Londesborough J.** Quantitative estimation of 3'5' cyclic AMP phosphodiesterase using anion exchange resin in a batch process. *Anal Biochem.* 1976; **71**, 623-628.
- Maeda T, Watanabe Y, Kunitomo H, Yamamoto M.** Cloning of the *pkal* gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 1994; **269**, 9632-9637.
- Maga JA, LeBowitz JH.** Unravelling the kinetoplastid paraflagellar rod. *Trends Cell Biol.* 1999; **9**, 409-413.
- Malaquias AT, Oliveira MM.** Phospholipid signalling pathways in *Trypanosoma cruzi* growth control. *Acta Trop.* 1999; **73**, 93-108.
- Maldonado RA, Linss J, Thomaz N, Olson CL, Engman DM, Goldenberg S.** Homologues of the 24-kDa flagellar Ca(2+)-binding protein gene of *Trypanosoma cruzi* are present in other members of the Trypanosomatidae family. *Exp Parasitol.* 1997; **86**, 200-205.
- Marchesini N, Bollo M, Hernandez G, Garrido MN, Machado-Domenech EE.** Cellular signalling in *Trypanosoma cruzi*: biphasic behaviour of inositol phosphate cycle components evoked by carbachol. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; **120**, 83-91.
- Martin BR, Voorheis HP, Kennedy EL.** Adenylate cyclase in bloodstream forms of *Trypanosoma* (Trypanozoon) *brucei* sp. *Biochem J.* 1978; **175**, 207-212.

- Martinez SE, Wu AY, Glavas NA, Tang XB, Turley S, Hol WG, Beavo JA.** The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; **99**, 13260-13265.
- Mehats C, Andersen CB, Filopanti M, Jin SL, Conti M.** Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; **13**, 29-35.
- Meinkoth JL, Alberts AS, Went W, Fantozzi D, Taylor SS, Hagiwara M, Montminy M, Feramisco JR.** Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem.* 1993; **127-128**, 179-186.
- Moreno SN, Silva J, Vercesi AE, Docampo R.** Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J Exp Med.* 1994; **180**, 1535-1540.
- Moreno SNJ, Docampo R, Vercesi AE.** Calcium homeostasis in procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Lack of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} release. *J Biol Chem.* 1992; **267**, 6020-6026.
- Muller IB, Domenicali-Pfister D, Roditi I, Vassella E.** Stage-specific Requirement of a Mitogen-activated Protein Kinase by *Trypanosoma brucei*. *Mol Biol Cell.* 2002; **13**, 3787-3799.
- Muradov KG, Boyd KK, Martinez SE, Beavo JA, Artemyev NO.** The GAFa Domains of Rod cGMP-phosphodiesterase 6 Determine the Selectivity of the Enzyme Dimerization. *J Biol Chem.* 2003; **278**, 10594-10601.
- Murthy KS.** Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *Biochem J.* 2001; **360**, 199-208.
- Naula C, Schaub R, Leech V, Melville S, Seebeck T.** Spontaneous dimerization and leucine-zipper induced activation of the recombinant catalytic domain of a new adenylyl cyclase of *Trypanosoma brucei*, GRESAG4.4B. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; **112**, 19-28.
- Naula C, Seebeck T.** Cyclic AMP signaling in trypanosomatids. *Parasitol Today.* 2000; **16**, 35-38.
- Nikawa J, Sass P, Wigler M.** Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1987; **7**, 3629-36.
- Nolan DP, Reverlard P, Pays E.** Overexpression and characterization of a gene for a $Ca(2+)$ -ATPase of the endoplasmic reticulum in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 1994; **269**, 26045-26051.
- Ochatt CM, Ulloa RM, Torres HN, Tellez-Inon MT.** Characterization of the catalytic subunit of *Trypanosoma cruzi* cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; **57**, 73-81.
- Ogueta SB, Solari A, Tellez-Inon MT.** *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms possess a $Ca(2+)$ -calmodulin dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 1994; **337**, 293-297.
- Oki N, Takahashi SI, Hidaka H, Conti M.** Short term feedback regulation of cAMP in FRTL-5 thyroid cells. Role of PDE4D3 phosphodiesterase activation. *J Biol Chem.* 2000; **275**, 10831-10837.

- Oliveira MM, Rocha ED, Rondinelli E, Arnholdt AV, Scharfstein J. Signal transduction in *Trypanosoma cruzi*: opposite effects of adenylyl cyclase and phospholipase C systems in growth control. *Mol Cell Biochem.* 1993; **124**, 91-99.
- Orr GA, Tanowitz HB, Wittner M. *Trypanosoma cruzi*: stage expression of calmodulin-binding proteins. *Exp. Parasitol.* 1992; **74**, 127-133.
- Ouaissi A, Cornette J, Schoneck R, Plumas-Marty B, Taibi A, Loyens M, Capron A. Fibronectin cleavage fragments provide a growth factor-like activity for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. *Eur J Cell Biol.* 1992; **59**, 68-79.
- Oz HS, Huang H, Wittner M, Tanowitz HB, Bilezikian JP, Morris SA. Evidence for guanosine triphosphate-binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; **50**, 620-631.
- Paindavoine P, Rolin S, Van Assel S, Geuskens M, Jauniaux JC, Dinsart C, Huet G, Pays E. A gene from the variant surface glycoprotein expression site encodes one of several transmembrane adenylyl cyclases located on the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol.* 1992; **12**, 1218-1225.
- Park JH, Brekken DL, Randall AC, Parsons M. Molecular cloning of *Trypanosoma brucei* CK2 catalytic subunits: the alpha isoform is nucleolar and phosphorylates the nucleolar protein Nopp44/46. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; **119**, 97-106.
- Parsons M, Ledbetter JA, Schieven GL, Nel AE, Kanner SB. Developmental regulation of pp44/46, tyrosine-phosphorylated proteins associated with tyrosine/serine kinase activity in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; **63**, 69-78.
- Parsons M, Valentine M, Carter V. Protein kinases in divergent eukaryotes: identification of protein kinase activities regulated during trypanosome development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; **90**, 2656-2660.
- Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene.* 2001; **269**, 13-25.
- Paveto C, Pereira C, Espinosa J, Montagna AE, Farber M, Esteva M, Flawia MM, Torres HN. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 1995; **270**, 16576-16579.
- Pereira C, Paveto C, Espinosa J, Alonso G, Flawia MM, Torres HN. Control of *Trypanosoma cruzi* epimastigote motility through the nitric oxide pathway. *J Eukaryot Microbiol.* 1997; **44**, 155-156.
- Perez-Alvarez MJ, Larreta R, Alonso C, Requena JM. Characterisation of a monoclonal antibody recognising specifically the HSP70 from *Leishmania*. *Parasitol Res.* 2001; **87**, 907-910.
- Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, Miller WE, McLean AJ, Conti M, Houslay MD, Lefkowitz RJ. Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science.* 2002; **298**, 834-836.
- Pillai R, Kytile K, Reyes A, Colicelli J. Use of a yeast expression system for the isolation and analysis of drug-resistant mutants of a mammalian phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; **90**, 11970-11974.

- Pitt GS, Milona N, Borleis J, Lin KC, Reed RR, Devreotes PN. Structurally distinct and stage-specific adenylyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell*. 1992; **69**, 305-315.
- Pogacic V, Dragon F, Filipowicz W. Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol Cell Biol*. 2000; **20**, 9028-9040.
- Potter LR, Hunter T. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J Biol Chem*. 2001; **276**, 6057-6060.
- Qin N, Baehr W. Expression and mutagenesis of mouse rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase. *J Biol Chem*. 1994; **269**, 3265-3271.
- Qin N, Pittler SJ, Baehr W. In vitro isoprenylation and membrane association of mouse rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase alpha and beta subunits expressed in bacteria. *J Biol Chem*. 1992; **267**, 8458-8463.
- Rall TW, Sutherland EW, Berthet J. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. *J Biol Chem*. 1957; **224**, 463-475.
- Rangel-Aldao R, Allende O, Triana F, Piras R, Henriquez D, Piras M. Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1987; **22**, 39-43.
- Rangel-Aldao R, Tovar G, Ledezma de Ruiz M. The cAMP receptor protein of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 1983; **258**, 6979-6983.
- Rangel-Aldao R, Triana F, Fernandez V, Comach G, Abate T, Montoreano R. Cyclic AMP as an inducer of the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Int*. 1988; **17**, 337-344.
- Rascon A, Soderling SH, Schaefer JB, Beavo JA. Cloning and characterization of a cAMP-specific phosphodiesterase (TbPDE2B) from *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99**, 4714-4719.
- Rascon A, Vilorio ME, De-Chiara L, Dubra ME. Characterization of cyclic AMP phosphodiesterases in *Leishmania mexicana* and purification of a soluble form. *Mol Biochem Parasitol*. 2000; **106**, 283-292.
- Rich TC, Fagan KA, Tse TE, Schaack J, Cooper DM, Karpen JW. A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; **98**, 13049-13054.
- Richter W. 3',5' Cyclic nucleotide phosphodiesterases class III: members, structure, and catalytic mechanism. *Proteins*. 2002; **46**, 278-286.
- Ridgley EL, Xiong ZH, Ruben L. Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem J*. 1999; **340**, 33-40.
- Ridgley EL, Ruben L. Phospholipase from *Trypanosoma brucei* releases arachidonic acid by sequential sn-1, sn-2 deacylation of phospholipids. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; **114**, 29-40.
- Rolin S, Halleux S, Van Sande J, Dumont J, Pays E, Steinert M. Stage-specific adenylate cyclase activity in *Trypanosoma brucei*. *Exp. Parasitol*. 1990; **71**, 350-352.

- Rolin S, Paindavoine P, Hanocq-Quertier J, Hanocq F, Claes Y, Le Ray D, Overath P, Pays E. Transient adenylate cyclase activation accompanies differentiation of *Trypanosoma brucei* from bloodstream to procyclic forms. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; **61**, 115-125.
- Ross DT, Raibaud A, Florent IC, Sather S, Gross MK, Storm DR, Eisen H. The trypanosome VSG expression site encodes adenylate cyclase and a leucine-rich putative regulatory gene. *EMBO J.* 1991; **10**, 2047-253.
- Ruiz RC, Favoreto S Jr, Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Manque PM, Yoshida N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem J.* 1998; **330**, 505-511.
- Saar Y, Ransford A, Waldman E, Mazareb S, Amin-Spector S, Plumblee J, Turco SJ, Zilberstein D. Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; **95**, 9-20.
- Sanchez MA, Zeoli D, Klamo EM, Kavanaugh MP, Landfear SM. A family of putative receptor-adenylate cyclases from *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 1995; **270**, 17551-17558.
- Santander V, Bollo M, Machado-Domenech E. Lipid kinases and Ca(2+) signaling in *Trypanosoma cruzi* stimulated by a synthetic peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; **293**, 314-320.
- Santori MI, Laría S, Gómez EB, Espinosa I, Galanti N, Téllez-Iñón MT. Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; **121**, 225-32.
- Santos DO, Oliveira MM. Effect of cAMP on macromolecule synthesis in the pathogenic protozoa *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988; **83**, 287-292.
- Sass P, Field J, Nikawa J, Toda T, Wigler M. Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; **83**, 9303-9307.
- Sassone-Corsi P. Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; **30**, 27-38.
- Schwartz, JH. The many dimensions of cAMP signaling. *Proc Natl Acad. Sci U S A* 2001, **98**, 13482-13484.
- Seebeck T, Gong K, Kunz S, Schaub R, Shalaby T, Zoraghi R. cAMP signalling in *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol.* 2001; **31**, 491-498.
- Shakur Y, Takeda K, Kenan Y, Yu ZX, Rena G, Brandt D, Houslay MD, Degerman E, Ferrans VJ, Manganiello VC. Membrane localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE3). Two N-terminal domains are required for the efficient targeting to, and association of, PDE3 with endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2000; **275**, 38749-38761.
- Siman-Tov MM, Aly R, Shapira M, Jaffe CL. Cloning from *Leishmania major* of a developmentally regulated gene, c-lpk2, for the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; **77**, 201-215.
- Simonds WF. G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci.* 1999; **20**, 66-73.

- Simpson L. A base called J. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; **95**, 2037-2038.
- Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA. Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; **95**, 8991-8996.
- Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol*. 2000; **12**, 174-179.
- Spadafora C, Repetto Y, Torres C, Pino L, Robello C, Morello A, Gamarro F, Castanys S., Two casein kinase 1 isoforms are differentially expressed in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002; **124**, 23-36.
- Stephens LR, Jackson TR, Hawkins PT. Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system?. *Biochim. Biophys. Acta*. 1993; **1179**, 27-75.
- Steverding D. The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Int*. 2000; **48**, 191-8
- Stojdl DF, Clarke MW. *Trypanosoma brucei*: analysis of cytoplasmic Ca²⁺ during differentiation of bloodstream stages in vitro. *Exp Parasitol*. 1996; **83**, 134-16.
- Stork PJ, Schmitt JM. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol*. 2002; **12**, 258-266.
- Strada SJ, Martin MW, Thompson WJ. General properties of multiple molecular forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase in the nervous system. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res*. 1984; **16**, 13-29.
- Sutherland, EW, Rall TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem*. 1958; **232**: 1077-1091.
- Swinnen JV, D'Souza B, Conti M, Ascoli M. Attenuation of cAMP-mediated responses in MA-10 Leydig tumor cells by genetic manipulation of a cAMP-phosphodiesterase. *J Biol Chem*. 1991; **266**, 14383-14389.
- Tan H, Andrews NH. Don't bother to knock--the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol*. 2002; **18**, 427-428.
- Tang WJ, Gilman AG. Adenylyl cyclases. *Cell*. 1992; **70**, 869-872.
- Tang WJ, Hurley JH. Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Mol Pharmacol*. 1998; **54**, 231-40.
- Taylor MC, Muhia DK, Baker DA, Mondragon A, Schaap PB, Kelly JM. *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase is encoded by a complex multigene family. *Mol Biochem Parasitol*. 1999; **104**, 205-217.
- Tellez-Inon MT, Ulloa RM, Torruella M, Torres HN. Calmodulin and Ca²⁺-dependent cyclic AMP phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1985; **17**, 143-153.
- Tesmer JJ, Dessauer CW, Sunahara RK, Murray LD, Johnson RA, Gilman AG, Sprang SR. Molecular basis for P-site inhibition of adenylyl cyclase. *Biochemistry*. 2000; **39**, 14464-14471.

- Tesmer JJ, Sprang SR.** The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol.* 1998; **8**, 713-719.
- Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR.** Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science.* 1997; **278**, 1907-1916.
- Tesmer JJ, Sunahara RK, Johnson RA, Gosselin G, Gilman AG, Sprang SR.** Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science.* 1999; **285**, 756-760.
- Thomason PA, Traynor D, Cavet G, Chang WT, Harwood AJ, Kay RR.** An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*. *EMBO J.* 1998; **17**, 2838-45.
- Thompson WJ, Brooker G, Appleman MM.** Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterases with radioactive substrates. *Methods Enzymol.* 1974; **38**, 205-212.
- Toda T, Uno I, Ishikawa T, Powers S, Kataoka T, Broek D, Cameron S, Broach J, Matsumoto K, Wigler M.** In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell.* 1985; **40**, 27-36.
- Torphy TJ, Page C.** Phosphodiesterases: the journey towards therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; **21**, 157-159.
- Torphy TJ.** Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; **157**, 351-370.
- Torruella M, Flawia MM, Eisenschlos C, Molina y Vedia L, Rubinstein CP, Torres HN.** *Trypanosoma cruzi* adenylate cyclase activity. Purification and characterization. *Biochem J.* 1986; **234**, 145-150.
- Tucker CL, Hurley JH, Miller TR, Hurley JB.** Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; **95**, 5993-5997.
- Tyler KM, Engman DM.** The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; **31**, 472-481.
- Ulloa RM, Mesri E, Esteva M, Torres HN, Téllez-Iñón MT.** Cyclic AMP-dependent protein kinase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 1988; **255**, 319-326.
- van Es S, Virdy KJ, Pitt GS, Meima M, Sands TW, Devreotes PN, Cotter DA, Schaap P.** Adenylyl cyclase G, an osmosensor controlling germination of *Dictyostelium* spores. *J Biol Chem.* 1996; **271**, 23623-23625.
- Van Hellemond JJ, Neuville P, Schwarz RT, Matthews KR, Mottram JC.** Isolation of *Trypanosoma brucei* CYC2 and CYC3 cyclin genes by rescue of a yeast G(1) cyclin mutant. Functional characterization of CYC2. *J Biol Chem.* 2000; **275**, 8315-23.
- Vassella E, Reuner B, Yutzy B, Boshart M.** Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J Cell Sci.* 1997; **110**, 2661-2671.
- Walter RD, Oppendoes FR.** Subcellular distribution of adenylate cyclase, cyclic-AMP phosphodiesterase, protein kinases and phosphoprotein phosphatase in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1982; **6**, 287-295.

- Walter RD. 3':5'-cyclic-AMP phosphodiesterase from *Trypanosoma gambiense*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1974; **355**, 1443-1450.
- Welton RM, Hoffman CS. Glucose monitoring in fission yeast via the Gpa2 galpha, the git5 Gbeta and the git3 putative glucose receptor. *Genetics.* 2000; **156**, 513-521.
- Whalin ME, Scammell JG, Strada SJ, Thompson WJ. Phosphodiesterase II, the cGMP-activatable cyclic nucleotide phosphodiesterase, regulates cyclic AMP metabolism in PC12 cells. *Mol Pharmacol.* 1991; **39**, 711-717.
- Whisnant RE, Gilman AG, Dessauer CW. Interaction of the two cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; **93**, 6621-6625.
- Wu Y, Deford J, Benjamin R, Lee MG, Ruben L. The gene family of EF-hand calcium-binding proteins from the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* 1994; **304**, 833-841.
- Wu Y, Haghighat NG, Ruben L. The predominant calcimedins from *Trypanosoma brucei* comprise a family of flagellar EF-hand calcium-binding proteins. *Biochem J.* 1992; **287**, 187-193.
- Wuttke MS, Buck J, Levin LR. Bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclase. *JOP.* 2001; **2**, 154-158.
- Xiong ZH, Ruben L. *Trypanosoma brucei*: the dynamics of calcium movement between the cytosol, nucleus, and mitochondrion of intact cells. *Exp Parasitol.* 1998; **88**, 231-239.
- Yakubu MA, Majumder S, Kierszenbaum F. Changes in *Trypanosoma cruzi* infectivity by treatments that affect calcium ion levels. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; **66**, 119-125.
- Yamawaki-Kataoka Y, Tamaoki T, Choe HR, Tanaka H, Kataoka T. Adenylate cyclases in yeast: a comparison of the genes from *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; **86**, 5693-5697.
- Yan SZ, Hahn D, Huang ZH, Tang WJ. Two cytoplasmic domains of mammalian adenylyl cyclase form a Gs alpha- and forskolin-activated enzyme in vitro. *J Biol Chem.* 1996; **271**, 10941-10945.
- Yarwood SJ, Steele MR, Scotland G, Houslay MD, Bolger GB. The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform. *J Biol Chem.* 1999; **274**, 14909-14917.
- Yoshida N, Favoreto S Jr, Ferreira AT, Manque PM. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz J Med Biol Res.* 2000; **33**, 269-278.
- Young D, Riggs M, Field J, Vojtek A, Broek D, Wigler M. The adenylyl cyclase gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; **86**, 7989-93.
- Yuasa K, Kotera J, Fujishige K, Michibata H, Sasaki T, Omori K. Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression. *J Biol Chem.* 2000; **275**, 31469-31479.
- Zaccolo M, Magalhaes P, Pozzan T. Compartmentalisation of cAMP and Ca(2+) signals. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; **14**, 160-166.

Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*. 2002; **295**, 1711-1715.

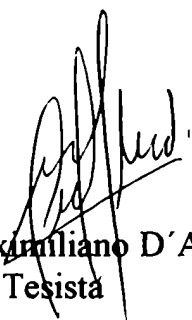
Zhang G, Liu Y, Ruoho AE, Hurley JH. Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature*. 1997; **386**, 247-253.

Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Ann Rev Microbiol*. 1994; **48**, 449–470.

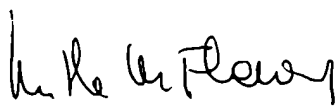
Zimmermann G, Zhou D, Taussig R. Mutations uncover a role for two magnesium ions in the catalytic mechanism of adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 1998; **273**, 19650-19655.

Zoraghi R, Kunz S, Gong K, Seebeck T. Characterization of TbPDE2A, a novel cyclic nucleotide-specific phosphodiesterase from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*. 2001; **276**, 11559-11566.

Zoraghi R, Seebeck T. The cAMP-specific phosphodiesterase TbPDE2C is an essential enzyme in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99**, 4343-4348.



Lic. Maximiliano D'Angelo
Tesisista



Dra. Mirtha M. Flawiá
Directora

Dra. Mirtha M. Flawiá
Profesor Titular
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
U.B.A.