



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA ARGININA
QUINASA Y LA NUCLEÓSIDO DIFOSFATO QUINASA
DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Mariana Reneé Miranda

Director de tesis: Dr. Claudio Alejandro Pereira

Laboratorio de Biología Molecular de *Trypanosoma cruzi*, Instituto de
Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, IDIM-UBA-CONICET

Buenos Aires, 2009

RESUMEN

Avances en el estudio de la arginina quinasa y nucleósido difosfato quinasa de *Trypanosoma cruzi*

La arginina quinasa y la nucleósido difosfato quinasa son fosfotransferasas que participan en la homeostasis energética intracelular. Se postula que ambas enzimas, junto con otras fosfotransferasas, participan en redes enzimáticas de fosfotransferencia comunicando los sitios de generación y consumo de ATP. En este trabajo se profundiza en la caracterización de la arginina quinasa y se aborda el estudio de las nucleósido difosfato quinasa de *Trypanosoma cruzi*, el parásito causante del Mal de Chagas. Se determinó la existencia de una única isoforma de arginina quinasa con un patrón de localización citosólica inusual como así también su participación en respuestas generalizadas a estrés. Se encontraron cuatro posibles genes de nucleósido difosfato quinasa en el genoma del parásito, de los cuales dos fueron validados. La isoforma canónica, localizó en la vacuola contráctil y podría estar involucrada en osmorregulación. Otra de las variantes, con dominio N-terminal DM10, localizó en el flagelo y en el citoesqueleto y podría proveer el GTP necesario para la polimerización de los microtúbulos. A su vez el dominio DM10 fue suficiente para dirigir a GFP hacia esas estructuras. Por primera vez, en este trabajo, las nucleósido difosfato quinasa son asociadas a tales posibles funciones. La presencia de muchas fosfotransferasas ubicadas en diferentes organelas y estructuras hace que *Trypanosoma cruzi* pueda ser tomado como organismo modelo para el estudio de las redes enzimáticas de fosfotransferencia, lo cual permitirá no sólo esclarecer los fenómenos que acontecen en torno a la distribución eficiente de la energía sino también establecer potenciales blancos para combatir al parásito y a la enfermedad.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, arginina quinasa, nucleósido difosfato quinasa, fosfotransferencia, Mal de Chagas, dominio DM10.

SUMMARY

Advances in the study of *Trypanosoma cruzi* arginine kinase and nucleoside diphosphate kinase

Arginine kinase and nucleoside diphosphate kinase are phosphotransferases participating in cellular energetic homeostasis. It was postulated that these enzymes, in addition to others, are components of a phosphotransference network that communicate ATP consuming and generating sites. In this work we continue studying the previously characterized arginine kinase and initiate the characterization of nucleoside diphosphate kinase from *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' Disease. Here it was shown a unique arginine kinase isoform with an unusual intracellular cytosolic location and its participation in global stress responses have been suggested. Four putative nucleoside diphosphate kinases genes were found in the parasite genome, two of them were validated as bona fide ones. The canonic isoform was localized in the contractile vacuole and suggesting a possible role in osmoregulation. The other isoform, containing an N-terminal DM10 domain, localized in the flagellum and cytoskeleton of the parasite and it could be providing GTP for microtubule assembly. In addition, the DM10 domain was sufficient to targeted GFP to these structures. This is the first report where nucleoside diphosphate kinases are associated to those possible functions. Such a number of phosphotransferases, distributed in different organelles and structures, makes *Trypanosoma cruzi* a good model for studying phosphotransference networks which will allow us not only to understand the intracellular efficient energy supply but also to establish potential targets for delivering drugs against the parasite.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, arginine kinase, nucleoside diphosphate kinase, phosphotransference, Chagas' Disease, DM10 domain.

AGRADECIMIENTOS

En este espacio, que no por reducido menos importante, voy a intentar manifestar mis agradecimientos a todas las personas que me ayudaron, directa o indirectamente, en la realización de este trabajo. Qué difícil tarea ésta!

Voy a empezar por los más importantes, por aquéllos que, al ritmo de la cumbia villera y demás sones, me proporcionaron las herramientas y los conocimientos necesarios para llegar hasta aquí:

A vos Claudio, gracias por darme la oportunidad de hacer mi doctorado en tu laboratorio, por ser jefe y amigo, por ser comprensivo y tolerar mis altibajos en estos cinco años.

A vos Berti, gracias por guiarme y motivarme, por tener las respuestas a mis preguntas, por estar siempre dispuesto...por ser mi amigo! Qué hubiera hecho sin tu ayuda!

A vos Gasman, gracias por ayudarme con las cuestiones computacionales, por aguantar mis malos humores, por ser simple y darle el toque de diversión al labo y también por ser mi amigo!

A vos, Mili, gracias por tu buena predisposición, por querer ayudarme siempre, por las fotos... por aportar otra parte femenina más al lab!

Quiero continuar con todos los que participaron involuntariamente en esta tesis, desde las personas que marcaron el comienzo de mi carrera hasta las que molesté una y otra vez por insumos, equipos, etc. etc. etc.:

A Roberto, gracias por haberme iniciado en este camino...no perdí mis horizontes!!
Gracias!

A las chicas del ATB team, Meli, Pao, Chele...a Faccone! Lo logré chicos!! Gracias por haberme enseñado tanto!!

A las chicas de arriba, Mónica, Fer, Cecílias, Sabri, Marina, Geor. Gracias por ser mis proveedoras, por salvarme siempre en el momento justo!! Gracias

Qué hubiera sido de esta tesis sin Silcho y Caro! Imposible expresar!! Mil gracias chicas!

A Jesi y Marga, que más allá de las cuestiones administrativas aportaron un plus extra al laboratorio, gracias!!

Antes de terminar quiero agradecer a los que me apoyaron psicológica y emocionalmente, a mis compañeros de vida:

A vos, Diego, mi amor, gracias por tu incondicionalidad, por bancarme en las buenas y en las malas, por estar siempre aún cuando no estoy.

A mis hermanos, Santi, Juancho, Gordis; a mis sobrinos, Martu, Sofi, Chanco, Anita, Lucki, Nico y Mati; a Alberto; a mis amigas, Mary, Naty, Lety, Kary, Chechu, Any. A Inés. Gracias!

Finalmente quiero agradecer a la Fundación YPF, por haberme becado y permitirme realizar mi doctorado. Gracias!

Espero no haberme olvidado de nadie y espero también haber logrado mi cometido: agradecerles a todos uds. a través de estas breves palabras llenas de sentimiento.

Gracias!!

Esta tesis fue financiada por el programa de becas de posgrado “José A. Estenssoro” de la Fundación YPF.

A mis papás,
Quique y Gogo

CONTENIDOS

Pag.

Sobre la presentación de esta tesis

ABREVIATURAS

SECCIÓN I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	2
El mal de Chagas	2
<i>Diagnóstico</i>	4
<i>Métodos de prevención y control de la enfermedad</i>	5
<i>Terapia</i>	6
<i>Perspectivas para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos</i>	7
<i>Trypanosoma cruzi</i> : Generalidades	7
<i>Clasificación taxonómica</i>	7
<i>El ciclo de vida</i>	9
<i>Estadios del ciclo de vida</i>	10
<i>Trypanosoma cruzi</i> : Biología, organización y estructura celular	11
<i>La superficie celular y el citoesqueleto</i>	12
<i>El flagelo</i>	12
<i>El bolsillo flagelar</i>	15
<i>Los glicosomas</i>	15
<i>La vacuola contráctil</i>	17
<i>Los reservosomas</i>	18
<i>Mitocondria y kinetoplasto</i>	19

<i>Trypanosoma cruzi</i> : Genética y Genómica	21
<i>Procesamiento del ARN</i>	22
<i>Edición del ARN</i>	22
<i>Herramientas para la manipulación genética de</i>	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	23
<i>Trypanosoma cruzi</i> : Metabolismo	24
<i>Generalidades</i>	24
<i>Metabolismo energético</i>	25
<i>Sistemas de regeneración rápida de ATP</i>	28
<i>Mecanismos de defensa contra estrés oxidativo</i>	28
Redes enzimáticas de fosfotransferencia y fosfotransferasas	31
2. OBJETIVOS	35
SECCION II	
3. LA ARGININA QUINASA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	38
Introducción	38
Resultados	43
<i>La arginina quinasa de T. cruzi y el estrés</i>	
<i>oxidativo</i>	43
<i>Estudio de las isoformas de la arginina quinasa de</i>	
<i>T. cruzi, expresión en el ciclo de vida y localización</i>	
<i>subcelular</i>	49
Discusión	57
4. LAS NUCLEÓSIDO DIFOSFATO QUINASAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	61
Introducción	61

Resultados	65
<i>Las nucleósido difosfato quinasas de T. cruzi</i>	65
<i>TcNDPK1: Estudio de una nueva actividad y localización subcelular</i>	72
<i>TcNDPK2: Estudio de la regulación de la expresión, modificación post-traducciona l y localización subcelular</i>	85
Discusión	98
5. DISCUSIÓN GENERAL	106
SECCIÓN III	
6. MATERIALES Y MÉTODOS	111
Técnicas analíticas generales	111
Técnicas bioquímicas	112
Técnicas de Biología Molecular	114
Manipulación de parásitos	118
Construcciones genéticas para <i>T. cruzi</i>	124
Inmunofluorescencia	127
Inmunocitoquímica	128
Análisis bioinformático	129
Oligonucleótidos	130
Plásmidos	131
Anticuerpos	133
Soluciones	133
Medios de cultivo	134

Cepas bacterianas	134
-------------------	-----

SECCIÓN IV

7. BIBLIOGRAFÍA	136
8. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS	160

Sobre la presentación de esta tesis

Decidí organizar este trabajo en diferentes secciones a fin de optimizar el manejo y la lectura de la información contenida.

La Sección I está constituida por una breve introducción sobre el Mal de Chagas y sobre la biología del parásito causante de la enfermedad, el *Trypanosoma cruzi*, como así también por algunos ítems teóricos relevantes para el entendimiento de esta tesis. Los objetivos están incluidos a continuación de dicha presentación.

En la Sección II están desarrollados los temas específicos que hicieron a este estudio: la arginina quinasa y las nucleósido difosfato quinasas de *Trypanosoma cruzi*; cada uno con su respectiva introducción, resultados y discusión, cerrando con una discusión general integradora.

En la Sección III están detallados los materiales y métodos utilizados y finalmente en la Sección IV, la bibliografía y las publicaciones relacionadas.

Mi intención es agilizar la lectura de la tesis y que aquéllas personas que entienden de tripanosomas puedan ir directamente a la Sección II sin perderse los puntos centrales.

ABREVIATURAS

aa aminoácido

AAT aspartato amino transferasa

AdK adenilato quinasa

AK arginina quinasa

BLAST *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA seroalbúmina bovina

BZL benznidazol

CK creatina quinasa

CZ cruzipaina

DAPI 4',6-Diamidino-2-fenilindol

DNTB dinitrotiocianobenceno

DTT ditioneitol

Endo H endoglicosilasa H

E-64 trans-epoxysuccinil-L-leucil-amido-(4-guanidino) butano

FITC isotiocianato de fluoresceína

G6PD glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

GDH glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺

GFP *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

HK hexoquinasa

HPLC cromatografía líquida de alta presión

IDH isocitrato deshidrogenasa

IPTG isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido

LB medio Luria-Bertani

LDH lactato deshidrogenasa

LIT *Liver infusion triptose* (medio a base de triptosa e infusión de hígado)

NDPK nucleósido difosfato quinasa

Nfx nifurtimox

NP-40 Nonidet P40

ORF *Open reading frame* (marco abierta de lectura)

PCR *Polimerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

PEP fosfoenolpiruvato

PFR *paraflagellar rod* (barra paraflagelar)

PK piruvato quinasa

PMSF fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PPasa pirofosfatasa vacuolar

ROS *reactive oxygen species* (especies reactivas de oxígeno)

SAP *shrimp alkaline phosphatase* (fosfatasa alcalina de camarón)

SL *spliced leader*

SDS dodecil sulfato sódico

SFB suero fetal bovino

STR/PEN estreptomicina/penicilina

TcAdK adenilato quinasa de *Trypanosoma cruzi*

TcAK arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi*

TcAQP acuaporina vacuolar de *Trypanosoma cruzi*

TcNDPK nucleósido difosfato quinasa de *Trypanosoma cruzi*

TLCK N α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona

T(SH)₂ tripanotión

WB *Western Blot*

WT *WildType* (genotipo salvaje)

X-Gal 5- bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactpiranósido

SECCIÓN I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El mal de Chagas

La enfermedad de Chagas, denominada así en reconocimiento a su descubridor Carlos Chagas, es una enfermedad parasitaria ampliamente distribuida en América causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Este mal es también conocido como de Chagas-Mazza en reconocimiento a Salvador Mazza, un médico sanitarista argentino que difundió la existencia de la enfermedad a nivel mundial y realizó numerosos estudios sobre su sintomatología y lesiones.

El Mal de Chagas o tripanosomiasis americana, es considerado una enfermedad endémica que prevalece mayoritariamente en las regiones rurales más pobres, en donde las condiciones de vida precarias facilitan la transmisión del parásito (Barrett *et al.*, 2003). El aislamiento de estas poblaciones dificulta su acceso al diagnóstico y el tratamiento. Esta enfermedad se extiende desde México e incluso también desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina. Se estima que afecta a 11-18 millones de personas, que causa 13.000 muertes por año y que 90 millones están en riesgo de ser infectados en toda América. En Argentina, se distribuye desde Jujuy hasta Chubut (Fig. 1) y hay casi tres millones de infectados (ALCHA, Asociación de Lucha contra el Mal de Chagas, <http://www.alcha.org.ar>).

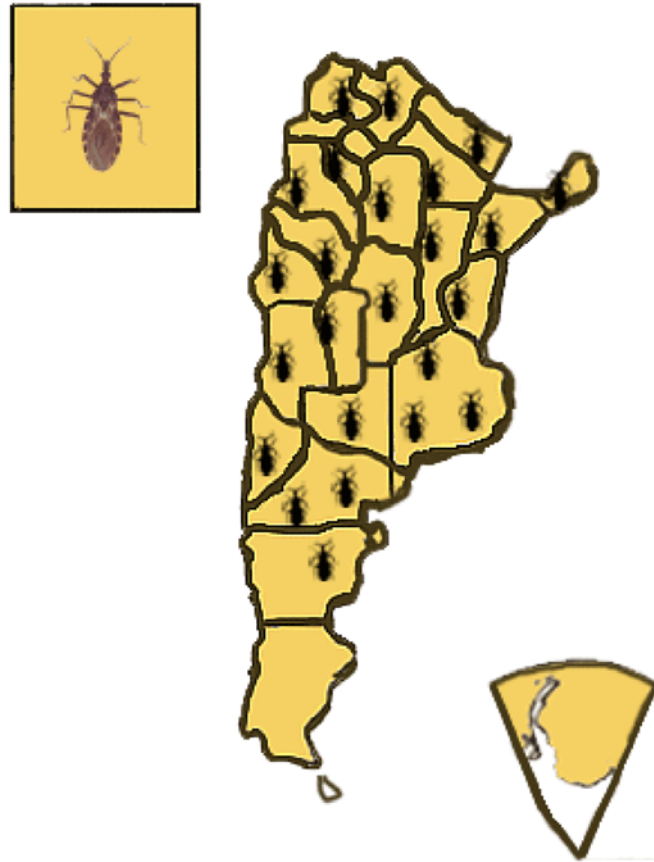


Figura 1: Área de dispersión de la enfermedad de Chagas en Argentina. Recuadro: foto de *Triatoma infestans*, vector transmisor del parásito en el país.

La enfermedad

El *Trypanosoma cruzi* es transmitido al hombre través de las heces de un insecto hematófago de la familia Reduviidae (vulgarmente conocido como vinchuca) (Fig. 1). El reservorio natural del parásito lo constituyen los armadillos, roedores, murciélagos y primates silvestres, además de ciertos animales domésticos como perros, gatos, ratas y cobayos. Si bien el insecto vector es el principal responsable de la transmisión de *T. cruzi* al hombre (80% de los casos), puede ocurrir también por transfusión de sangre contaminada, por la ingesta de alimentos contaminados con el parásito o verticalmente de la madre infectada al feto (Barrett et al., 2003).

La enfermedad de Chagas es una enfermedad crónica que sobrelleva diferentes estadios en su curso natural y es ocasionalmente fatal. Pueden distinguirse tres fases principales: aguda, intermedia y crónica.

El estado agudo presenta manifestaciones clínicas caracterizadas por inflamación edematosa en el sitio de la infección (Chagoma) y el signo de Romaña, que comienzan entre los 6 y 10 días post-infección y pueden permanecer de 1 a 2 meses. Dichos síntomas facilitan su diagnóstico, sin embargo, numerosos casos pasan desapercibidos por presentar síntomas generales como fiebre, linfadenopatías y rash cutáneo. Únicamente en esta etapa de la enfermedad los parásitos pueden detectarse en sangre periférica, una vez establecido el balance inmunológico entre el huésped y el parásito, el número de organismos circulantes disminuye sustancialmente haciéndose imposible el diagnóstico parasitológico directo. Luego de dicha etapa, la enfermedad pasa a ser asintomática, un 70- 85 % de los infectados continúan en ese estado por el resto de sus vidas (esta presentación es conocida como la forma indeterminada del Chagas crónico), mientras que un 30-25 % de los casos puede sufrir cardiopatías crónicas (miocardiopatía chagásica), lesiones digestivas (megaesófago y megacolon) o desórdenes neurológicos después de 10 a 25 años de la infección inicial (Barrett *et al.* 2003).

Diagnóstico

La enfermedad puede ser diagnosticada luego de la infección por la presencia de síntomas clínicos conocidos como Chagoma y signo de Romaña. Dentro de los dos primeros meses, la enfermedad también puede ser diagnosticada mediante análisis directo de sangre en donde puede observarse la presencia de tripomastigotes de *T. cruzi*. Dentro de este período también pueden emplearse el cultivo de sangre y análisis serológico para la determinación de la presencia de parásitos. Los tests de aglutinación sobre sueros de pacientes son suficientemente sensibles como para el diagnóstico de la fase aguda cuando el número de organismos infecciosos es escaso. Sin embargo, normalmente, los anticuerpos no se desarrollan hasta varios meses luego de la infección inicial imposibilitando la práctica de otras técnicas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la técnica de ELISA.

Otro método simple y práctico empleado es el xenodiagnóstico. Consiste en alimentar al triatomineo con sangre del paciente y luego de 2 a 3 semanas es disectado y examinado para la presencia de parásitos en el intestino.

Finalmente, herramientas más modernas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también están siendo utilizadas para el diagnóstico de rutina de la enfermedad (Bogitsh y Cheng, 1998). Recientemente se han normalizado los protocolos de diagnóstico por PCR a nivel mundial y se está implementando la estrategia de *real time PCR* (PCR en tiempo real) para el monitoreo y cuantificación de parásitos en pacientes enfermos (Duffy *et al.*, 2009).

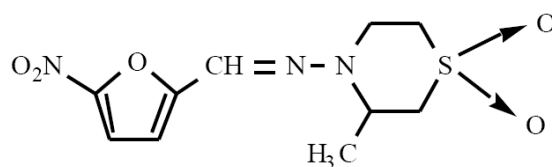
Métodos de prevención y control de la enfermedad

La ubicación de las áreas endémicas está relacionada con las condiciones que favorecen el contacto directo entre la población humana y el vector por un lado, y entre el insecto y los reservorios de la enfermedad en animales domésticos por el otro (Hoare, 1972). Como la epidemiología del Mal de Chagas está definida mayoritariamente por la distribución del insecto vector, los métodos de control se basan en la intervención sobre los mismos. Debido a que estos triatomíneos residen dentro de las grietas de los pisos y de las paredes de adobe y techos de paja de los ranchos rurales, el reemplazo de éstos por madera o chapa corrugada y pisos de piedra constituye una primera prevención. A su vez, el método más ampliamente utilizado es el control mediante el uso de insecticidas cuya aplicación consiste en el rociado, uso de pinturas domésticas con compuestos de liberación lenta o fumigaciones.

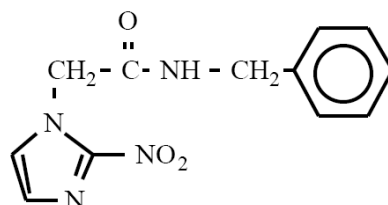
El empleo de insecticidas ha sido exitoso en Argentina y muchos otros países endémicos. Actualmente la enfermedad de Chagas aguda ha sido eliminada de muchas zonas rurales y los reportes estimados del número de infectados estaban en disminución (Barret *et al.*, 2003).

Terapia

La terapia para la enfermedad de Chagas ha dependido históricamente de dos drogas nitro-heterocíclicas, el nifurtimox (Lampit) y el benznidazol (Rochagan) (Fig. 2). El primero es un nitrofurano introducido en la década de 1960 para el tratamiento de la patología en el estado agudo, es una droga tripanocida, fundamentalmente para los parásitos circulantes, y es mejor tolerada en pacientes jóvenes. No está claro el mecanismo de acción de estos compuestos. Se asume que el nifurtimox actúa a través de una vía reductiva que lleva a la formación de radicales libres de oxígeno altamente tóxicos (Packchanian, 1957; Urbina, 2002). El benznidazol, por su parte, es un nitroimidazol que se dio a conocer en la década del 70, y su efecto se produciría a través de la unión a macromoléculas provocando daño a nivel del DNA entre otros (Urbina y Docampo, 2003). Debido a que los tratamientos con ambas drogas son prolongados, producen serios efectos secundarios, su eficacia es parcial y no son efectivos para el tratamiento del Chagas crónico; la necesidad de desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos se ha convertido en una problemática de carácter urgente para la comunidad científica (Barrett *et al.*, 2003).



NIFUTIMOX (LAMPIT[®])



BENZNIDAZOLE (ROCHAGAN[®])

Figura 2: Estructura química de las drogas utilizadas actualmente contra el Mal de Chagas. Nifurtimox: nitrofurano, benznidazol: nitroimidazol (Urbina, 2002).

Perspectivas para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos

Trypanosoma cruzi posee numerosas características estructurales y metabólicas que lo diferencian de sus hospedadores mamíferos. La identificación y caracterización de nuevas rutas metabólicas especialmente aquellas que se encuentren ausentes en mamíferos son el primer paso para el desarrollo de nuevas drogas terapéuticas. Desde hace más de 20 años una gran proporción de la investigación está dedicada a la identificación de nuevos blancos contra los cuales dirigir drogas. Entre éstos pueden mencionarse el metabolismo de tioles, metabolismo de lípidos y esteroides, la arquitectura de la membrana y los transportadores, el kinetoplasto y la edición del ARN, la regulación de la expresión nuclear de genes, los acidocalcisomas y el metabolismo energético del parásito.

La explotación de estas divergencias requiere de más trabajo y acción para que finalmente conduzca al desarrollo de nuevos compuestos clínicamente activos para el tratamiento del Mal de Chagas (Urbina, 1997).

Trypanosoma cruzi: Generalidades

Clasificación Taxonómica

Trypanosoma cruzi es un organismo eucariota unicelular. Taxonómicamente está ubicado dentro del subreino Protista, phylum Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, sección Estercoraria (Levine *et al.*, 1980) (Fig 3).

La familia Trypanosomatidae pertenece al orden Kinetoplástida. Todos los miembros de este orden se caracterizan por la presencia de una organela peculiar que los define: el kinetoplasto (ver más adelante en esta sección). En esta familia se agrupan diversos taxones monogenéticos y digenéticos que incluyen parásitos de plantas, invertebrados y vertebrados. Entre estos últimos se encuentran géneros con especies causantes de enfermedades, cuyos miembros más importantes son además de *T. cruzi*, *T. brucei* (rhodesiense y gambiense) y *Leishmania spp.* (Fig.3). Por esta

razón estos organismos se encuentran mayormente estudiados. A su vez, el género *Trypanosoma* comprende otros organismos patógenos de animales de ganado y que ocasionan grandes pérdidas económicas, entre éstos, *T. brucei brucei*, *T. vivax* y *T. congolense* (Fig. 3). A todos los integrantes de esta familia se los conoce en su conjunto como tripanosomátidos (Simpson *et al.*, 2006).

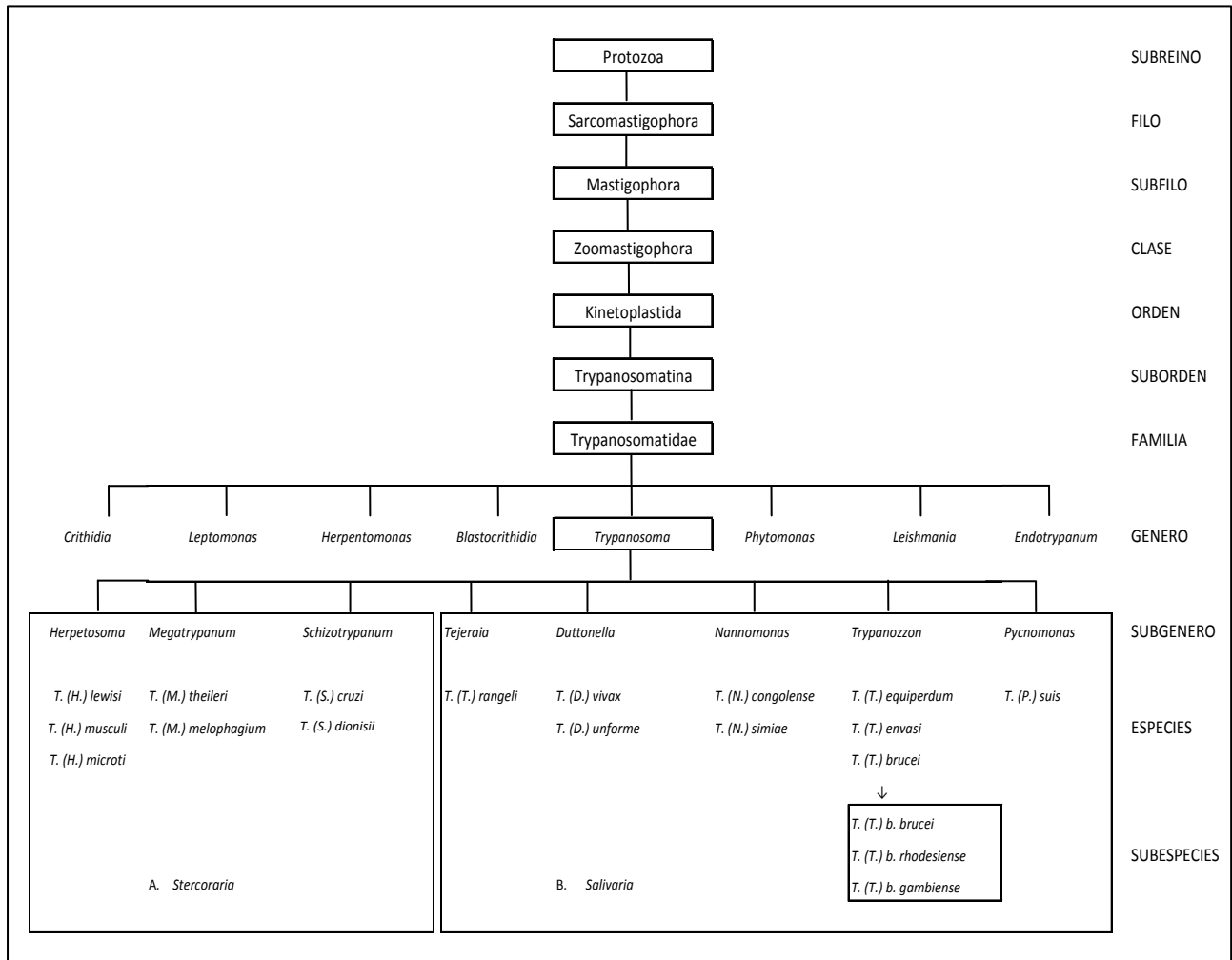


Figura 3: Ubicación taxonómica de *Trypanosoma cruzi*

La especie *Trypanosoma cruzi* está constituida por una población genéticamente heterogénea (Brenner, 1973). Diferentes estudios basados en el análisis de isoenzimas, *riboprinting*, secuenciación de genes de mini-exón y marcadores de microsatélites proveyeron evidencias de que *T. cruzi* es una especie formada por dos subgrupos genéticos altamente divergentes designados como linaje I y II. El linaje I está

constituido por cepas que raramente se encuentran en pacientes humanos y, por lo tanto, no parece estar asociado con la sintomatología de la enfermedad de Chagas. En cambio, algunas de las cepas incluidas el linaje II son causantes de esta enfermedad

La cepa CL Brener es la utilizada en este estudio y pertenece al subgrupo IIe. Esta fue elegida para la secuenciación del genoma de *T. cruzi* por ser la más caracterizada, sin embargo posteriormente se cuestionó dicha elección ya que se trata de un híbrido entre los linajes I y II, lo que genera diferencias considerables entre los alelos de cada haplotipo (El-Sayed *et al.*, 2005).

El ciclo de vida

T. cruzi es un parásito digenético, es decir que tiene dos hospedadores distintos durante su ciclo de vida. El hospedador que funciona como vector es un insecto hematófago, perteneciente a la familia Reduviidae, cuya especie *Triatoma infestans* es la más común en Argentina.

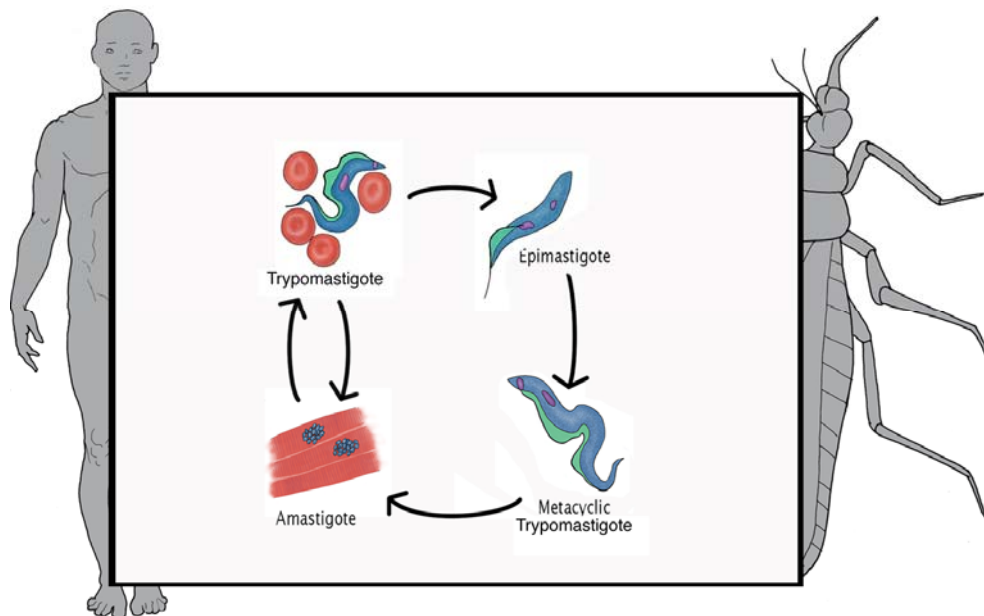


Figura 4: Esquema simplificado del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Izquierda: estadios dentro de la vinchuca, epimastigote (replicativo, no infeccioso) y tripomastigote metacíclico (no replicativo, infeccioso). Derecha: estadios dentro del vertebrado, tripomastigote sanguíneo (no replicativo, infeccioso) y amastigote (replicativo, no infeccioso) (Adaptado de Atwood *et al.*, 2005).

El parásito es ingerido por el insecto vector a partir de un humano o animal infectado junto con la sangre, ingresa al tracto digestivo donde se diferencia al estadio epimastigote que se multiplica por fisión binaria formando un reservorio de parásitos en este hospedador (Fig. 4). Los epimastigotes migran por el tracto digestivo hasta llegar al recto donde se adhieren y diferencian a tripomastigotes metacíclicos, que son liberados con las heces cuando el insecto se alimenta. Esta última forma es la que inicia la infección en el humano ingresando al organismo por las mucosas o heridas en la piel. Cuando ingresa a la célula se diferencia a amastigote, se multiplica por fisión binaria y posteriormente se diferencia a tripomastigote sanguíneo. Esta forma es liberada cuando la célula hospedadora se lisa llegando a la sangre pudiendo invadir otras células o ser ingerido nuevamente por el vector cerrando el ciclo de vida (Fig. 4) (Tyler y Engman, 2001).—Existe además un sub-ciclo alternativo que se establece cuando las formas amastigote, provenientes de la ruptura prematura de la célula hospedadora o por diferenciación extracelular a tripomastigote, son englobados por macrófagos, donde pueden sobrevivir y completar el ciclo intracelular.

Estadios del ciclo de vida

T. cruzi presenta un ciclo de vida complejo que se caracteriza por la presencia de tres estadios principales que pueden ser fácilmente identificados por técnicas de microscopía según criterios morfológicos como la presencia de flagelo y posición relativa del kinetoplasto respecto del núcleo (Brenner, 1973):

Amastigote: forma redondeada, con flagelo corto, replicativo y de localización intracelular (Fig. 5). Numerosos estudios demostraron que pueden ser infectivos para células de vertebrados (de Souza, 2002).

Epimastigote: forma alargada de 20-40 μM de largo, flagelada, replicativa. Kinetoplasto de localización anterior al núcleo (Fig. 5). Se encuentra en el intestino del hospedador invertebrado y también puede ser observado dentro de células de vertebrados al final del ciclo intracelular y en la fase logarítmica de crecimiento en cultivos axénicos (de Souza, 2002).

Tripomastigote: forma alargada de 25 μM de largo, flagelada, no replicativa, infectiva. Kinetoplasto de localización posterior al núcleo (Fig. 5). Se encuentra en los

tejidos y en la sangre del hospedador vertebrado, en el intestino posterior, heces y orina del invertebrado, en la fase estacionaria de crecimiento en cultivos axénicos y en fase líquida de cultivos celulares. Se denomina tripomastigote sanguíneos a las formas circulantes en el vertebrado y metacíclicos a las formas infectivas en el invertebrado. (de Souza, 2002).

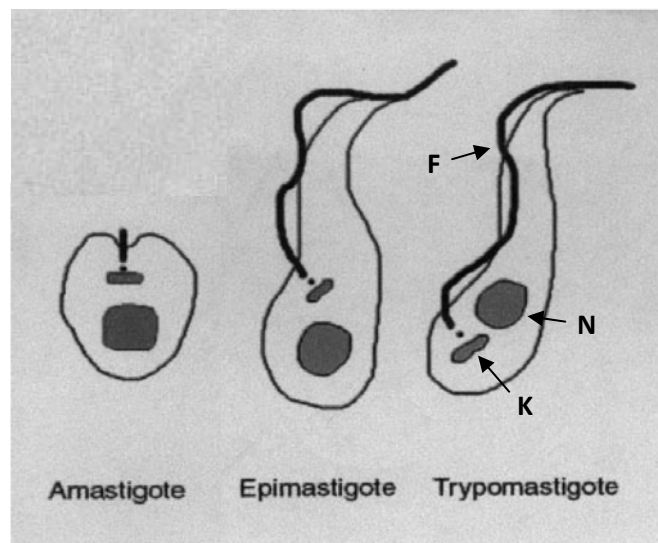


Figura 5: Esquema de los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*, definidas por la forma, presencia de flagelo (F), posición del núcleo (N) y kinetoplasto (K) (Adaptado de Gull, 1999)

***Trypanosoma cruzi*: biología, organización y estructura celular**

Los protozoos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae difieren de muchas otras células eucariotas por contener estructuras citoplasmáticas y organelas especiales. Una característica en común es la presencia del mitocondrion y el glicosoma además del mencionado kinetoplasto. Asimismo la presencia de varias estructuras inusuales del citoesqueleto y su particular genética hacen que estos organismos no sólo sean estudiados por su carácter patogénico sino también por su interesante biología. A continuación se hará una descripción breve de la biología, organización y estructura celular de *T. cruzi*.

La superficie celular y el citoesqueleto

El citoesqueleto de estos organismos está caracterizado por la presencia de una capa de microtúbulos localizados por debajo de la membrana plasmática denominados microtúbulos subpeliculares (Fig. 6). Estos microtúbulos, constituidos por heterodímeros de alfa y beta tubulina, están fuertemente conectados entre sí y con la membrana plasmática a través de filamentos cortos. Esta estructura está altamente organizada y constituye una malla que le otorga rigidez y forma a la célula. Algunas organelas como el kinetoplasto, mitocondria, cuerpo basal y flagelo se encuentran asociados a esta estructura organizada y, como se indicó anteriormente, las posiciones de las mismas constituyen marcadores de diferenciación en el ciclo de vida (Gull, 1999). El citoesqueleto cumple un rol fundamental en la división celular.

La membrana plasmática junto con la capa de microtúbulos subpeliculares conforma la superficie celular, que a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de las células eucariotas, la asociación de estos dos componentes es tan fuerte que permanecen unidos aún luego de la lisis celular y la purificación de fracciones enriquecidas en membranas (de Souza, 2002). La membrana, si bien es una estructura continua, presenta diferencias morfológicas y de composición que permiten dividirla en tres dominios: la membrana del cuerpo del parásito, la membrana del flagelo y la membrana del bolsillo flagelar (Fig. 6 A). Cada uno de estos dominios representa una membrana altamente especializada con funciones distintivas y composición proteica y lipídica única (Landfear y Ignatushchenko, 2001).

El flagelo

T. cruzi contiene un único flagelo que emerge desde una invaginación de la membrana plasmática llamada bolsillo flagelar y recorre todo el parásito. El flagelo está adherido al cuerpo celular en su mayor parte y se encuentra en estrecho contacto con la membrana plasmática en estructuras definidas como zonas de adhesión a flagelo (FAZ) (Fig. 6B).

El flagelo de *T. cruzi* está formado por un axonema de estructura clásica, evolutivamente conservado, que exhibe el patrón de 9 pares de microtúbulos

periféricos y un par central (9+2). Morfológicamente presenta los componentes convencionales de los axonemas tales como los brazos internos y externos de dineinas, los filamentos radiales y las nexinas (Fig. 6B y C). Dentro de este flagelo existe una segunda estructura larga y filamentosa que acompaña al axonema, conocida como barra paraflagelar (PFR) y encontrada únicamente en los flagelos de 3 protistas: los kinetoplástidos, euglenoides y dinoflagelados. Esta PFR recorre el axonema de *T. cruzi* desde el punto de donde emerge el flagelo en el bolsillo flagelar hasta la punta distal, mantiene una posición constante respecto de éste y ambos se encuentran físicamente conectados a través de fibras (Bastin *et al.*, 2000). Dicha conexión es muy estable y resiste a procesos de purificación de flagelos como al uso de detergentes no iónicos, tratamiento con altas concentraciones de sal y shock hipotónico. Si bien la PFR es una estructura compleja sólo han sido identificadas 4 proteínas mayoritarias en su composición, PAR1-4 (Fouts *et al.*, 1998).

El flagelo de los tripanosomátidos es considerado una organela multifuncional que cumple muchos roles críticos, algunos bien establecidos y otros descriptos recientemente. El flagelo ha sido conocido por largo tiempo por su participación en la movilidad del parásito la cual está involucrada tanto en la patogénesis de la enfermedad como en la transmisión. A su vez el flagelo y la movilidad flagelar son importantes en otros procesos como morfogénesis, división celular y evasión del sistema inmune (Ralston y Hill, 2008).

El mecanismo por el cual las proteínas son llevadas a esta organela de estos parásitos no está esclarecido, al parecer no hay señales o secuencias de localización universales. Se ha descrito en *T. brucei* que el tripéptido histidina-leucina-alanina (HLA) ubicado hacia el C-terminal de proteínas del citoesqueleto es esencial para su direccionamiento al flagelo (Bastin y Gull, 1999; Ersfeld y Gull 2000) y que extensiones N-terminal diferentes conducen a adenilato quinasas a la PFR (Pullen *et al.*, 2004). A su vez en *T. cruzi* se identificó un mecanismo de direccionamiento a la membrana del flagelo dependiente de calcio, miristoilación y palmitoilación (Godsel y Engman, 1999).

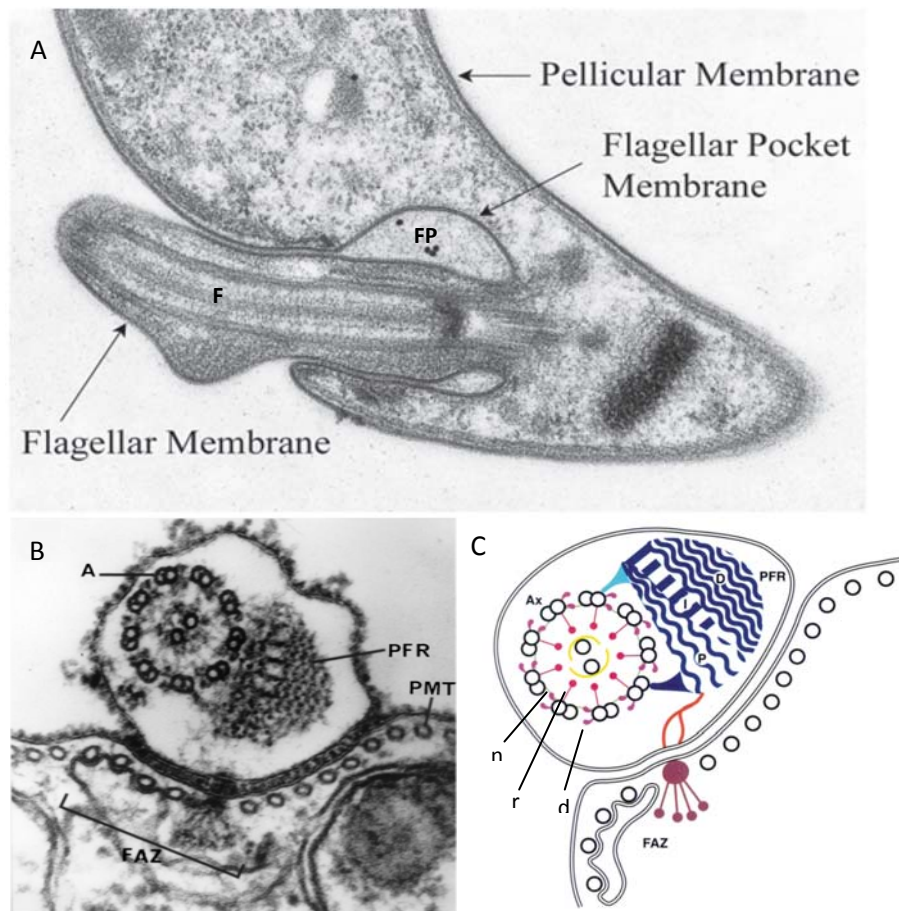


Figura 6: A) Micrografía electrónica ilustrando los tres dominios de la membrana plasmática: membrana del cuerpo celular (pelicular), membrana del bolsillo flagelar y membrana flagelar (Bloodgood, 2000). B) Sección transversal del flagelo mostrando los 9 pares de microtúbulos y el par central (Gull, 1999). C) Representación esquemática de los componentes flagelares (Bastin *et al.* 2000). FP: bolsillo flagelar; F: flagelo; A o Ax: axonema (n, nexinas; r, filamentos radiales; d, brazos internos y externos de dineínas); PFR: barra paraflagelar (D, I, P indican las regiones de la PFR distal, intermedia y próxima respecto del axonema); PMT: microtúbulos subpeliculares; FAZ: zona de adhesión al flagelo.

Diversos análisis genéticos y bioquímicos mostraron un sorprendente grado de similitud estructural y metabólica entre el flagelo del espermatozoide de mamíferos y el de estos tripanosomátidos. El hecho que estos últimos organismos sean fácilmente cultivables y genéticamente modificables (principalmente *T. brucei*), a diferencia del espermatozoide, se ha planteado la posibilidad de usarlos como sistemas modelos para explorar la funcionalidad de ambas estructuras coordinadamente (Oberholzer *et*

al., 2007) e identificar proteínas humanas que causan deficiencias en cilias y flagelos causando enfermedades (Baron *et al.*, 2007).

El bolsillo flagelar

El bolsillo flagelar es una invaginación profunda de la membrana plasmática localizado en la base del flagelo (Figs. 6A, 8A y 8C). Esta depresión permite el contacto directo entre la membrana del cuerpo celular y la membrana del flagelo y por esta razón el bolsillo flagelar es considerado como un compartimento extracelular especial aislado del medio externo. La membrana del bolsillo es una región altamente especializada, difiere en composición y distribución de proteínas con respecto al resto de las membranas y carece de microtúbulos subpeliculares (Fig. 6A). Es el único sitio conocido hasta el momento por donde se llevan a cabo los procesos endocitosis y exocitosis (Landfear y Ignatushchenko, 2001).

Los glicosomas

Los glicosomas son organelas presentes únicamente en los organismos kinetoplástidos. Son de forma esférica, rodeados por una única membrana y distribuidos por todo el citoplasma del parásito (Fig. 7). Se cree que estas organelas tienen un origen evolutivo en común con los peroxisomas y glioxisomas debido a que poseen características morfológicas y algunas vías metabólicas en común.

La característica más importante de los glicosomas es en éstas se encuentran localizadas las siete primeras enzimas de la vía glicolítica como así también enzimas correspondientes a la vía de salvataje de purinas, de las pentosas fosfato, de la biosíntesis de pirimidinas y de la gluconeogénesis. En estas organelas también se lleva a cabo la β -oxidación de ácidos grasos y es posible encontrar enzimas involucradas en el metabolismo de peróxidos. Esta compartimentalización de los metabolismos le otorga a las enzimas características bioquímicas y de regulación particulares (Parsons *et al.*, 2001).

La membrana glicosomal posee baja permeabilidad a la mayor parte de los metabolitos de manera tal que el pasaje de los mismos a través de dicha membrana es realizada por medio de moléculas transportadoras. Las proteínas localizadas en el lumen de esta organela están codificadas por genes nucleares y por lo tanto una vez sintetizadas en el citosol deben ser transportadas hacia las mismas. Los mecanismos de internalización de proteínas hacia la matriz glicosomal consisten en el reconocimiento de una secuencia señal presente en la proteína por parte de receptores citoplasmáticos (Parsons *et al.*, 2001). Se han identificado dos tipos de señales denominadas *Peroxisomal Targeting Signal* (PTS). Una de ellas, PTS1 es un tripéptido C-terminal cuya secuencia canónica es Ser, Lys, Leu (SKL) (Neuberguer *et al.*, 2003; Blattner *et al.*, 1992). El otro tipo de señal se denomina PTS2 y se trata de un nonapéptido ubicado en la región amino terminal de las proteínas con bastante plasticidad ya que tan solo unos pocos aminoácidos se encuentran estrictamente conservados (Blattner *et al.*, 1995). Por último, está siendo considerada la posibilidad de la existencia de señales internas de reclutamiento de proteínas hacia la matriz glicosomal



Figura 7: Microscopía electrónica mostrando un grupo de 5 glicosomas (G) en el citoplasma. K: kintoplasto (Opperdoes *et al.*, 1984).

Los acidocalcisomas

Los acidocalcisomas son organelas ácidas descritas por primera vez en los tripanosomátidos pero que posteriormente también fueron identificados en diversos organismos. Son estructuras esféricas que se caracterizan por estar rodeados por una única membrana (Fig. 8) y por poseer una matriz con altas concentraciones de fósforo en la forma de pirofosfato (PPi) y polifosfatos de cadena larga y corta y los elementos Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} y Zn^{2+} (Docampo y Moreno, 1999). En la membrana de este compartimento se han encontrado dos bombas de protones, una H^+ -ATPasa y una pirofosfatasa translocadora de protones de tipo vacuolar ($\text{V-H}^+\text{PPasa}$), una Ca^{2+} -ATPasa y una acuaporina (Montalvetti *et al.*, 2004). Existen diferentes teorías sobre las posibles funciones que puede desempeñar esta organela. En primer lugar se postula un posible rol en el almacenamiento de Ca^{2+} estadio-dependiente ya que se sabe que este catión se encuentra involucrado en los procesos de invasión, señalización y diferenciación; por otro lado, debido a altas concentraciones de PPi que contiene, podría estar participando en el almacenamiento de energía; por último, otro posible rol es que estuviera involucrado en la regulación del pH citosólico o control de la osmorregulación. Esta última hipótesis ha sido fuertemente sustentada por observaciones recientes (Rohloff *et al.*, 2004).

La vacuola contráctil

La vacuola contráctil es una organela involucrada en la regulación de la osmolaridad y volumen celular (Rohloff y Docampo, 2008). Esta vacuola es en realidad un complejo y está compuesta por dos compartimentos cercanos, el espongioma y la vacuola principal (Fig. 8). El espongioma está formado por numerosas vesículas y túbulos, en la membrana contiene una bomba H^+ -ATPasa que provee el gradiente de protones para el transporte de agua y puede fusionarse únicamente a la vacuola principal. La vacuola principal a su vez, constituye un reservorio de agua y es capaz de unirse a la membrana plasmática en la zona del bolsillo flagelar. El nombre de este sistema se debe a que periódicamente este segundo componente ejerce movimientos contráctiles expulsando agua. Recientemente se ha descrito la presencia de

acuaporinas en este complejo, también presente en los acidocalcisosmas sugiriéndose una participación conjunta de estas organelas en la osmorregulación (Rohloff *et al.*, 2004).

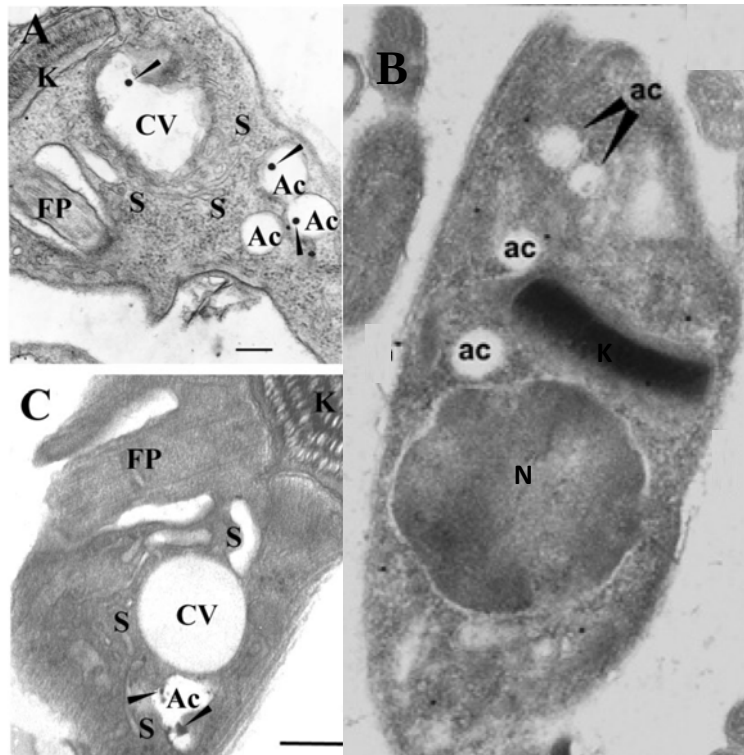


Figura 8: Microscopía electrónica de transmisión de cortes de epimastigotes de *T. cruzi* donde se muestran el complejo de la vacuola contráctil (A y C) y los acidocalcisosmas (A, B y C). Las flechas en A y C indican la presencia del mismo material electrodenso en los acidolcacisonas y vacuola contráctil. CV: vacuola contráctil; S: espongioma; FP: bolsillo flagelar; Ac: acidocalcisosmas; K: kinetoplasto; N: núcleo (Montalvetti *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2005).

Los reservosomas

Los reservosomas son compartimentos grandes y esféricos presentes en la región posterior de la forma epimastigote (Fig. 9), encontrados únicamente en miembros del subgénero *Schizotrypanum* del género *Trypanosoma*.

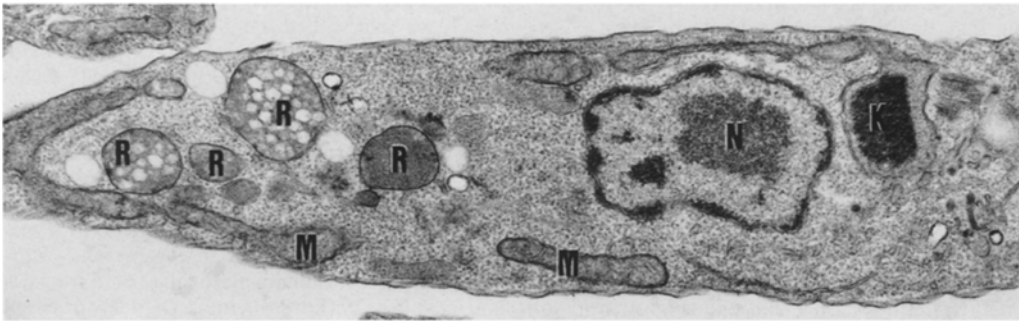


Figura 9: Corte longitudinal de un epimastigote. La mayoría de los reservosomas (R) son encontrados entre el núcleo (N) y la región posterior del parásito. Pueden observarse las inclusiones lipídicas como regiones más claras dentro de la organela. K: kinetoplasto; M: mitocondrion (Soares y de Souza, 1991).

Están rodeados por una membrana y contienen inclusiones de lípidos en forma de cristales y proteínas; su nombre se debe a que en estas organelas se almacenan macromoléculas ingeridas por el parásito a través de procesos endocíticos a modo de reserva para su futuro uso. Si bien aún no se conocen todas sus funciones, los reservosomas son compartimentos ácidos, presentan características de pre-lisosomas y lisosomas y acumulan grandes cantidades de cruzipaina, la principal enzima proteolítica de *T. cruzi* (Cunha-e-Silva *et al.*, 2006). En su membrana se ha encontrado una bomba de protones ATPasa, responsable de su acidificación (Vieira *et al.*, 2005). Además, estudios de ultraestructura, indicaron la presencia de vesículas y membranas internas (Sant'Anna *et al.*, 2008). Hasta hace poco tiempo, los reservosomas habían sido observados únicamente en el estadio epimastigote, sin embargo organelas relacionadas fueron recientemente encontradas en tripomastigotes y amastigotes (Sant'Anna *et al.*, 2008).

Mitocondria y kinetoplasto

T. cruzi, al igual que los otros miembros de la familia trypanosomatidae, posee una única mitocondria grande y ramificada que se extiende a lo largo de todo el cuerpo celular del parásito conocida como mitocondrion (Fig. 10 A y B).

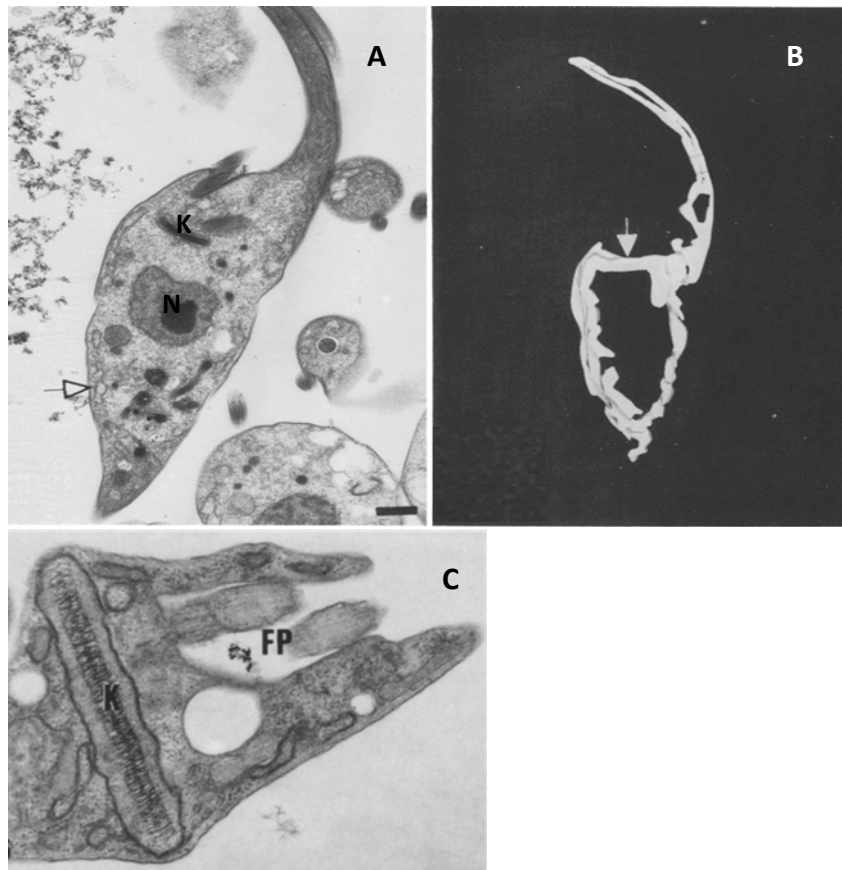


Figura 10: Corte longitudinal de un epimastigote de *T. cruzi* evidenciando el extenso retículo mitocondrial (A, flecha) y el kinetoplasto (C). **B)** Modelo del mitocondrion de *T. cruzi*, la flecha indica la posición del kinetoplasto. N: núcleo, K: kinetoplasto, PF: bolsillo flagelar (Paulin, 1975; Soares y de Souza, 1991).

La mitocondria de estos organismos contiene ADN que se encuentra formando una estructura compleja denominada kinetoplasto (Fig. 10 C). El kinetoplasto es una intrincada red de ADNs circulares concatenados conocidos como mini y maxi círculos y representa el 20 - 25 % del ADN total del parásito (Shapiro y Englund, 1995). En este material genético existen miles de minicírculos de aproximadamente 1440 pb y cerca de 30 maxicírculos con un tamaño comparable al ADN mitocondrial de otras células eucariotas, en estos últimos están codificados componentes mitocondriales como ARNrs y subunidades de la cadena respiratoria (de Souza, 2002). En el kinetoplasto también están codificados genes que participan en un proceso conocido como edición del ARN mitocondrial (ver más adelante en esta sección).

***Trypanosoma cruzi*: Genética y genómica**

Los proyectos genoma de tripanosomátidos comenzaron a organizarse y tomar impulso en la década del 90. El proyecto “Tritryp”, que comprendía los parásitos *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major*, comenzó en el año 2000 y concluyó en el 2005. Participaron diferentes organizaciones que financiaron el proyecto y los centros de secuenciación del *Sanger Institute* y *The Institute for Genomic Research* (TIGR). En el caso particular del *T. cruzi* el proyecto incluyó un análisis proteómico que abarcó los cuatro estadios del ciclo de vida del parásito. Se identificaron 22570 genes que codifican para proteínas y aproximadamente la mitad del genoma está cubierto por secuencias repetitivas. Finalmente, de los datos obtenidos se pudieron realizar predicciones de todo el metaboloma de estos tripanosomátidos. Todas estas secuencias se encuentran disponibles en las bases de datos GeneDB y TcruziDB, además de las bases genéricas como el NCBI. Si bien el proyecto genoma de *T. cruzi* todavía presenta deficiencias, los datos aportados sin duda marcaron un hito en la investigación de estos parásitos.

T. cruzi posee un genoma diploide estimado en aproximadamente 106,4 Mb (El-Sayed *et al.*, 2005). Diferentes análisis de densitometría y electroforesis de campo pulsante han permitido identificar 55 cromosomas en *T. cruzi*, aunque existen variaciones entre cepas (Branche *et al.*, 2006).

Procesamiento del ARN

Los tripanosomátidos presentan una regulación genética particular, considerada como atípica y excepcional en el reino eucariota. Los genes nucleares de estos organismos carecen de promotores típicos para la ARN polimerasa II, se han descrito tan sólo unos pocos ejemplos de los mismos (Clayton, 2002). Los ARNm son expresados como largas unidades policistrónicas compuestas por genes no relacionados separados entre sí por cortas secuencias denominadas secuencias

intergénicas. Los transcriptos primarios así generados son posteriormente procesados a ARNm maduros individuales mediante un proceso llamado *trans-splicing*. El *trans-splicing* es un mecanismo de corte y pegado e involucra la adición de una cola de adeninas en el 3' de los transcriptos (poli-adenilación) y el agregado de 39 nucleótidos estrictamente conservados, denominados mini-exón o *spliced leader* (SL) en el extremo 5' (Liang *et al.*, 2003; revisado en Vazquez, 2007). Tanto la poliadenilación como el *capping* pueden no llevarse a cabo en un lugar fijo de la región intergénica, sino que pueden ocurrir en varios lugares dentro de un espacio acotado de la misma, influenciados por la presencia de trectos de polipirimidinas que interaccionan con aquellas proteínas involucradas en el proceso. Estas posiciones alternativas para el procesamiento de los mensajeros primarios hacen que existan distintos ARNm, con diferentes longitudes de regiones no codificantes, para un mismo gen. Estas variaciones serían potencialmente importantes para la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos, ya que debido a la ausencia de sitios de iniciación de la transcripción, la regulación de la expresión de genes está controlada post-transcripcionalmente por un mecanismo que involucra estabilización o desestabilización de los ARNm (Vanhamme y Pays, 1995). En algunos pocos casos, se ha reportado la presencia de intrones y de *cis-splicing* (Mair *et al.*, 2000; Ivens *et al.*, 2005), demostrando que ambos procesos coexisten en tripanosomas como ocurre en otros organismos capaces de realizar *trans-splicing*.

Edición del ARN

Un proceso interesante que llevan a cabo estos organismos es el edición del ARN mitocondrial en el cual participan algunos productos de la expresión de genes codificados en el kinetoplasto. Esta edición consiste en la remodelación de ARNm mediante la adición o remoción de residuos de uridina para dar transcriptos maduros que puedan ser posteriormente traducidos. Este proceso es un mecanismo complejo, la especificidad está determinada por la presencia de ARNs complementarios que actúan mayoritariamente en *trans*, y sólo en algunos casos en *cis*, y que guían a la

maquinaria enzimática a los sitios específicos donde deben llevarse a cabo las inserciones o deleciones de residuos de uridina (Simpson *et al.*, 2003).

Debido a que este es un proceso único para los tripanosomátidos, aquellas enzimas involucradas en el mismo son potenciales blancos para el desarrollo de nuevas drogas.

Herramientas para la manipulación genética de Trypanosoma cruzi

Durante las últimas décadas fueron introducidas algunas herramientas para la manipulación genética de los tripanosomátidos. Las mismas incluyen estrategias para investigar la función de genes por pérdida o ganancia de la misma y para estudiar la localización subcelular *in vivo* de su producto mediante la marcación o fusión a proteínas marcadoras como la proteína verde fluorescente (GFP).

Una de las herramientas más poderosa disponible para el estudio de la función de genes es el *knockdown* por ARN de interferencia o ARNi (Beverley, 2003). Esta técnica fue exitosamente establecida para *T. brucei* pero no para *T. cruzi* por carecer de enzimas claves de esta maquinaria. Esta limitación hizo que los análisis recayeran exclusivamente en técnicas dificultosas y lentas tales como la generación de parásitos *knock-out* o dominantes negativos. El primer vector difundido de transfección para *T. cruzi* disponible fue el pTEX (Kelly *et al.*, 1992), el cual no lleva promotor pero contiene las secuencias intergénicas correspondientes a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPDH) flanqueando el sitio de clonado y un marcador de resistencia para neomicina. Este vector es mantenido como episoma circular. Un segundo vector de expresión para *T. cruzi*, el pRIBOTEX, fue desarrollado a partir del pTEX al cual se le adicionó un promotor ribosomal fuerte para ARNpol I (Martínez-Calvillo *et al.*, 1997). Por último, un tercer vector, el pTRES (Vázquez y Levin, 1999), incorporó una señal fuerte de tran-splicing río abajo del promotor ribosomal denominada HX1 (Ver Materiales y Métodos, pag. 131).

Estos dos últimos vectores son insertados espontáneamente en el locus ribosomal. Los tres vectores son sistemas de expresión constitutiva, obteniéndose niveles elevados de sobre-expresión con el pRIBOTEX en comparación con el pTEX y a su vez, la presencia del HX1 en el pTRES hace que su expresión sea aún mucho mayor. Los

sistemas de expresión inducible para *T. cruzi* como el pTcINDEX (Taylor y Kelly, 2006) mostraron resultados muy variables entre los distintos grupos que lo utilizaron. En este momento nuestro laboratorio está trabajando en el desarrollo de un nuevo grupo de vectores concebidos originalmente para la expresión de genes de manera constitutiva e inducible con distintos marcadores de selección (Bouvier, comunicación oral).

***Trypanosoma cruzi*: Metabolismo**

Generalidades

Estos organismos protozoarios, en millones de años de adaptación al parasitismo, fueron reemplazando muchas rutas metabólicas de biosíntesis por sistemas de transporte de metabolitos desde el medio extracelular. En consecuencia, en muchas vías la disponibilidad de sustratos e intermediarios dependen exclusivamente de estos procesos de transporte (Pereira *et al.* 2008).

La glucosa es la principal fuente de carbono para algunos estadios de este parásito y es importada desde el ambiente extracelular debido a que *T. cruzi* no contiene reservas intracelulares de la misma, tales como glucógeno o almidón. Parte del metabolismo también está basado en la utilización de aminoácidos no sólo como fuente de carbono sino también como reservorio de energía; los aminoácidos pueden ser obtenidos por biosíntesis a partir de precursores metabólicos, transporte activo y degradación de proteínas. Las proteínas pueden ser internalizadas desde el medio y almacenadas en los reservosomas (Soares y de Souza, 1988). Se sabe que *T. cruzi* requiere principalmente de prolina, sin embargo también es capaz de utilizar asparragina, glutamina, glutamato, leucina e isoleucina (Bringaud *et al.*, 2006; Zeledon, 1960; revisado en Pereira *et al.*, 2008). Estos parásitos carecen de las enzimas para la síntesis de todos los aminoácidos esenciales para humanos (Berriman *et al.*, 2005)

Una característica del metabolismo de *T. cruzi* es la compartimentalización de la maquinaria responsable de la glicólisis entre el citoplasma y el glicosoma (Oppendoes y Borst, 1977). Como se mencionó anteriormente, en los glicosomas se encuentran las

primeras enzimas responsables de la glicólisis, desde la hexoquinasa a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Fig. 11). Se propuso que dicha compartimentalización podría constituir una alternativa evolutiva para regular el flujo glicolítico al nivel del transporte de la glucosa desde el citoplasma a la organela (Bakker *et al.*, 1999).

El ciclo de las pentosas fosfato es otro metabolismo que está presente en estos parásitos. Se ha demostrado su funcionalidad en epimastigotes y se ha reportado la presencia de todas las enzimas en los diferentes estadios. Se postula que esta vía provee del NADPH necesario para los sistemas redox y para diversos procesos biosintéticos (Maugeri y Cazzulo, 2004).

El metabolismo de ácidos grasos también ha sido estudiado. El análisis de los genomas de los tripanosomátidos *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major* (Trityps) mostró que serían capaces de sintetizar ácidos grasos y oxidarlos a través de la β -oxidación (van Hellemond y Tielens, 2006; Berriman *et al.*, 2005). Además, en estos organismos se ha reportado un mecanismo especializado para la síntesis de los mismos lo cual parece ser una adaptación a la vida parasítica (Lee *et al.*, 2007).

La secuenciación del genoma también permitió confirmar que los tripanosomátidos son incapaces de sintetizar purinas de novo por la ausencia de 9 de los 10 genes requeridos en esta vía metabólica. A su vez, estos organismos presentan un gran número de transportadores de nucleobases y nucleósidos además de numerosas enzimas para la interconversión de purinas y nucleósidos y contienen también todas las enzimas para la síntesis de novo de pirimidinas (Berriman *et al.*, 2005).

Metabolismo energético

T. cruzi durante su ciclo de vida enfrenta diferentes ambientes a los cuales debe responder mediante cambios morfológicos y metabólicos, adaptando su metabolismo energético a la disponibilidad de fuentes de carbono presentes. En su ambiente natural, los tripomastigotes utilizan glucosa, que es abundante en la sangre del hospedador vertebrado; los epimastigotes dependen del catabolismo de aminoácidos con preferencia por prolina e histidina (*T. cruzi* es el único tripanosomátido que tiene la capacidad de utilizar este último; Atwood *et al.*, 2005) que junto con otros aminoácidos constituyen los fluidos tisulares y la hemolinfa del insecto vector; los

amastigotes, que residen en el citoplasma de las células, al tener acceso rápido a azúcares fosforilados desarrollaron un metabolismo basado en la glucosa (Cannata y Cazzulo, 1984). Sin embargo, todas las formas adaptativas prefieren glucosa cuando crecen en un medio de cultivo rico, incluyendo aquéllos en los cuales este compuesto no es una fuente de carbono natural (Bringaud *et al.* 2006).

En cultivo, *T. cruzi* oxida glucosa y aminoácidos parcialmente a CO₂ excretando al medio succinato, piruvato, alanina y acetato mediante un proceso conocido como Fermentación aeróbica (Fig. 11). A pesar de que la maquinaria enzimática para el metabolismo oxidativo (ciclo de Krebs y cadena respiratoria) está presente en todos los estadios, el ATP es producido mayoritariamente por fosforilación a nivel de sustrato (Fig. 11) (Darling *et al.*, 1987; Tielens y van Hellemond, 1998). La razón del desarrollo de esta estrategia metabólica no está clara, se postula que sería una consecuencia directa de la capacidad de generar flujos glicolíticos altos suficientes para el abastecimiento de ATP mediante dicho proceso (Bringaud *et al.*, 2006).

Por otro lado, *T. cruzi* cuenta con numerosas fosfotransferasas (Bouvier *et al.*, 2006), importantes para el balance energético celular. Las adenilato quinasas (AdK, $ATP + AMP \leftrightarrow 2 ADP$) y las nucleósido difosfato quinasas (NDPK, $ATP + NDP \leftrightarrow ADP + NTP$) interconvierten nucleótidos entre sí transfiriendo los grupos fosfatos y generando a la vez moléculas de ATP. La transferencia de fosfatos catalizada por las AdKs duplica el potencial energético del ATP, proveyendo de esta manera una fuente adicional de energía (Dzeja *et al.*, 1996, 1999).

Por último, en *T. cruzi* también se identificaron los acidocalcisomas (Docampo y Moreno, 1999), organelas que almacenan grandes cantidades de polifosfato. Estas moléculas son polímeros lineales de residuos de ortofosfatos unidos por enlaces de alta energía que podrían tener un rol importante en la generación de energía y el control del metabolismo celular por su habilidad para acomplejarse con cationes y proteínas (Hunneken y Whiteley, 1960). La presencia de polifosfatos en estas organelas sugiere que podrían estar asociadas a la reserva de energía.

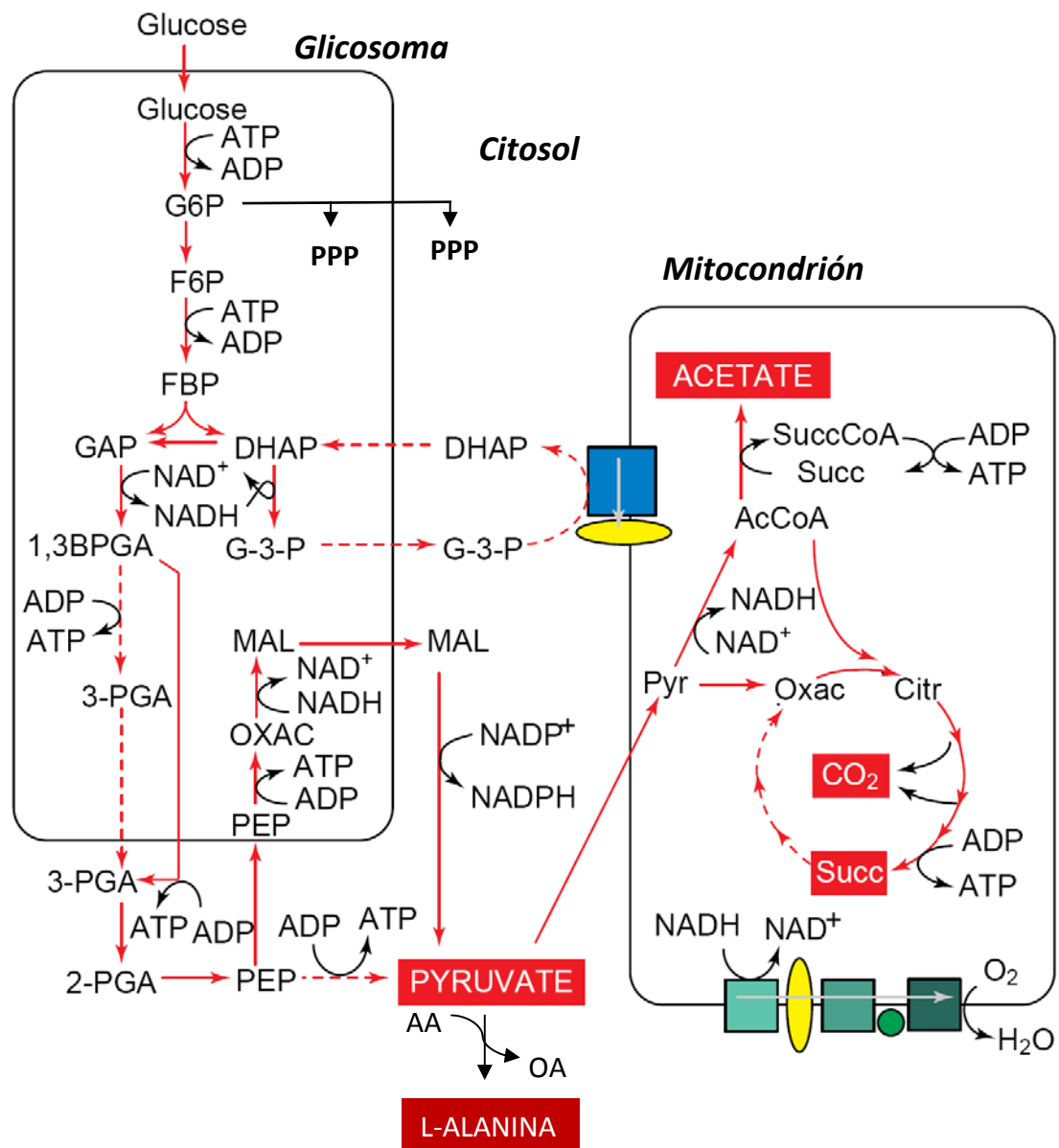


Figura 11: Esquema del principal camino de degradación de la glucosa en el estadio dentro del insecto en *T. cruzi* y *T. brucei*. En rojo se resaltan los productos del metabolismo excretados al medio. Las líneas punteadas indican vías menores. En azul y en verde se muestran los componentes de la cadena respiratoria, en amarillo, ubiquinona/ubiquinol. Los compartimentos glicosoma y mitocondria como así también la conexión con la vía de las pentosas fosfato (PPP) está indicada. Abreviaturas: G6P, glucosa 6-fosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; FBP, fructosa 2,6-bisfosfato; GAP, gliceraldehído 3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; 1,3 BPGA, 1,3-bisfosfoglicerato; G3P, glicerol 3-fosfato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; 2PGA, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; OXAC, oxalacetato; MAL, malato; Pyr, piruvato; AcCoA, acetilCoA; Succ, succinato; Succ-CoA, succinil-CoA; Citr, citrato; AA, aminoácido; OA, oxoácido (Adaptado de Tielens y van Hellemod, 1998; Bringaud *et al.* 2006).

Sistemas de generación rápida de ATP

T. cruzi cuenta con un sistema de generación rápida de ATP basado en el fosfógeno fosfoarginina. La fosfoarginina, que consiste en la arginina en su forma fosforilada, puede ser utilizada como reservorio de energía, cuando la célula se encuentra en situaciones de alta demanda energética el fosfato de alta energía puede ser transferido rápidamente al ADP para regenerar ATP. Este sistema es particularmente relevante ya que los tripanosomátidos carecen de sustancias de reserva en forma de hidratos de carbono y esta ruta metabólica se encuentra completamente ausente en mamíferos (Pereira *et al.*, 2000). La enzima responsable de esta vía es la arginina quinasa de la cual se hablará en profundidad en la Sección II, punto 3.

Mecanismos de defensa contra estrés oxidativo

El metabolismo aeróbico utiliza oxígeno molecular como aceptor final en diferentes sistemas de transporte de electrones, como ser aquellos presentes en la mitocondria, donde el oxígeno es reducido por cuatro electrones a dos moléculas de agua. Sin embargo, también puede ser parcialmente reducido generándose las denominadas especies reactivas del oxígeno (ROS) que son altamente inestables, y pueden provocar daño celular. De esta manera mediante la reducción univalente, divalente y trivalente del oxígeno molecular se generan anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) respectivamente. En condiciones normales, dentro de la célula estas especies son mantenidas en concentraciones constantes y relativamente bajas por sistemas enzimáticos y moléculas antioxidantes de bajo peso molecular (Turrens, 2004), como las superóxido dismutasas (SOD), que transforman el anión superóxido en peróxido de hidrógeno; las catalasas, que convierten el peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular y agua, y las peroxidasas dependientes de glutatión (glutatión peroxidasas), que reducen el peróxido de hidrógeno mediante el poder reductor del glutatión (Fig. 12 A). A su vez, las vitaminas E y C, ácido úrico, ubiquinona y cisteína constituyen otras defensas antioxidantes no enzimáticas.

La mayor parte de los protozoarios parásitos son células aeróbicas y viven en medios oxigenados. *T. cruzi* no sólo está expuesto a especies reactivas del oxígeno

provenientes de su propio metabolismo sino también a las generadas por la respuesta inmune del hospedador. A diferencia de los mamíferos, este parásito (y los demás tripanosomátidos) carece de los clásicos sistemas de detoxificación basados en las catalasas y las glutatión peroxidasas (Fig. 12 A). En su reemplazo, posee un sistema anti-oxidante distribuido entre todos los compartimentos subcelulares que es activo frente a un amplio rango de oxidantes. *T. cruzi* cuenta con cuatro SOD dependientes de hierro, encontradas también en bacterias y cloroplastos, que difieren de las Cu-Zn SOD y Mn-SOD de las células eucariotas, y con 5 peroxidasas dependientes de tripanotión. En estos organismos, el glutatión es reemplazado por el tripanotión, un tiol de bajo peso molecular constituido por dos moléculas de glutatión unidas por una de espermidina (N1-N8 bis-glutationilespermidina, $[T(SH)_2]$) (Fairlamb y Cerami, 1992) (Fig. 12 B). Dos de las peroxidasas, corresponden a las denominadas triparredoxina peroxidasas (TXNPx) por ser reducidas por la triparredoxina, una proteína de los tripanosomátidos intermediaria en la cascada de reducción. Otras dos de las peroxidasas (GPx-I y GPx-II), son homólogas a las de glutatión peroxidasas de mamíferos, pero a diferencia de éstas contienen cisteína en lugar de selenocisteína. La quinta peroxidasa (APx) es dependiente de ascorbato, encontrada también en plantas (Wilkinson *et al.*, 2000, 2002; revisado en Irigoín *et al.*, 2008). Debido a que el tripanotión es el compuesto central en el metabolismo redox y está ausente en células eucariotas, las enzimas involucradas en su metabolismo son consideradas blancos para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. Ejemplos de ello son la enzima responsable de su síntesis (tripanotión sintasa) y la de mantenerlo en su estado reducido (tripanotión reductasa) (Fig. 12 B y C) (Schmidt y Krauth-Siegel, 2002).

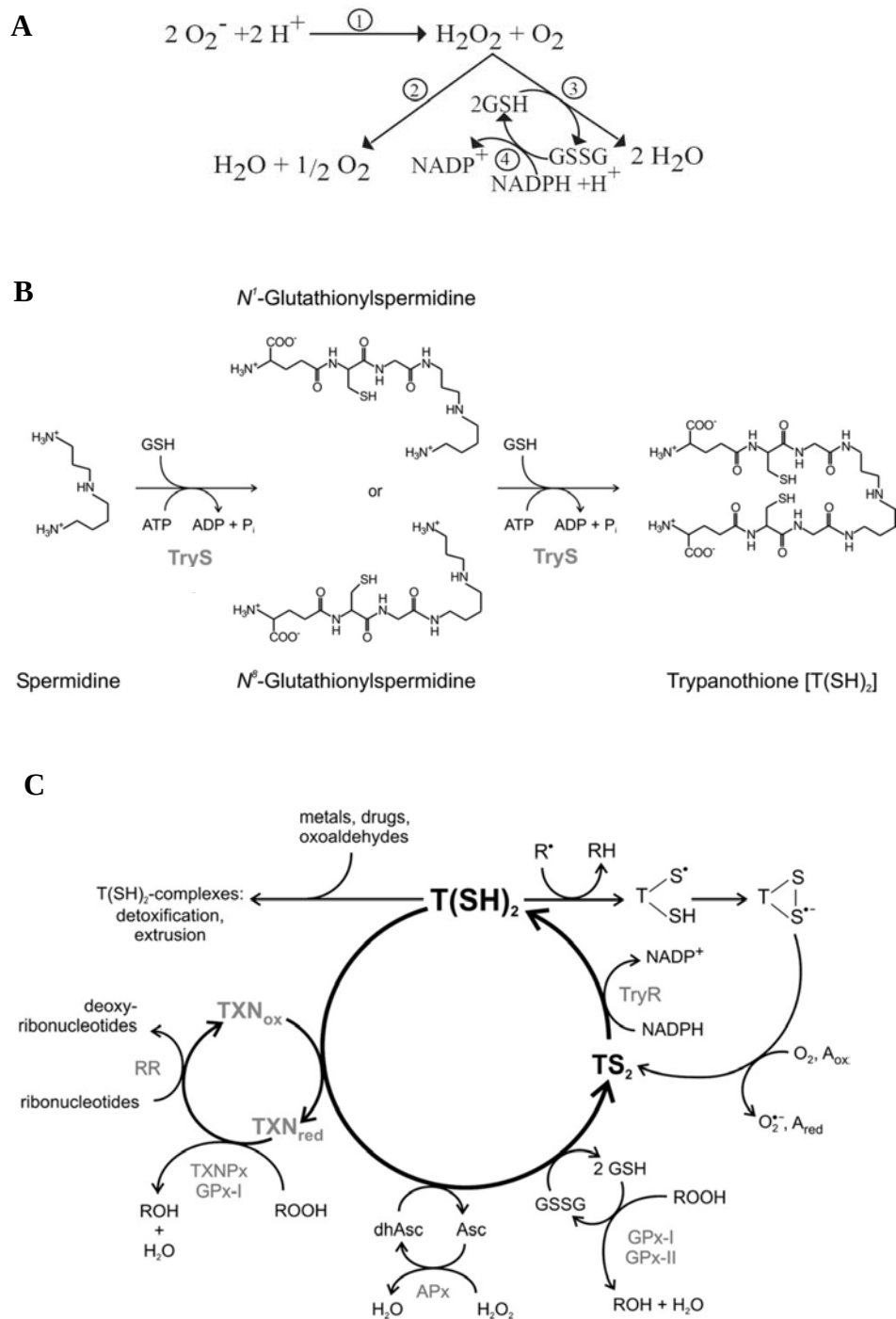


Figura 12: Mecanismo de defensa contra estrés oxidativo. A) Reacciones enzimáticas antioxidantes presentes en células de mamíferos: 1) Cu,Zn Superóxido dismutasa y Mn-Superóxido dismutasa; 2) catalasa; 3) Glutación peroxidasa; 4) Glutación reductasa, GSH: glutación reducido, GSSG: glutación oxidado. B) Biosíntesis de tripanotión [T(SH)₂] en *T. cruzi*. La síntesis es catalizada por la tripanotión sintetasa (TryS) en dos pasos consecutivos consumiéndose en el proceso completo dos moléculas de ATP. C) Reacciones dependientes de tripanotión en *T. cruzi*. El tripanotión es mantenido en su forma

reducida por el NADPH en una reacción catalizada por la tripanotión reductasa (TryR), luego el $T(SH)_2$ directamente reduce triparredoxin (TXN), dehidroascorbato (dhAsc) a ascorbato (Asc), glutatión disulfuro (GSSG- forma oxidada) a glutatión (GSH- forma reducida). Mediante estos intermediarios el $T(SH)_2$ participa en la síntesis de desoxirribonucleótidos y descomposición de peróxidos; también puede interaccionar directamente con oxoaldehídos, drogas y metales detoxificándolos. $T(SH)_2$ puede reaccionar con radicales ($R^\cdot$) capturándolos o en reacciones de reparación que conducen a la formación transitoria de radical tripanotión. RR: ribonucleótido reductasa, ROOH: hidroperóxidos, A: oxidante de un electrón, TXNPx: triparredoxín peroxidasa, GPx-I y GPx-II: triparredoxín peroxidasa I y II parecidas a las glutatión peroxidasa, APx: peroxidasa dependiente de ascorbato (Irigoín *et al.* 2008).

Por último, otro tipo de tioles encontrados en tripanosomátidos pero no en células de mamíferos, son los ovotioles. Estos compuestos son mercaptohistidinas, inicialmente detectadas en huevos y ovarios de invertebrados marinos. Constituyen una familia de tres miembros, ovotiol A, B y C que difieren entre sí por el número de sustituyentes presentes en el grupo amino. Actúan como detoxificantes no enzimáticos de peróxido de hidrógeno y radicales libres. En tripanosomátidos se ha detectado la presencia del ovotiol A (N1-metil-4-mercaptohistidina) en todos los estadios del ciclo de vida del parásito y se ha propuesto que dicho compuesto es reducido no enzimáticamente por el tripanotión (Ariyanayagam y Fairlamb, 2001). En todos los casos, los equivalentes reductores provienen del NADPH el cual es reciclado mediante la vía de las pentosas fosfato. Las numerosas diferencias existentes entre este sistema redox lo convierte en un posible blanco de quimioterapia.

Redes de fosfotransferencia y fosfotransferasas

El manejo óptimo de la bioenergética celular requiere que las moléculas de ATP sean producidas y llevadas hasta los sitios de consumo de manera efectiva. La difusión es un proceso lento e ineficiente termodinámica y cinéticamente ya que las células requerirían de gradientes muy altos de concentración que resultarían en la inhibición por producto final de las enzimas involucradas. Es claro, entonces, que la difusión no podría ser el único mecanismo responsable de la transferencia del ATP. Como las distancias a recorrer son críticas, se ha reportado que diferentes procesos como

formación de corrientes citoplasmáticas y posicionamiento y movimiento de la mitocondria contribuyen en la comunicación energética. Sin embargo, todos estos rearrreglos siguen siendo insuficientes. Surge así la idea de las llamadas redes enzimáticas intracelulares que serían responsables de la comunicación entre los procesos espacialmente separados de consumo y producción de ATP (ej; transporte activo en membrana plasmática y fosforilación oxidativa en mitocondria) (Dzeja y Terzic, 2003). Se supone que estas redes están compuestas por diversas fosfotransferasas como la creatina quinasa (CK), adenilato quinasa (AdK), nucleósido difosfato quinasa (NDPK), anhidrasa carbónica y enzimas glicolíticas (Fig. 13 y 14). De esta manera la célula utilizaría enzimas para promover la llegada de ATP y la remoción de los productos de hidrólisis del mismo (H^+ , ADP, Pi) sustentando así la eficiente utilización de la energía (Fig. 13). Estas enzimas que están cerca del equilibrio facilitarían la transferencia del ligando entre compartimentos celulares mediante el desplazamiento rápido de dicho equilibrio estableciendo una comunicación integrada y dinámica. Conceptualmente la transferencia de energía fue propuesta como un “cable de adenilato” (Dzeja y Terzic, 2003).

T. cruzi puede ser tomado como organismo modelo para el estudio de estas redes enzimáticas de fosfotransferencia. En primer lugar es un organismo unicelular con un metabolismo muy compartimentalizado, contiene diversas organelas y estructuras, algunas no presentes en otros organismos (Ej. glicosoma, reservosoma, flagelo, kinetoplasto); en segundo lugar, como se mencionó anteriormente, este parásito presenta numerosas fosfotransferasas como la AdK y la NDPK y contiene además una enzima análoga a la CK de mamíferos que es la arginina quinasa (AK). Se han descrito seis isoformas de AdK, las cuales todas son expresadas en el estadio epimastigote y presentan diferente localización subcelular: citoplasma, glicosoma y flagelo (Bouvier *et al.*, 2006). A su vez una posible séptima isoforma parecería ser nuclear. También se ha purificado y caracterizado una isoforma soluble de NDPK (Ulloa *et al.*, 2005) y una de AK (Pereira *et al.*, 2000). La presencia de esta gran variedad de fosfotransferasas y de isoformas de las mismas, todas expresadas al mismo tiempo en una misma célula, con localización distribuida en todo el cuerpo celular y compartimentos, es coherente con

la existencia de estas redes de transferencia de energía y permiten tomar a *T. cruzi* como modelo para su estudio.

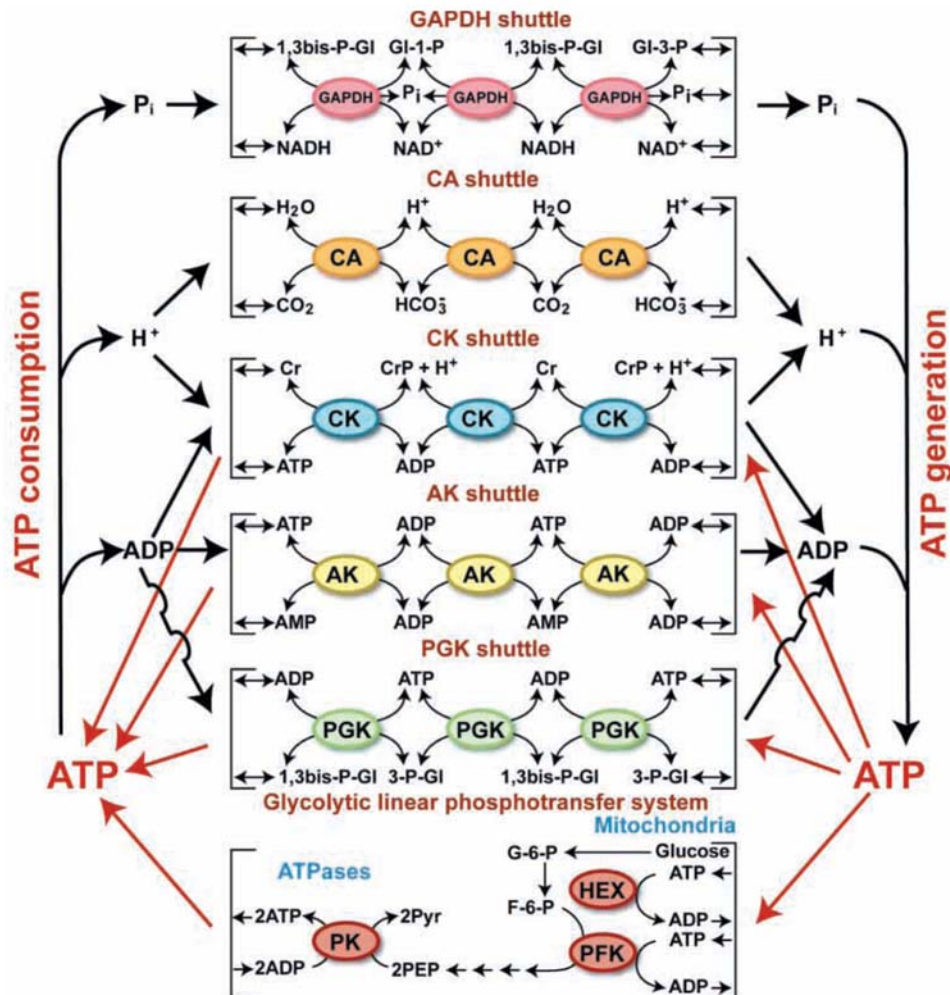


Figura 13: Esquema de una red enzimática de fosfotransferencia en células de mamíferos: comunicación integrada entre los sitios de utilización y generación de ATP. Las células utilizan *shuttles* enzimáticos para promover la llegada del ATP y remoción de los productos de la ATPasa, ADP, Pi y H⁺, para sustentar la eficiente utilización de la energía. Los *shuttles* comprenden enzimas cercanas al equilibrio capaces de facilitar la transferencia del ligando entre compartimentos celulares mediante el rápido desplazamiento del equilibrio. El ATP es llevado a través de la creatina quinasa (CK), adenilato quinasa (AK) y enzimas glicolíticas que incluyen a la hexoquinasa (Hex), piruvato quinasa (PK) y 3-fosfoglicerato quinasa (PGK). El ADP es removido por la CK, AK y PGK. La transferencia del Pi es catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el H⁺ es removido por la CK y la anhidrasa carbónica (CA). Gl: glucosa, PEP: fosfoenolpiruvato, Pyr: piruvato, Cr: creatina (Dzeja y Terzic, 2003).

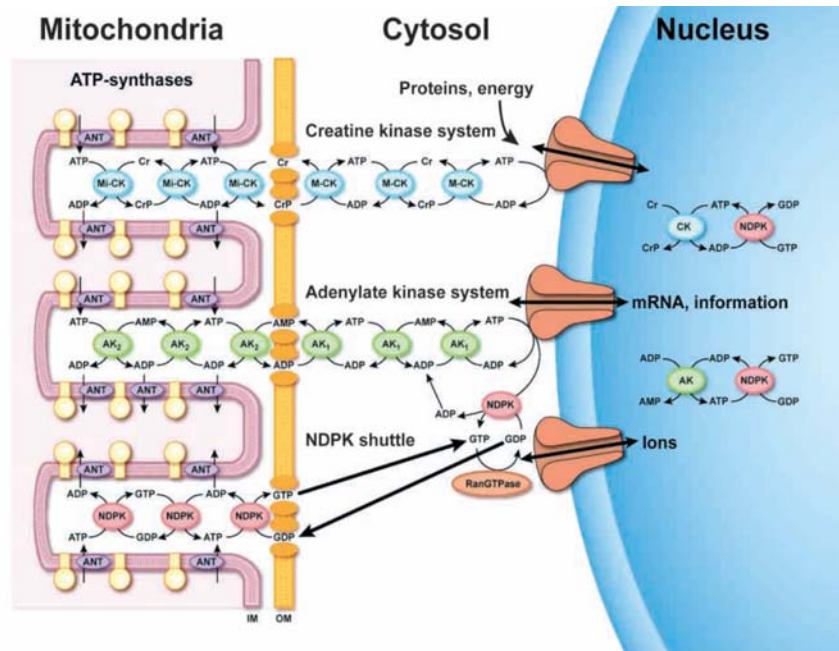


Figura 14: Esquema de una comunicación nucleocitoplasmática. La exportación del ATP desde el espacio intermembrana mitocondrial es facilitado por reacciones catalizadas por isoformas mitocondriales de adenilato quinasa (AK₂), creatina quinasa (Mi-CK) y nucleósido difosfato quinasa (NDPK). Subsecuentemente los fosforilos de alta energía son transportados a través del espacio perinuclear a los sitios de consumo de ATP en la envoltura nuclear y dentro del núcleo mediante las isoformas citosólicas y nucleares de AK, CK y NDPK. ANT: translocador de nucleótidos de adenina (Dzeja y Terzic, 2003).

2. OBJETIVOS

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico del Mal de Chagas, una enfermedad que constituye un serio problema sanitario en las Américas. Debido a que hace más de tres décadas que no hay desarrollo de nuevas drogas, la búsqueda de alternativas terapéuticas debe ser considerada como una necesidad prioritaria en nuestro país. La **hipótesis central** de este trabajo es que las rutas involucradas en el metabolismo energético, a través de reacciones de fosfotransferencia, son potenciales blancos terapéuticos contra el Mal de Chagas ya que presentan diferencias significativas con sus equivalentes en mamíferos e intervienen en procesos vitales para el parásito.

La arginina quinasa es una fosfotransferasa cuya función es mantener los niveles fisiológicos de ATP en condiciones de alto consumo de energía y se encuentra completamente ausente en mamíferos. La nucleósido difosfato quinasa, cataliza la transferencia de fosfatos desde nucleósidos trifosfato a nucleósidos difosfato, incluyendo la formación de ATP a partir de ADP y presenta diferencias estructurales y funcionales con los sistemas análogos de los hospedadores.

El **objetivo general** de este trabajo se enmarca en la identificación y caracterización funcional de estos grupos de enzimas en *Trypanosoma cruzi*.

De acuerdo a lo mencionado, se plantearon dos **objetivos específicos** y su desarrollo constituye las dos partes que conforman este trabajo de tesis.

El **primer objetivo** fue completar el estudio de la **arginina quinasa** de *T. cruzi*, avanzando en la determinación de isoformas, localización subcelular y participación en respuestas a estrés oxidativo.

El **segundo objetivo** fue iniciar la caracterización de las **nucleósido difosfato quinasa** de *T. cruzi* mediante la identificación de las diferentes isoformas, expresión y análisis funcional de las mismas.

El estudio individual de las nucleósido difosfato quinasas, la arginina quinasa y otras fosfotransferasas constituye el punto de partida para introducirnos en el estudio de redes enzimáticas de fosfotransferencia en *T. cruzi* el cual, no sólo nos ayudará a

comprender los posibles circuitos intracelulares de distribución de la energía, sino también a establecer potenciales blancos para combatir al parásito y a la enfermedad de Chagas.

SECCIÓN II

3. LA ARGININA QUINASA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Introducción

Además de mantener el balance entre el consumo y la síntesis de ATP, las células deben sostener la homeostasis energética a tiempos cortos por vías más rápidas que la glucólisis, glucogenólisis o fosforilación oxidativa, de manera de evitar señales de alarma que puedan atentar contra su viabilidad. Tales situaciones están presentes en células que experimentan grandes gastos de energía en tiempos muy cortos, como por ejemplo las neuronas y el músculo esquelético. Las células animales han desarrollado un sistema elaborado de balance de ATP basado en fosfágeno quinasa que mantienen la homeostasis de ATP durante situaciones de altas y fluctuantes demandas de energía. Los fosfágenos son compuestos que contienen grupos guanidinos (Fig. 16 A) y junto a sus correspondientes quinasa, son colectivamente clasificados como sistemas de fosfágeno quinasa (Sauer y Schlattner, 2004). Estos sistemas además de proveer un *buffer* energético espacio-temporal, mantienen el pH intracelular y capturan cantidades importantes de fosfato inorgánico (Fig. 15).

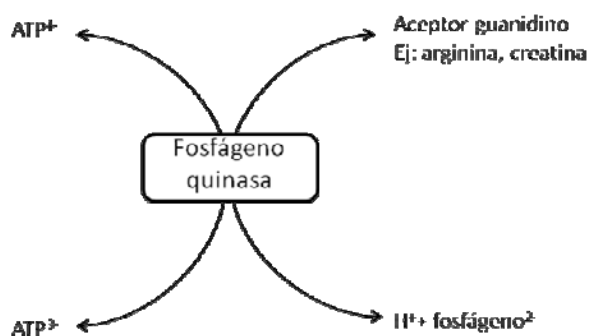
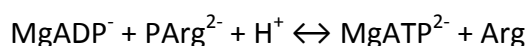


Figura15: Representación esquemática de la reacción de las fosfágeno quinasa (Sauer y Schlattner, 2004).

Hasta el momento fueron identificados ocho fosfágenos diferentes y sus respectivas quinasas (fosfotransferasas) en el reino animal (Ellington, 2001), entre las cuales pueden mencionarse a la creatina quinasa (CK), como el ejemplo mejor conocido en vertebrados, y a la arginina quinasa (AK) en invertebrados. Debido a la existencia de múltiples isoenzimas de CK localizadas en diferentes compartimentos subcelulares (citosol, mitocondria y flagelo) (Ellington y Suzuki, 2007), se ha propuesto que estos sistemas constituyen también un *buffer* espacial de energía entre los sitios de consumo y producción de ATP a través de *shuttles* enzimáticos, conformando junto con otras enzimas del metabolismo energético, redes enzimáticas de fosfotransferencia (Schlattner *et al.*, 1998; Dzeja y Trezic, 2003) (Ver Sección I, pag. 31).

La AK (ATP: arginina fosfotransferasa, EC: 2.7.3.3) cataliza la transfosforilación reversible entre N-fosfo-L-arginina y ADP de acuerdo a la siguiente reacción:



La fosfoarginina (Fig. 16 B y C), al igual que cualquier otro fosfágeno, juega un rol importante como reserva de energía y presumiblemente soporta grandes demandas energéticas hasta que otros procesos comienzan a activarse (Hunneken y Whiteley, 1960; Morrison, 1973).

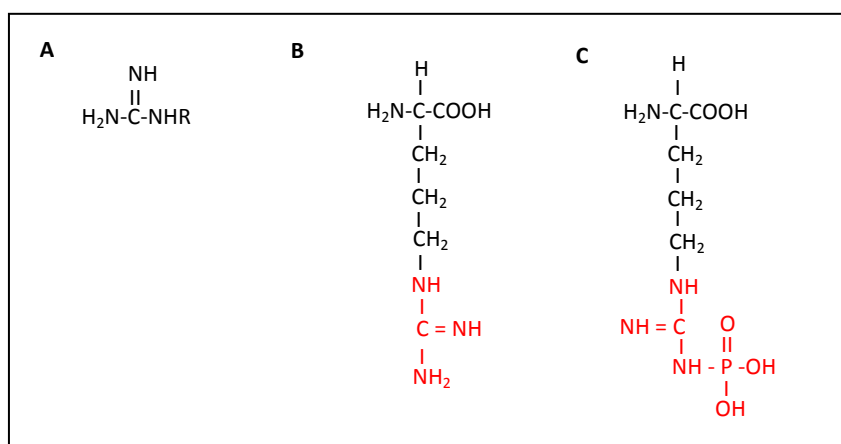


Figura 16: Esquema de los grupos guanidinos (A), arginina (B) y fosfoarginina (C). En rojo se marcan el grupo guanidino y el grupo guanidino fosforilado de la arginina.

Evolutivamente la AK es considerada el miembro más cercano a las guanidino quinasas ancestrales (Suzuki *et al.*, 1997) y está ampliamente distribuida entre insectos y crustáceos (Canonaco *et al.*, 2003) con unas pocas excepciones en eucariotas unicelulares como *Paramecium caudatum* (Noguchi *et al.*, 2001), *Tetrahymena pyriformis* (Watts y Bannister, 1970) y *Trypanosoma spp.* (Pereira *et al.*, 2002). Por esta razón, se cree que estos sistemas han evolucionado con metazoos y que estas excepciones se deben a una transferencia horizontal de genes.

La AK de *T. cruzi* y *T. brucei* fue descrita por miembros de nuestro laboratorio (Pereira *et al.*, 2000, 2002). En *T. cruzi* se identificó una AK de 40 kDa (TcAK) y se observó que su expresión y actividad específica aumentaban en forma continua durante el crecimiento de los parásitos en cultivo, alcanzando su máximo (un orden de magnitud mayor) en la fase estacionaria. De acuerdo con estos resultados se sugirió que podría estar regulada por la densidad celular, la replicación del parásito o por el estrés nutricional implicado en dicha fase. Asimismo se postuló una relación entre el transporte de arginina, la actividad arginina quinasa con el estadio del parásito y la capacidad de replicación (Pereira *et al.*, 2002). Por otro lado, parásitos sobre-expresando la propia AK continuaban creciendo aún en fase estacionaria tardía, siendo la densidad de parásitos dos veces y media mayor que el control. Los mismos parásitos transgénicos fueron más resistentes a condiciones de estrés generadas por falta de nutrientes y variaciones de pH (Pereira *et al.*, 2003). Sustentando estas observaciones, otros autores demostraron que la expresión heteróloga de la AK del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) en células que no presentan ningún sistema de fosfágenos, como levaduras y bacterias, genera tolerancia a condiciones de estrés nutricional y de pH directamente relacionada con la capacidad de la fosfoarginina de actuar como *buffer* de ATP (Canonaco *et al.*, 2002, 2003). La importancia de estos estudios radica en que las condiciones de estrés ensayadas son frecuentes durante el ciclo de vida de *T. cruzi* donde la expresión de la AK podría ser un importante mecanismo de regulación adaptativa. En el estadio epimastigote, el parásito está expuesto frecuentemente a condiciones de escasez de nutrientes y de fluctuaciones en el pH dependiendo del estado alimenticio del insecto vector. Por ejemplo, el pH de la

materia fecal de la vinchuca varía de 5,7 a 8,9 de acuerdo al tiempo transcurrido luego de la alimentación (Kollien *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta que en *T. cruzi* no se han encontrado reservas relevantes de energía en forma de hidratos de carbono y que TcAK no está presente en los mamíferos, esta enzima podría ser capitalizada como un posible blanco terapéutico contra el Mal de Chagas. Se han reportados diferentes compuestos inhibidores de TcAK como polifenoles (catequinas) y análogos de arginina (canavanina, agmatina, nitroarginina y homoarginina), dentro de los cuales las catequinas provenientes de té verde, la canavanina y la homoarginina tuvieron actividad tripanocida (Pereira *et al.*, 2003; Paveto *et al.*, 2004). La estructura tridimensional de la enzima, recientemente determinada, podría proveer un modelo para el desarrollo racional de nuevas drogas basadas en TcAK (Fernandez *et al.*, 2007).

La arginina, a diferencia de otros compuestos guanidinos metabólicamente inertes, es un sustrato clave en otras rutas metabólicas. *T. cruzi* es incapaz de sintetizarla y por lo tanto debe obtenerla del hospedador a través de diferentes sistemas de transporte (Canepa *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 1999). Varios tripanosomátidos poseen enzimas involucradas en el catabolismo de arginina, aunque en *T. cruzi* muchas de las reacciones no pueden llevarse a cabo por carecer de arginina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa y arginasa, entre otras (Ariyanayagam y Fairlamb, 1997; Carrillo *et al.*, 2004, Berriman *et al.*, 2005). Estas observaciones, sin embargo, son temas que actualmente están en discusión (Irigoín *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, *T. cruzi* es un organismo aeróbico y como tal, está expuesto a diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) como anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos producidos por su propio metabolismo. Por ser un parásito intracelular, no sólo debe eliminar sus metabolitos endógenos sino que también los generados por el sistema inmune del hospedador durante la infección (Muller *et al.*, 2003). Los tripanosomátidos desarrollaron sistemas efectivos y complejos para resistir y sobrevivir a los diferentes tipos de estrés oxidativo (para más información ver Sección I, pag. 28) y debido a las diferencias que existen con los presentes en el hospedador mamífero constituyen una fuente de posibles blancos para combatir al parásito (Krauth-Siegel *et al.*, 2007). De hecho, una de las drogas

empleadas en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad, el nifurtimox, actúa mediante la generación de ROS (Urbina, 2003). Debido a la importancia de estos metabolismos detoxificantes y, tal como se mencionó anteriormente, TcAK confiere a estos organismos una mayor capacidad de supervivencia ante diferentes tipos de estrés, se planteó el objetivo de estudiar su función en respuestas a estrés oxidativo bajo la hipótesis de que la fosfoarginina podría actuar como un mediador sistémico ante diferentes condiciones estresantes.

Por otro lado, si bien los antecedentes mencionados corresponden a una AK proveniente de extractos solubles de epimastigotes, nunca fue analizada en detalle su localización subcelular, ni sus patrones de expresión en los demás estadios del parásito, ni tampoco la posible existencia de otras isoformas. Debido a que se postula que las AKs forman parte de una red enzimática de fosfotransferencia, ahondar en los aspectos mencionados puede aportar nuevos datos sobre la función de esta enzima en tripanosomátidos y por lo tanto constituye uno de los objetivos planteados en el presente trabajo.

Resultados

Los resultados están divididos en dos grupos principales:

- *La arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi* y el estrés oxidativo;
- *Estudios de las isoformas de la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi*, expresión en el ciclo de vida y localización subcelular.

La arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi* y el estrés oxidativo

Expresión de TcAK en diferentes condiciones de estrés oxidativo

Para evaluar si TcAK participa en respuestas a estrés oxidativo se diseñaron ensayos utilizando como primera aproximación peróxido de hidrógeno. En principio se evaluó la concentración de H_2O_2 capaz de inhibir el 50% del crecimiento (CI_{50}) de los parásitos en cultivo. La misma fue calculada en aproximadamente 190 μM , siendo coincidente con valores previamente reportados (Finzi *et al.*, 2004, Kelly *et al.*, 1993). Los ensayos consistieron entonces en tratar parásitos con una concentración de H_2O_2 cercana a la CI_{50} (200 μM) en medio LIT fresco, tomando alícuotas cada 15 min durante 1 h para evaluar mediante *Western Blot* (WB) la expresión de TcAK (Fig. 17 A) en plazos cortos. Interesantemente, la expresión fue inducida por el H_2O_2 , aumentando de manera continua alcanzando un máximo de 5,5 veces a los 60 min post-tratamiento (Fig. 17A). Cuando se analizó la inducción en plazos largos (de 2 a 4 hs), a las 3 hs observamos un notable incremento en los niveles de la enzima, de aproximadamente 10 veces mayor, disminuyendo a la mitad a las 4 hs de tratamiento (Fig. 17 B). En todos los casos los niveles de enzima fueron estimados por densitometría y normalizados con los perfiles proteicos de las muestras obtenidos en geles teñidos con azul de coomassie. Como la expresión de TcAK de los parásitos no tratados se mantuvo constante durante los diferentes tiempos de incubación, los valores obtenidos a tiempo 0 fueron tomados como base para la comparación.

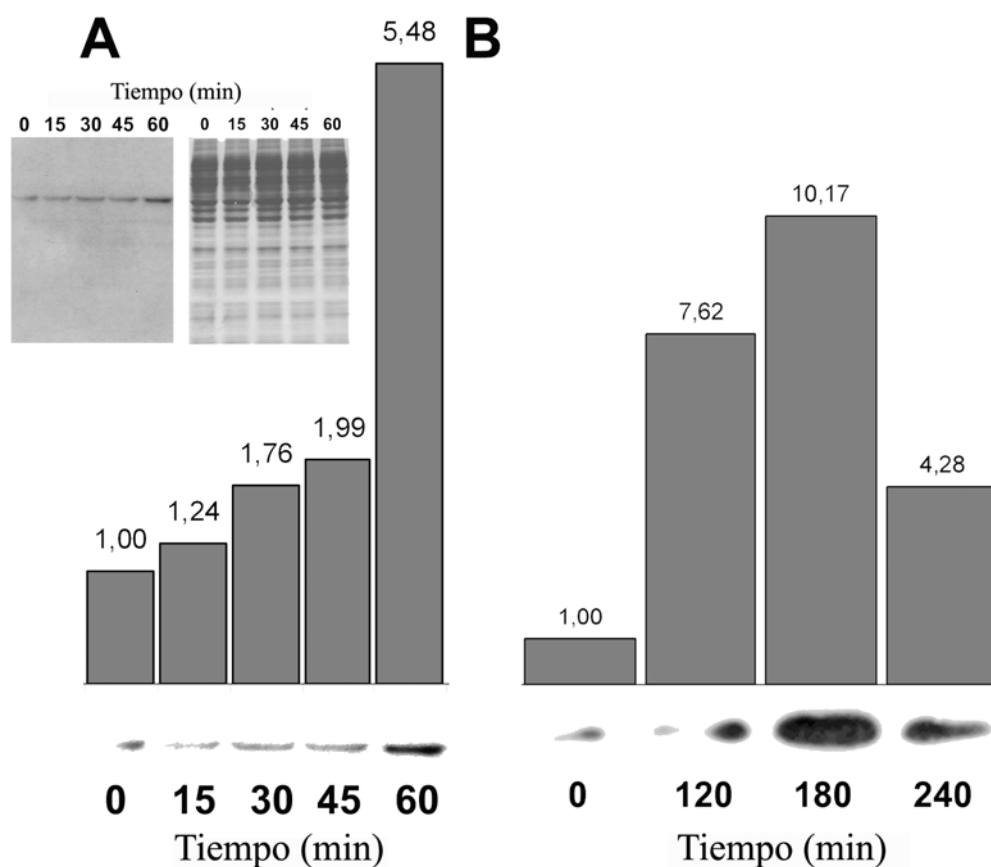


Figura 17: Inducción de TcAK frente al tratamiento con H_2O_2 en tiempos cortos (A) y en tiempos largos (B). Los parásitos fueron tratados con 200 μM de H_2O_2 en medio LIT y a los tiempos indicados se tomaron alícuotas que fueron analizadas por WB. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas por densitometría y comparadas con el min 0 correspondiente al momento previo a la adición del H_2O_2 . De manera representativa a los diferentes ensayos, en la fig. A también se muestra el WB completo y la membrana teñida con rojo ponceau indicando igual cantidad de proteínas a los diferentes tiempos.

Para asegurarnos que la inducción de TcAK mediada por el H_2O_2 fuera debida a un evento específico y no producto de un aumento general de proteínas, se evaluó la expresión de una AdK citosólica (TcAdK1) involucrada también en el metabolismo energético (Bouvier *et al.*, 2006). Como puede observarse en la figura 18, los niveles de esta enzima se mantuvieron constantes durante el tratamiento. A su vez, los perfiles

proteicos obtenidos en todos los casos indicaron una cantidad igual de proteínas totales entre los diferentes tiempos (Fig. 18).

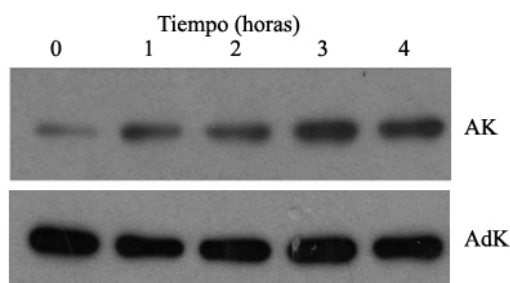


Figura 18: Control de la expresión de proteínas frente al tratamiento con 200 μM de H_2O_2 . Los extractos proteicos fueron evaluados para la expresión TcAdK1 (AdK), manteniéndose constante a los diferentes tiempos.

Por último se corroboró que el aumento en los niveles de TcAK correlacionara con el aumento en la actividad específica de la enzima (Fig. 19), pues la inducción observada podría deberse a una compensación por la inactivación de la enzima por el H_2O_2 .

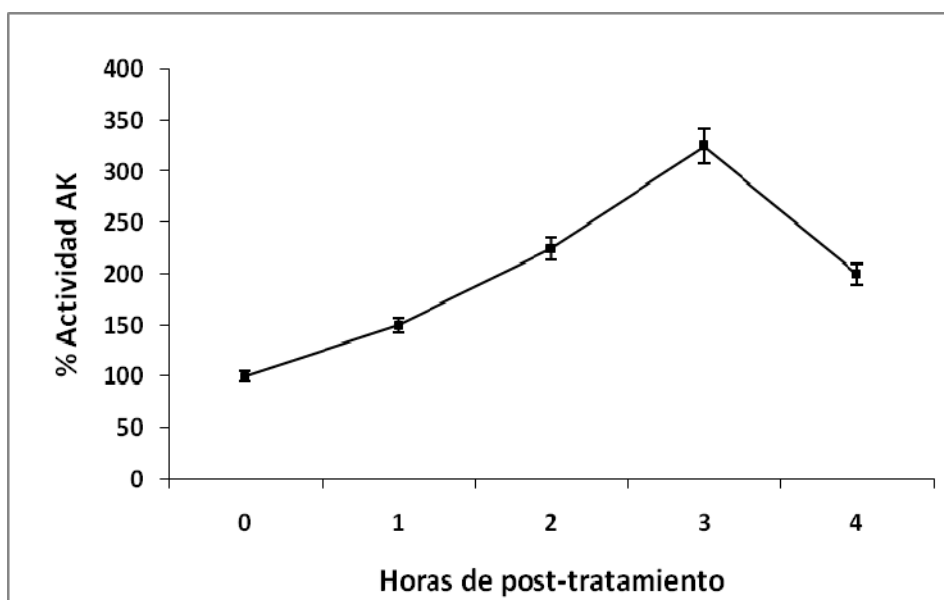


Figura 19: Actividad AK frente al tratamiento con H_2O_2 . Los extractos enzimáticos tratados con 200 μM de H_2O_2 al tiempo 0 y a 1, 2, 3 y 4 hs post-tratamiento fueron evaluados para la actividad AK. Se grafica el porcentaje de actividad AK respecto al control.

Con el objetivo de determinar si la inducción de TcAK es un efecto producido sólo por el peróxido de hidrógeno o es una respuesta general ante estrés oxidativo, se estudió el efecto de otros agentes oxidantes como nitroprusiato de sodio, un dador de óxido nítrico; azul de metileno, una droga fenotiazina que oxida al NADPH simulando estrés oxidativo (Maugeri y Cazzulo, 2004); nifurtimox (Nfx) y benznidazol (BZL), un nitrofurano y un nitroimidazol utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas que aparentemente disminuirían la concentración intracelular de tioles (Maya *et al.*, 1997). Para poder detectar algún efecto de inducción, se ensayaron diferentes concentraciones que fueron elegidas de acuerdo a los valores de CI_{50} reportados (Maugeri y Cazzulo, 2004) y a los obtenidos en nuestro laboratorio (5 μ M para el BZL y 2 μ M para el Nfx). Los rangos empleados fueron: nitroprusiato de sodio, 0-1000 μ M; azul de metileno, 0-500 μ M; BZL, 0-50 μ M y Nfx, 0-50 μ M. Los parásitos fueron tratados con las drogas en medio LIT fresco durante 2 hs; como control positivo se utilizó el tratamiento con 200 μ M de H_2O_2 . A pesar de que estos compuestos generan o imitan condiciones de estrés oxidativo, sólo con Nfx se observó una inducción significativa de la expresión de TcAK dosis dependiente, alcanzando un máximo de hasta 2,3 veces a 10 μ M y disminuyendo a concentraciones más altas (Fig. 20 B). El azul de metileno y el nitroprusiato de sodio generaron un leve aumento de TcAK a 100 μ M y 200 μ M respectivamente, mientras que con BZL se mantuvo constante en todas las concentraciones (Fig. 20 A).

La AdK control, nuevamente se mantuvo constante frente al tratamiento con 10 μ M de Nfx (Fig. 20 C).

La sobre-expresión de TcAK y la resistencia al tratamiento con peróxido de hidrógeno

Como los resultados obtenidos indican una relación entre TcAK y el estrés oxidativo, decidimos tomar el camino inverso y estudiar de manera recíproca si un aumento en los niveles de esta enzima genera tolerancia al tratamiento con peróxido de hidrógeno. Para ello, epimastigotes transgénicos sobre-expresando la TcAK (parásitos AK; Pereira *et al.*, 2003) fueron expuestos a concentraciones crecientes de este agente entre 0 y 1000 μ M en medio de cultivo y evaluados en su capacidad de

sobrevivir mediante el recuento a la 96 hs post-tratamiento. Parásitos sobre-expresando GFP fueron utilizados como control (parásitos GFP). Si bien el umbral de toxicidad obtenido varió entre diferentes ensayos independientes, los parásitos AK, que presentan aproximadamente 20 veces más actividad arginina quinasa que los parásitos control, mostraron siempre un fenotipo más resistente. Los rangos de concentraciones letales estuvieron entre 0,1 y 0,3 mM de H_2O_2 para los parásitos GFP, y entre 0,25 y 0,45 mM de H_2O_2 para los parásitos AK. En la figura 21 se muestra un ensayo representativo en el cual a 0,3 mM de H_2O_2 se observa una fuerte disminución de casi el 72% en la densidad celular de los parásitos GFP mientras que los parásitos AK no fueron afectados.

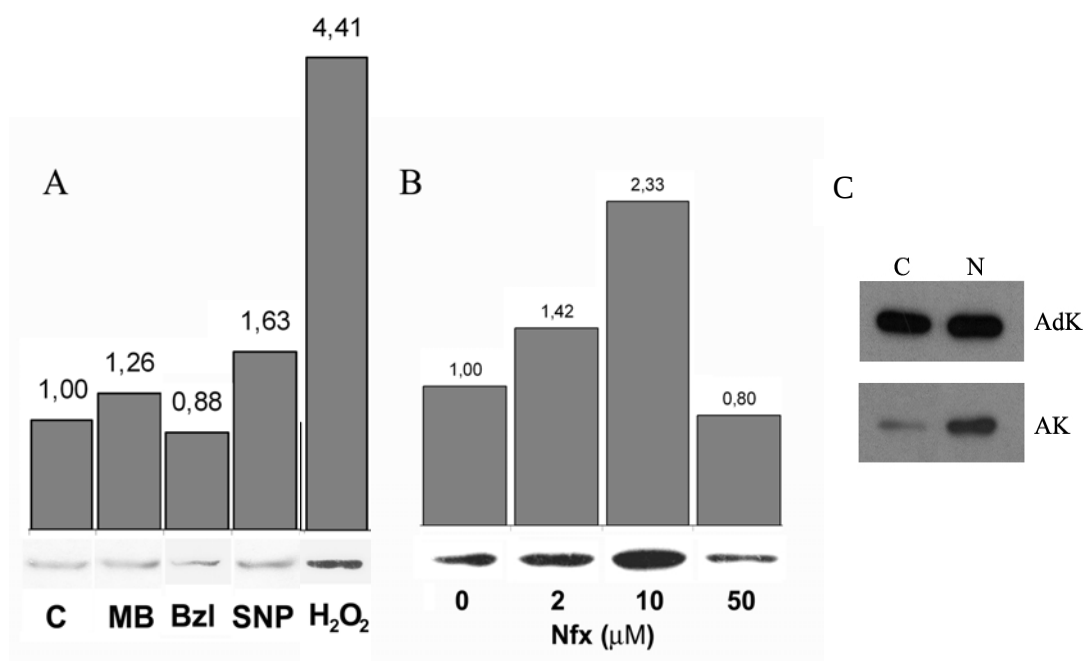


Figura 20: Inducción de TcAK frente a diferentes compuestos oxidantes. Iguales cantidades de parásitos provenientes del mismo cultivo fueron tratados durante 2 hs en medio LIT con las diferentes drogas y procesados para el análisis de la expresión de la AK por WB. A) C, control sin tratamiento; MB, 100 μ M de azul de metileno; Bzl, 10 μ M de benzimidazol; SNP, 200 μ M de nitroprusiato de sodio; H_2O_2 , 200 μ M de peróxido de hidrógeno (control positivo). B) Nfx, 0, 2, 10 y 50 μ M de nifurtimox. C) Control de expresión frente al tratamiento con nifurtimox. C: Control sin tratar; N: 10 μ M de nifurtimox; AK: TcAK, arginina quinasa; AdK: TcAdK1, adenilato quinasa.

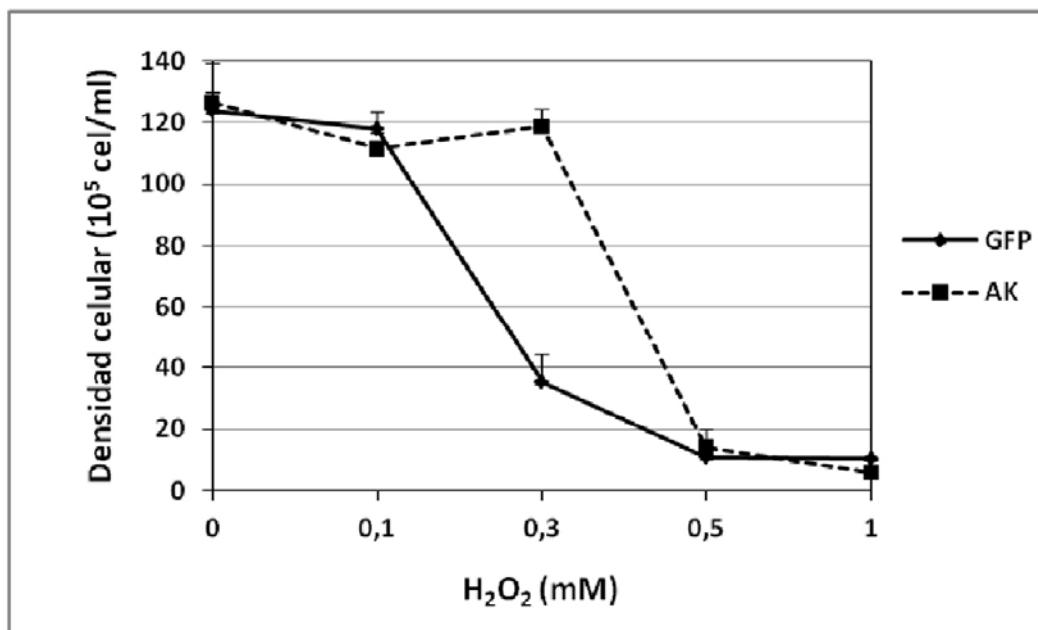


Figura 21: Efecto del H₂O₂ en el crecimiento de epimastigotes que sobre-expresan Tc AK (AK) y parásitos control que sobre-expresan GFP (GFP). 10⁶ parásitos/ml fueron tratados con concentraciones crecientes de H₂O₂ (0-0,1-0,3-0,5-1 mM) y contados a las 96 hs post-tratamiento. A 0,3 mM de H₂O₂ las diferencias fueron estadísticamente significativas por el *test* de *Student*.

Contenido de tioles en parásitos que sobre-expresan TcAK

Los resultados mostrados sugieren fuertemente que TcAK está involucrada con la resistencia al estrés oxidativo, la pregunta a responder entonces es de qué manera participa en este proceso. En tripanosomátidos el principal sistema de detoxificación frente a diferentes especies reactivas de oxígeno está centrado en el tripanotión (T(SH)₂), una molécula antioxidante cuya síntesis es dependiente de ATP (Turrens 2004). Una hipótesis es que el ATP que se genera a partir de fosfoarginina por los niveles altos de TcAK, produzca una mayor síntesis de T(SH)₂ y mantenga a la vez el poder reductor necesario para el reciclado de este tiol de manera indirecta. Para estudiar esta hipótesis cuantificamos preliminarmente los tioles totales de los parásitos AK y GFP mediante la técnica de Ellman (Ellman, 1959). Los valores obtenidos para cada una de las líneas de parásitos fueron similares, 0,183 (±0,001) nmol/10⁶ células para los parásitos AK y 0,203 (±0,003) nmol/ 10⁶ células para los parásitos GFP,

indicando que la resistencia al H₂O₂ mediada por TcAK involucra otros mecanismos que no actúan directamente sobre el tripanotión.

Estudio de las isoformas de la arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi*, expresión en el ciclo de vida y localización subcelular

Predicción de isoformas de arginina quinasa en tripanosomátidos

Con el objetivo de determinar el número de isoformas de AK y de predecir sus posibles localizaciones subcelulares en los diferentes tripanosomátidos, incluyendo a *T. cruzi*, se llevó a cabo una búsqueda bioinformática sobre los genomas de los mismos seguido de un análisis de secuencias. De acuerdo con la información disponible en la base de datos del GeneDB (<http://www.genedb.org>), todas las especies del género *Trypanosoma* poseen genes codificantes para posibles arginina quinasas: *T. brucei* contiene 3 isoformas (AK1, AK2 y AK3), *T. cruzi*, *T. vivax* y *T. congolense* 2 isoformas. La AK1 de *T. brucei* es una variante citosólica de 356 aa previamente caracterizada (Pereira *et al.*, 2002), AK2 contiene una señal C-terminal de localización a glicosomas (PTS-1, -SNL) y AK3 presenta extensiones C- y N-terminal desconocidas (Fig. 22, panel superior). En el caso de *T. cruzi*, la AK ortóloga a AK1 de *T. brucei* corresponde a TcAK, ya ampliamente estudiada en este parásito (Pereira *et al.*, 2000, 2002, 2003), mientras que la segunda isoforma corresponde a una variante corta de 237 aa idéntica a la primera pero truncada (Tc00.1047053482369.29). En *T. vivax* y *T. congolense* se encontró una organización genómica similar, aunque la existencia de una isoforma AK3 no pudo ser confirmada por la escasa cobertura de los genomas (Fig. 22). La identidad de secuencia entre todas las AK es alta, del 64%. Los genes de las diferentes isoformas están ubicados en un mismo locus y a su vez, como era de esperar entre estos parásitos evolutivamente emparentados, los estudios de sintenia mostraron una fuerte conservación de los genes flanqueantes a los de las AKs (Fig. 22). El orden presente en el locus de *T. brucei*, el tripanosomátido más caracterizado, es el siguiente: gen de la subunidad regulatoria de la fosfatasa 2A (PP2A, Tb09.160.4540), gen 1 de una proteína

hipotética conservada (HCP1, Tb09.160.4550), genes de AK3 y AK2, gen 2 de una proteína hipotética conservada (HCP2HCP2, Tb09.160.4580), gen de AK1 y el gen de un transportador ABC (ABCT, Tb09.160.4600). Un orden similar fue encontrado para *T. vivax* y *T. congolense*, mientras que *T. cruzi* parece haber perdido los genes de AK3, AK2 y HCP2. En cuanto a *L. major*, si bien se mantuvo la sintenia, los genes de AK están ausentes, indicando que habría ocurrido la pérdida de los mismos siendo consistente con datos bioquímicos previos (Pereira *et al.*, no publicado)

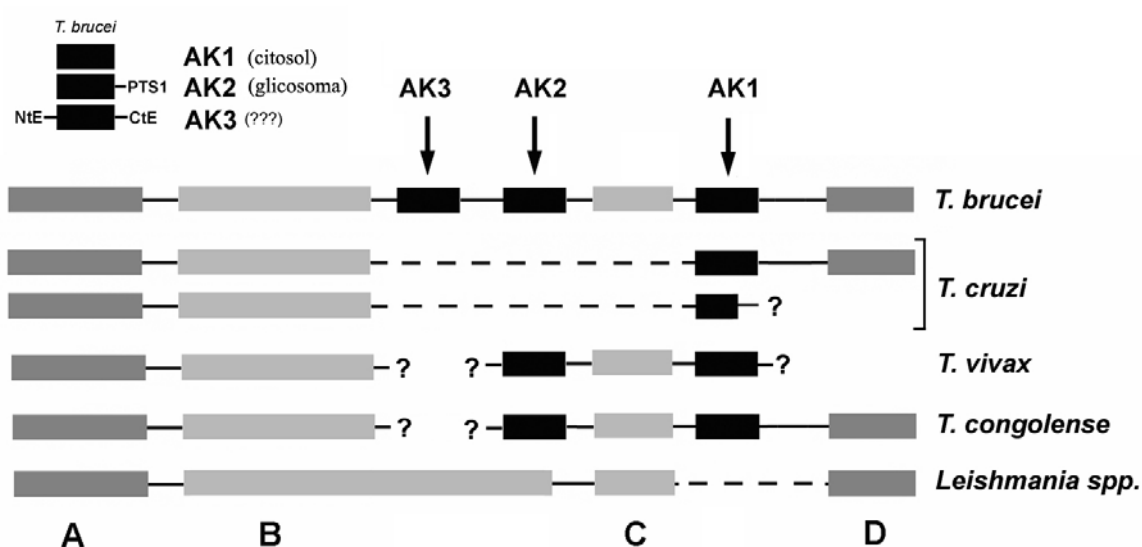


Figura 22: Análisis bioinformático de isoformas de AK y sintenia entre diferentes tripanosomátidos: *T. brucei*, *T. cruzi*, *T. congolense* y *L. major* (*Leishmania spp.*). Orden de genes en el locus de *T. brucei*: A) subunidad reguladora de fosfatasa 2A, B) proteína hipotética, C) proteína hipotética y D) transportador ABC. Arriba a la izquierda se muestra las isoformas de AK en *T. brucei* con sus posibles localizaciones subcelulares.

Expresión de isoformas de las AKs en los diferentes estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Los reportes anteriores sobre la AK de *T. cruzi* no muestran evidencias de una segunda isoforma más corta. Al ser idénticas ambas proteínas los anticuerpos policlonales deberían haberla reconocido, aunque únicamente fue evaluada en epimastigotes. Con el objetivo de examinar la expresión de la AK previamente

caracterizada y la de esta segunda isoforma en el resto de los estadios del parásito, se llevó a cabo un WB sobre muestras provenientes de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes. En la figura 23 puede observarse que solamente la AK de 40 kDa (TcAK) es detectada en todo el ciclo de vida, sin evidencias de la isoforma truncada de 20 kDa. Estos resultados indicarían que la segunda AK habría surgido por algún error en el proceso de ensamblado del genoma considerando que CL Brener posee un genoma híbrido.

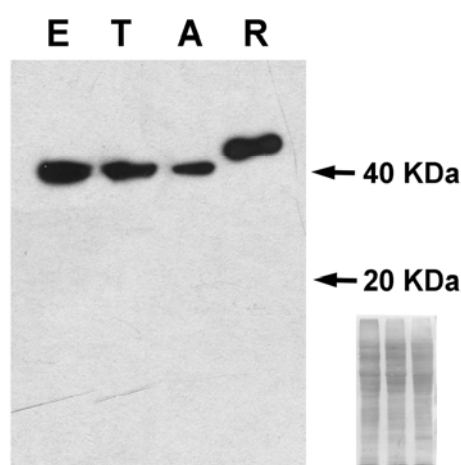


Figura 23: WB para TcAK en extractos de epimastigotes (E), tripomastigotes (T) y amastigotes (A). R: TcAK recombinante (con tag 6xHis). En el gráfico inferior se muestra la membrana teñida con rojo ponceau indicando igual cantidad de proteínas en los 3 estadios.

Localización subcelular de TcAK

Extracción con digitonina

Para establecer la localización subcelular de TcAK en epimastigotes de *T. cruzi* se llevó a cabo una extracción con digitonina cuyas fracciones obtenidas fueron analizadas por actividad enzimática y WB (Fig. 24). En las mediciones de actividad enzimática el patrón de extracción de la actividad AK fue comparado con el de diferentes enzimas marcadoras: hexoquinasa (HK), isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (IDH) y piruvato quinasa (PK) (Cáceres *et al.*, 2003; Cazzulo *et*

al., 1989; Denicola *et al.*, 2002). A la concentración más baja de digitonina, 0,1 mg/ml, donde la actividad PK alcanzó aproximadamente el 65%, sólo un 16% de la actividad AK fue detectada. A 0,2 mg/ml, concentración en la cual la totalidad del marcador mitocondrial fue extraído, la actividad AK también alcanzó el 100%, manteniéndose en su máxima detección a las concentraciones más altas de detergente. Por su parte, el marcador glicosomal presentó una extracción diferente siendo liberado a 0,5 mg/ml de digitonina (Fig. 24, panel superior). Estos resultados sugieren que la actividad AK además de ser citosólica estaría asociada a la mitocondria. Sin embargo, en el análisis de las muestras por WB, se observó un patrón similar al del marcador citosólico (Fig. 24, panel inferior) pero no al mitocondrial. Los marcadores utilizados en estos ensayos fueron: HK para glicosomas, glutamato deshidrogenasa NADP⁺-dependiente (GDH) para citosol (Barderi *et al.*, 1998), cruzipáina (CZ) para reservosomas (de Souza *et al.*, 2000) y aspartato aminotransferasa (AAT) para mitocondria (Marciano *et al.*, 2008).

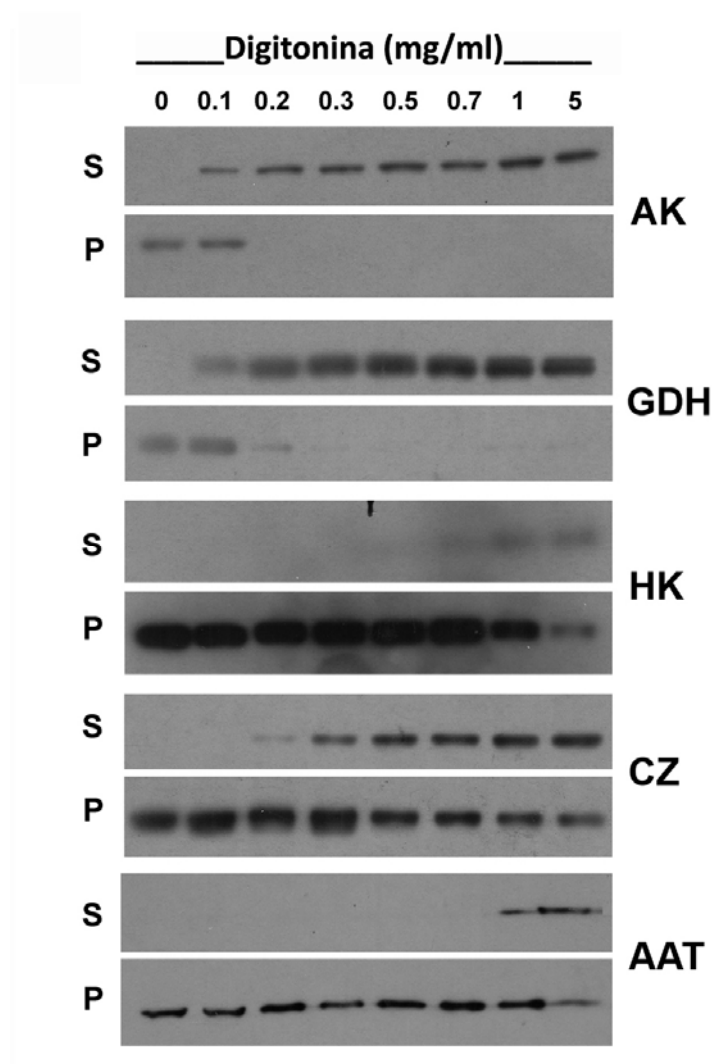
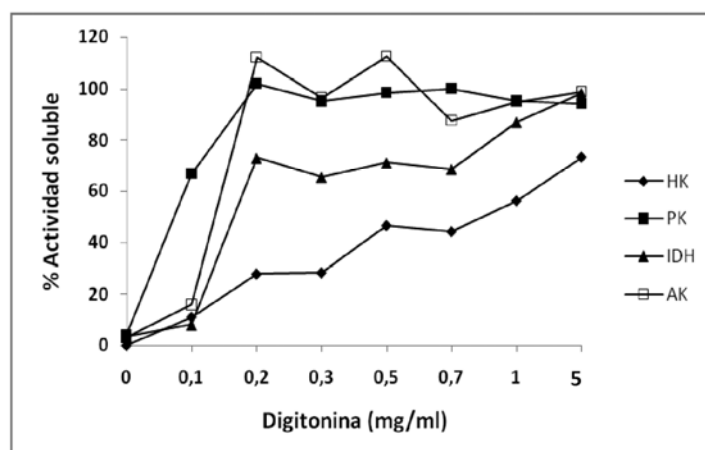


Figura 24: Análisis de la localización de Tc AK mediante extracción con digitonina. Los experimentos fueron realizados como se describe en la sección Materiales y Métodos. Panel superior: Medición de actividad enzimática en las diferentes fracciones. Los porcentajes corresponden a la actividad enzimática detectada en la fracción soluble de cada uno de los marcadores y de la arginina quinasa. Panel inferior:

WB sobre las mismas fracciones. IDH: isocitrato deshidrogenasa (marcador mitocondrial); PK: Piruvato quinasa (marcador citosólico); HK: hexoquinasa (marcador glicosomal); AK: arginina quinasa; GDH: NADP⁺-glutamato deshidrogenasa (marcador citosólico); CZ: cruzipaina (marcador de reservosomas); AAT: aspartato aminotransferasa (marcador mitocondrial).

Inmunofluorescencia y microscopía electrónica

Para esclarecer la discrepancia obtenida en la extracción con digitonina se continuó el estudio por la técnica inmunofluorescencia. En la figura 25 puede observarse que los anticuerpos anti-TcAK marcan numerosas estructuras intracelulares dando un patrón puntiforme predominante además de una señal difusa en todo el cuerpo celular, indicando que TcAK no sólo es citosólica sino que también estaría asociada a alguna organela o vesícula (Fig. 25). Sin embargo, no hubo co-localización con ninguno de los marcadores utilizados para glicosomas (HK), reservosomas (CZ) y mitocondria (Mitotracker CMXRos) (Fig. 25). A su vez la tinción obtenida con un marcador de acidocalcisomas (pirofosfatasa vacuolar, V-H⁺PPasa, Hill *et al.*, 2000), tampoco fue comparable al de TcAK (Fig. 26).

El patrón observado es interesante ya que hubiéramos esperado una señal coincidente con mitocondria y citoplasma o bien citoplasma únicamente, pero obtuvimos una marcación compatible con una organela diferente a las ensayadas.

Para continuar con el estudio se llevó a cabo una inmunocitoquímica analizada por microscopía electrónica de transmisión. En este ensayo se detectó una marcación proveniente principalmente del citoplasma de los parásitos (Fig. 27). Finalmente, con este último análisis, concluimos que TcAK es una enzima citosólica. El patrón particulado obtenido en las inmunofluorescencias podría indicar que la enzima se encuentra en el citosol heterogéneamente distribuida, lo cual fue observado en otras enzimas citosólicas.

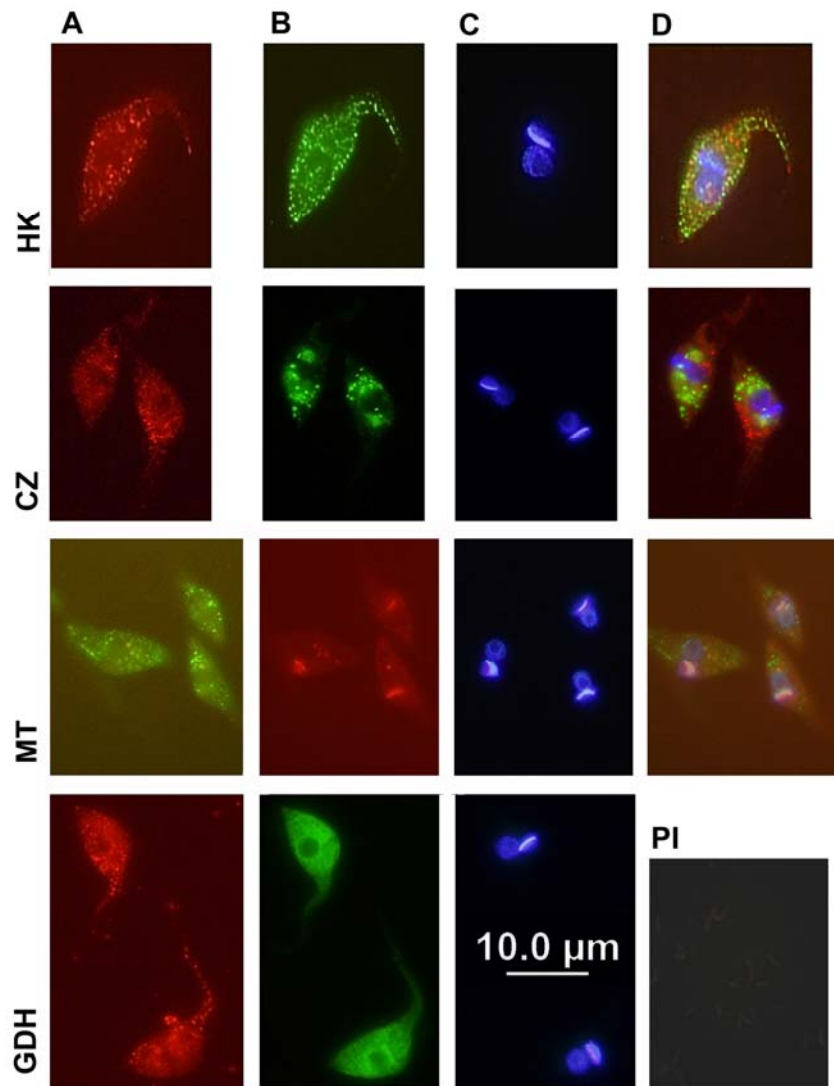


Figura 25: Localización de TcAK por inmunofluorescencia indirecta. Los parásitos fueron adheridos a portaobjetos, fijados, permeabilizados e incubados con los anticuerpos primarios (anti-TcAK + anti-marcador) y posteriormente con los anticuerpos secundarios (anti-ratón Rojo de Texas + anti-conejo FITC). En el caso de la marcación de mitocondria se procedió como se describe en la sección Materiales y Métodos, utilizando anti-ratón FITC. Columnas: A) anti-TcAK; B) anti-marcador; C) DAPI, núcleos; D) superposición entre A, B y C. Filas: HK) hexoquinasa, marcador de glicosomas; CZ) cruzipaína, marcador de reservosomas; MT) mitoracker, marcador de mitocondria; GDH) NADP⁺ glutamato deshidrogenasa, marcador de citosol. PI: control con suero de ratón pre-inmune.

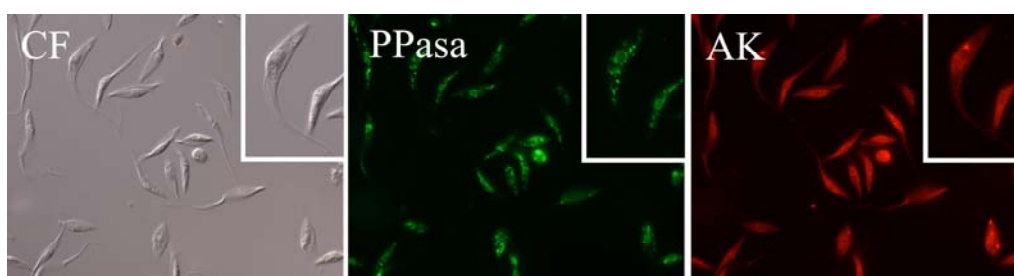


Figura 26: Inmunofluorescencia indirecta: comparación entre marcador de acidocalcisomas ($V-H^+PPasa$) y TcAK. CF) contraste de fase; PPasa) anti-pirofosfatasa $V-H^+PPasa$; AK) anti-TcAK. Se procedió de igual manera que en la figura anterior

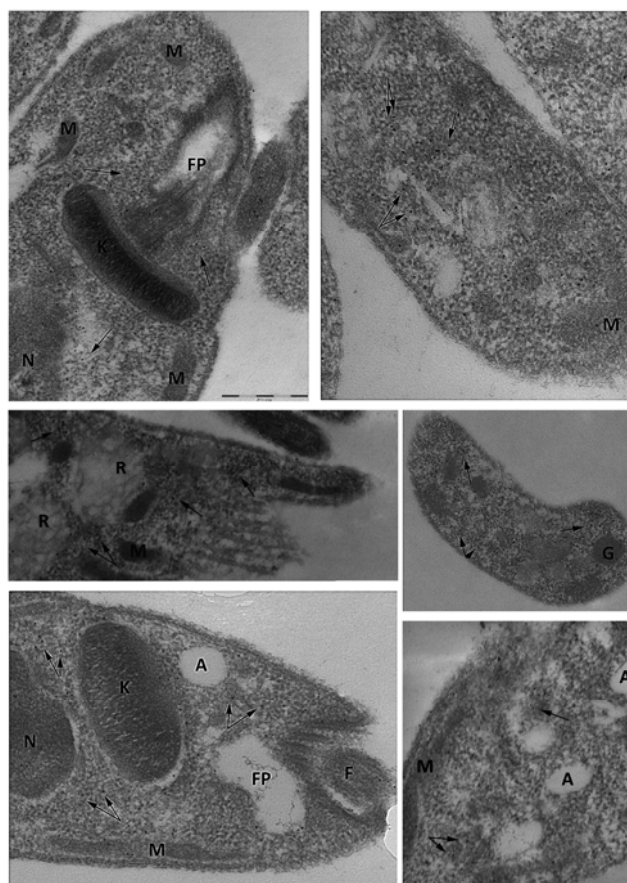


Figura 27: Localización subcelular de TcAK por inmunocitoquímica. Los parásitos fueron deshidratados y embebidos en resina, cortados en capas ultrafinas que fueron incubadas con anticuerpo primario anti-TcAK y anti-ratón asociado a partículas de oro y observados en un microscopio electrónico de transmisión como se detalla en la sección Materiales y Métodos. En la figura se muestran diferentes secciones de parásitos donde se muestran las organelas y la señal proveniente principalmente del citosol (flechas). A: acidocalcisomas; R: reservosomas; M: mitocondria; N: núcleo; K: kinetoplasto; FP: bolsillo flagelar; F: flagelo. Barra: 500 nm.

Discusión

TcAK es una enzima clave en el balance energético de *T. cruzi*. Como en trabajos previos se observó que está involucrada en resistencias a estrés nutricional y de pH, el primer objetivo fue analizar si puede participar también en respuestas a estrés oxidativo. Determinamos que en epimastigotes de *T. cruzi* la expresión de TcAK y su actividad enzimática aumentan significativamente frente al tratamiento con peróxido de hidrógeno y Nfx. Sólo una leve inducción pudo apreciarse con otros compuestos analizados como azul de metileno y nitroprusiato de sodio, mientras que ningún efecto se observó con BZL. El hecho que el incremento en los niveles de TcAK estuviera acompañado por un aumento en la actividad específica, permite asumir que la inducción observada no es producto de un mecanismo de regulación compensatorio como consecuencia de la inactivación directa de la enzima por el H_2O_2 o Nfx. Por lo tanto, estos resultados sugerirían en principio, que TcAK estaría involucrada en la resistencia a estrés oxidativo mediante alguna vía desconocida. Reforzando esta observación, la sobre-expresión de TcAK generó parásitos más resistentes al peróxido de hidrógeno. Resultados similares fueron observados previamente en parásitos que expresaban niveles elevados de triparredoxin peroxidasas (TXNPx), glutatión peroxidasa (GPx) y ascorbato peroxidasa (APx) (Irigoin *et al.*, 2008; Finzi *et al.*, 2004), pero a diferencia de la AK, todas estas enzimas están directamente involucradas en las cascadas de detoxificación de H_2O_2 y de otros agentes oxidantes (ver Sección I, pag. 28). El punto clave consiste en establecer entonces una conexión entre la AK y el estado energético celular con los procesos de detoxificación de ROS. Como *T. cruzi* en la síntesis de $T(SH)_2$ (molécula central del metabolismo antioxidante) consume dos moléculas de ATP (Oza *et al.*, 2002), podría ser que los niveles de este tiol estuvieran más elevados en los parásitos transgénicos, presumiblemente por poseer más reservas energéticas (fosfoarginina) respecto al control. Sin embargo, no existieron diferencias significativas en el contenido de tioles totales de ambas líneas de parásitos. Aunque la técnica utilizada no es aplicable para la medición específica de $T(SH)_2$, los resultados indican que la resistencia observada estaría mediada por una vía indirecta.

El NADPH, provisto por la ruta de las pentosas fosfato, es la molécula que otorga el poder reductor para el reciclado del tripanotión. En estudios previos realizados en *T. cruzi* se observó que el tratamiento con azul de metileno produce un aumento en la actividad de la vía de las pentosas fosfato, duplicando el consumo de glucosa a través de dicha ruta (Maugeri y Cazzulo, 2004). A su vez se reportó que la glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa, la enzima regulatoria de este metabolismo, aumenta 46 veces su expresión bajo estrés generado por H_2O_2 (Igoillo-Esteve y Cazzulo, 2006). Es posible entonces, que ante condiciones oxidantes se induzca la expresión de TcAK para regenerar ATP a partir de la fosfoarginina acumulada, compensando una disminución en la glucólisis por el aumento del flujo de glucosa hacia la vía de las pentosas fosfato. De esta manera se mantiene la homeostasis energética celular y el NADPH está disponible para la detoxificación. Dentro de esta hipótesis, TcAK cumpliría un rol indirecto y a la vez común al estrés generado por diferentes agentes, sin embargo de los compuestos ensayados sólo el H_2O_2 y el Nfx produjeron un incremento en la expresión de la enzima. Probablemente los efectos del nitroprusiato (que actúa mediante la generación de $NO^{\cdot}$) y del azul de metileno (que oxida moléculas de NADPH imitando al estrés oxidativo) (Maugeri y Cazzulo, 2004) no hayan sido suficientes como para inducir altos niveles de AK en las condiciones ensayadas. Por otro lado, el Nfx y el BZL son drogas tripanocidas y las diferencias observadas podrían ser explicadas mediante los mecanismos de acción propuestos para cada una. Aunque no está claramente establecido, se postula que el Nfx genera ciclos redox con la subsecuente formación de especies reactivas de oxígeno como ión superóxido y peróxido de hidrógeno, a diferencia del BZL que actuaría principalmente mediante la modificación covalente de macromoléculas (Urbina, 2003).

Un punto adicional a tener en cuenta con respecto a la vía de las pentosas fosfato, es que el NADPH regenerado también es empleado indirectamente en la síntesis de ADN, suministrando el poder reductor a través de $T(SH)_2$ y triparredoxin (TXN_{red}) para la síntesis de los precursores (dNTPs) llevada a cabo por la reductasa de ribonucleótidos (Revisado en Irigoín *et al.*, 2008; ver Sección I, pag. 28). Esta observación conduce a la misma hipótesis y relaciona al estado redox, la proliferación y el estado energético celular.

Todas las especulaciones mencionadas no son concluyentes y requieren de una investigación futura. Lo que es posible afirmar de acuerdo a los resultados presentados, es que TcAK está relacionada con las respuestas a estrés oxidativo. Nosotros proponemos que la fosfoarginina es un compuesto clave para el parásito, un mediador que le otorga plasticidad metabólica y que le permite sobrevivir a diversas condiciones desfavorables.

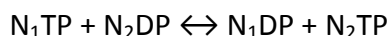
La localización subcelular de muchos de los sistemas de fosfógenos, a excepción del de CK, ha sido poco estudiada. La CK de diferentes organismos, desde mamíferos hasta esponjas marinas, se encuentra en el citosol, mitocondrias y flagelo (Sona y Ellington, 2004; Ellington y Suzuki, 2007). La localización del sistema de AK, ha sido investigada principalmente mediante abordajes bioquímicos; en organismos unicelulares, fue hallada en cilias de *Paramecium caudatum* y *Tetrahymena pyriformis* y en fracciones solubles de *T. cruzi* y *T. brucei* (Pereira *et al.*, 2002). La actividad descrita en *T. cruzi* provenía de fracciones solubles obtenidas a partir de sucesivos ciclos de congelado y descongelado y se asumía que correspondía a una única isoforma (Pereira *et al.*, 2000). Como la determinación del número de variantes y la localización subcelular de estas enzimas son tópicos importantes en el estudio de las redes enzimáticas de fosfotransferencia, en este trabajo se investigó la existencia de otras isoformas mediante predicción bioinformática y detección inmunológica. Se profundizó en el estudio de la localización subcelular mediante ensayos de extracción con digitonina, inmunofluorescencia e inmunocitoquímica. A diferencia de los resultados arrojados por las búsquedas en el genoma del parásito, se confirmó la existencia de una única isoforma de AK en todos los estadios del ciclo de vida: TcAK, la isoforma de 40 kDa caracterizada previamente (Pereira *et al.*, 2000). Esta controversia podría ser atribuida a errores debidos al ensamblado parcial de un genoma híbrido y/o al proceso de anotación automática de genes. En cuanto a la localización subcelular de TcAK, un patrón compatible con una localización citosólica fue observado mediante ensayos de extracción con digitonina. Sin embargo los resultados obtenidos por inmunofluorescencia revelaron una localización inusual: además de una señal difusa proveniente del citosol fueron observadas numerosas estructuras puntuadas dispersas

en todo el cuerpo celular. Si bien este patrón puntuado podría ser compatible con organelas previamente descritas, no se observó co-localización con glicosomas, acidocalcisomas, mitocondria ni reservosomas. Estos resultados son congruentes, en los WB se observa claramente que TcAK es liberada en un 100% a 0,2 mg/ml de digitonina, mientras que no se detecta en las fracciones insolubles a concentraciones más altas de detergente, tal como ocurre con las proteínas marcadoras de glicosomas, reservosomas y mitocondria. Por lo tanto, se sustenta que TcAK no está asociada a estructuras membranosas, lo cual fue corroborado mediante inmunocitoquímica. Existen varios reportes, obtenidos por microscopía en tripanosomátidos, sobre la presencia de proteínas citosólicas con distribución heterogénea. Entre ellas se pueden mencionar las isoformas citosólicas de las malato deshidrogenasas de *T. brucei* y *Leishmania* (Aranda *et al.*, 2006; Leroux *et al.*, 2006), la farnesil difosfato sintasa (Ferella *et al.*, 2008), la fosfoenolpiruvato mutasa (Sarkar *et al.*, 2003) y una proteína homóloga a la actina (TcActin) (De Melo *et al.*, 2008), todas de *T. cruzi*. Estas observaciones indicarían que una localización citosólica heterogénea de proteínas solubles es frecuente en estos organismos. Se podría especular que parte de TcAK se encuentra formando agregados citoplasmáticos en equilibrio con enzima libre y que ante determinadas estímulos, externos o internos, el equilibrio se desplace hacia la agregación o desagregación. Sustentando esta hipótesis, en algunas ocasiones observamos que disminuye el patrón punteado y aumenta el más difuso. Sería interesante poder identificar las condiciones intra y/o extracelulares que regulan este proceso, como así también determinar si existe alguna conexión con la distribución intracelular de la fosfoarginina o con otras proteínas que podrían interactuar con esta AK.

4. LAS NUCLEÓSIDO DIFOSFATO QUINASA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Introducción

Las nucleósido difosfato quinasas (NDPK, EC: 2.7.4.6) son enzimas que cumplen un importante rol en el mantenimiento y balance intracelular de nucleótidos. Catalizan la transferencia reversible de fosfatos de alta energía entre nucleósidos trifosfato y difosfato de acuerdo a la siguiente reacción (Parks, 1973):



Si bien el fosfato de alta energía es suministrado principalmente por el ATP, estas enzimas tienen una amplia especificidad de sustratos y pueden utilizar cualquier otro ribo- o desoxirribonucleótido, de purinas y pirimidinas, con preferencia por la formación de GTP. En la reacción de transferencia está involucrado un mecanismo de ping-pong en donde la enzima se autofosforila en una histidina del sitio catalítico y luego lo transfiere al sustrato difosfato (Lascu y Gonin, 2000). El motivo NDPK que contiene a la histidina catalítica está dada por los residuos N-x-x-H-[GA]-S-D-[GSA]-[LIVMPKNE].

Las NDPKs están ampliamente estudiadas y se encuentran en todos los organismos donde fueron buscadas. Pueden dividirse en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura primaria (Lacombe *et al.*, 2000). El grupo I está conformado por las NDPKs clásicas y mejor caracterizadas tanto en procariotas como en eucariotas. De acuerdo a diferentes estudios estructurales y bioquímicos las NDPKs procariotas tienen una estructura cuaternaria formada por homotetrámeros mientras que las eucariotas por homohexámeros (Janin *et al.*, 2000). A su vez, los monómeros tienen un peso molecular de entre 15 y 18 kDa y están altamente conservados durante la evolución presentando, por ejemplo, un 43% de identidad entre *Escherichia coli* y humanos (Lascu y Gonin, 2000). Por el contrario, el grupo II está formado por NDPKs más divergentes, recientemente encontradas en humanos y en otros organismos como el pepino de mar (Ogawa 1996). En este grupo están incluidas proteínas más largas que

contienen uno o varios dominios canónicos de NDPK y extensiones N- y C- terminal (Lacombe *et al.*, 2000), algunas denominados dominios DM10. Los dominios DM10 fueron descritos por primera vez en *Drosophila melanogaster* y de ahí deriva su denominación. Estos dominios han sido identificados únicamente en dos familias de proteínas, en este subgrupo de NDPKs en el cual aparecen en copia simple, y en otras proteínas no relacionadas en las cuales se encuentran en múltiples copias. Estudios realizados sobre estas últimas indicarían que los dominios DM10 posiblemente participen en la asociación a axonemas (King, 2006), sin embargo, su presencia en NDPKs ha sido poco estudiada y su función es desconocida.

Además de ser enzimas encargadas del mantenimiento intracelular de nucleótidos, las NDPKs fueron asociadas en los últimos años a diversos procesos biológicos. Se las involucró en transducción de señales suministrando GTP para la activación de proteínas G (Bominaar *et al.*, 1993, Randazzo 1992). Debido a que en la reacción enzimática se forma un intermediario fosfohistidina, el fosfato puede ser transferido a diferentes aceptores como otros residuos de histidina, serina o treonina de diferentes proteínas, postulándose su participación en cascadas de señalización celular (Lu *et al.*, 1996; MacDonald *et al.*, 1993; Wagner *et al.*, 1997; Wagner y Vu, 2000). En este contexto, se les atribuyeron funciones en desarrollo, proliferación, diferenciación, metástasis tumoral, apoptosis y movilidad celular (MacDonald *et al.*, 1993, Biggs *et al.*, 1990, Kantor *et al.*, 1993, Postel *et al.*, 1993, Rosegard *et al.*, 1989, Lombardi *et al.*, 2000, Lacombe *et al.*, 2000). Recientemente también se les asignaron diversos roles en el procesamiento de ADN. En humanos fueron caracterizadas ocho isoformas de NDPK (NM23-H1 a H8), de las cuales cinco son capaces de interactuar con ácidos nucleicos. Se postula que NM23-H2 es un factor de transcripción por su capacidad de unirse a secuencias específicas de ADN, y NM23-H1, H5, H7 y H8 presentaron actividad 3'-5' exonucleasa. Estas observaciones junto con el reconocimiento, clivado y modificación estructural de las moléculas de ADN permitieron asociarlas con mecanismos de reparación de ADN (Postel *et al.*, 1993, 2000; Postel, 1999; Yoon *et al.*, 2005). NM23-H1, además, exhibió actividad histidina quinasa (Hartsough *et al.*, 2002). Otras NDPKs de bacterias como *E. coli* y *M. tuberculosis* y plantas también actuaron

sobre ácidos nucleicos (Levit *et al.*, 2002, Saini *et al.*, 2004, Hammargren *et al.*, 2007). En el caso de *M. tuberculosis*, la enzima es secretada y se postula que podría ser un factor de virulencia a través del daño al ADN de la célula hospedadora (Saini *et al.*, 2004). La NDPK de *Pisum sativum* (arveja), ubicada en el espacio intermembrana mitocondrial, podría ser liberada de esa organela durante la muerte celular programada y translocar al núcleo donde ejercería su actividad nucleasa (Hammargren *et al.*, 2007). En diferentes estudios realizados sobre la NM23-H2 y sobre la de *M. tuberculosis* se identificó a un residuo de lisina, la Lys₁₁ y la Lys₁₀ respectivamente para cada proteína, como el aminoácido responsable de esta actividad (Postel, 2003; Kumar *et al.*, 2005).

El análisis de la localización subcelular de las enzimas es un dato importante en la determinación de su función biológica. No llama la atención que las NDPKs, siendo enzimas multifuncionales, hayan sido encontradas en diversos compartimentos subcelulares como citoplasma, núcleo, mitocondria, espacio intermembrana, membrana plasmática y flagelo de distintos organismos (Yoshida y Hasunuma, 2006; Saini *et al.*, 2004; Anderca *et al.*, 2002; Hammargren *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 1995; Patel-King *et al.*, 2004). Tal como se menciona en la Introducción General (Sección I, pag. 31), se ha postulado que estas enzimas participan en las llamadas redes enzimáticas de fosfotransferencia (Dzeja y Terzic, 2003), las cuales transfieren los fosfatos de alta energía comunicando los sitios distantes de producción y consumo de ATP. Desde este punto de vista la distribución de las NDPKs dentro de la célula es también un tema relevante.

En tripanosomátidos las NDPKs presentan particular interés debido a que estos organismos son incapaces de sintetizar purinas *de novo*, por lo tanto dependen de las NDPKs para el reciclado de las mismas y obtención de nucleótidos (Berriman *et al.*, 2005). Esta es una de las razones por la cual se postula que estas enzimas podrían ser potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, las NDPKs no han sido estudiadas en profundidad en estos parásitos. Ulloa y colaboradores purificaron una NDPK soluble que presentó características bioquímicas similares a las canónicas y reportaron la presencia de una actividad NDPK asociada a

fracciones de membrana en epimastigotes de *T. cruzi* (Ulloa *et al.*, 1995). En *T. brucei* se estudió una NDPK similar cuya localización subcelular fue principalmente nuclear y otras dos posibles isoformas fueron identificadas a partir de un análisis proteómico del flagelo (Hunger-Glaser *et al.*, 2000; Broadhead *et al.*, 2006). Finalmente, el gen de una NDPK de *L. major*, homólogo al de *T. brucei*, fue también caracterizado (de Oliveira *et al.*, 2006) y a partir de un estudio de subproteómica se observó que esta proteína es un componente abundante de fracciones microsomales de estos parásitos (de Oliveira *et al.*, 2006). Se reportó también que la proteína ortóloga en *L. amazonensis* es liberada al espacio extracelular interviniendo en la infección de macrófagos (Kolli *et al.*, 2008).

En esta segunda parte de la tesis se abordó el estudio de las NDPKs de *T. cruzi*, investigando en el número de isoformas y análisis funcional de las mismas.

Resultados

Los resultados están divididos en tres grupos principales:

- *Las nucleósido difosfato quinasas de *T. cruzi*;
- *TcNDPK1: Estudio de una nueva actividad y localización subcelular;
- *TcNDPK2: Estudio de la regulación de la expresión, modificación post-traducciona l y localización subcelular.

Las nucleósido difosfato quinasas de *T. cruzi*

La actividad NDPK en epimastigotes de T. cruzi y su localización subcelular por extracción con digitonina

Ulloa y colaboradores en el año 1995 (Ulloa *et al.*, 1995) reportaron por primera vez la actividad NDPK en epimastigotes de *T. cruzi*. Mediante estudios de fraccionamiento subcelular encontraron que dicha actividad se localizaba en la fracción soluble y en menor proporción en fracciones particuladas. Tomando como punto de partida este trabajo, determinamos la localización subcelular de la actividad NDPK en el mismo estadio del parásito, mediante ensayos de extracción con digitonina. El patrón de extracción fue comparado con el obtenido con los marcadores citosólico (piruvato quinasa, PK), mitocondrial (NADP⁺ isocitrato deshidrogenasa, IDH) y glicosomal (hexoquinasa, HK). Como se muestra en la figura 28, a 0,1 mg/ml de digitonina, concentración en la que se detectó el 67% del marcador citosólico, un 29% de la actividad NDPK fue liberada. Con 0,2 mg/ml, cuando la actividad PK fue completamente extraída, la actividad NDPK aumentó al 80% manteniéndose constante a concentraciones mayores de digitonina (Fig. 28). Por su parte, la IDH fue liberada también a 0,2 mg/ml alcanzando casi el 80%, sin embargo llegó al 100% a la máxima

concentración de digitonina ensayada (5 mg/ml) (Fig. 28). Confirmando los resultados encontrados por Ulloa y colaboradores, estas observaciones indicarían, en principio, una localización principalmente citosólica para la actividad NDPK, además de una asociación en menor proporción a alguna estructura intracelular teniendo en cuenta que un 20% de la misma permaneció en la fracción insoluble aún a altas concentraciones del detergente.

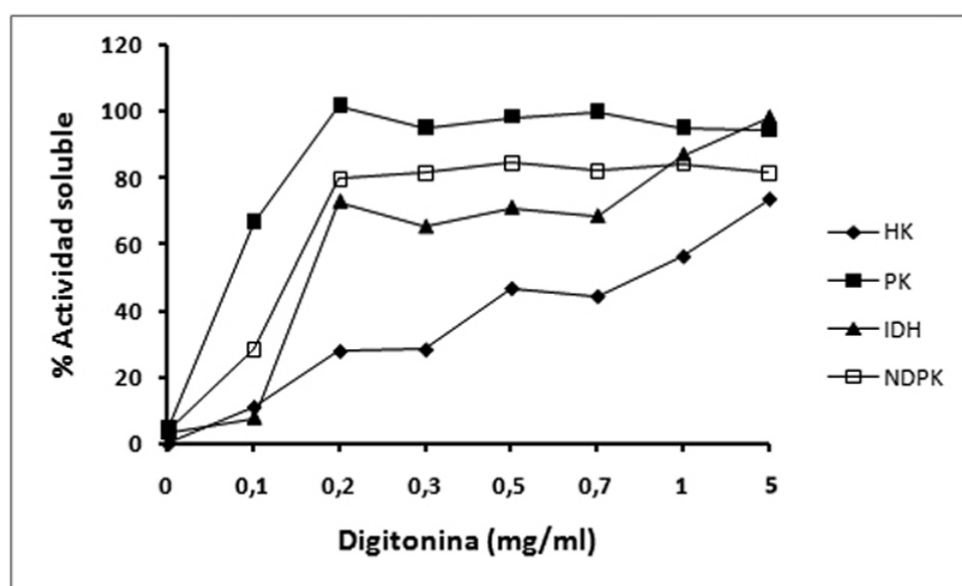


Figura 28: Localización subcelular de la actividad NDPK en epimastigotes de *T. cruzi* mediante extracción con digitonina. Los parásitos fueron tratados con concentraciones crecientes de digitonina (0-5 mg/ml) y se obtuvieron las fracciones solubles (S) e insolubles (P) al detergente. Se grafica el porcentaje de actividad enzimática NDPK liberada a la fracción soluble en cada concentración de digitonina como se detalla en la sección Materiales y Métodos. HK: hexoquinasa, marcador glicosomal; PK: piruvato quinasa, marcador citosólico; IDH: NADP⁺ isocitrato deshidrogenasa, marcador mitocondrial.

Predicción de isoformas de nucleósido difosfato quinasas en *T. cruzi* y en otros tripanosomátidos

Con el objetivo de predecir las posibles isoformas de NDPKs presentes en *T. cruzi* y en otros tripanosomátidos como *T. brucei* y *L. major*, se llevó a cabo una búsqueda de

secuencias en la base de datos GeneDB (utilizando como “carnadas” secuencias de diferentes NDPKs) seguido de un análisis bioinformático, a partir de los datos de los proyectos genoma de estos tres organismos (TriTryps). En *T. cruzi* se pudieron identificar cuatro genes codificantes para posibles NDPKs a las cuales denominamos TcNDPK1 a 4 (Fig. 29). La identidad aminoacídica entre los polipéptidos predichos estuvo en el rango de 6-28% y la similitud entre 18-48%, siendo TcNDPK4 la más divergente en secuencia. TcNDPK1 es la isoforma más corta, con el punto isoeléctrico más alto (pI: 8,5) y presenta las características de NDPKs canónicas. Los otros tres polipéptidos son más ácidos y presentan extensiones N-terminal respecto a la isoforma canónica, mientras que TcNDPK4 contiene además una extensión C-terminal (tabla 1 y Fig. 29). Llamativamente aproximadamente los 88 primeros aa del extremo N-terminal de TcNDPK2 corresponden a un dominio conservado DM10 que, como se mencionó en la Introducción, se encuentra presente en una subfamilia de NDPKs pero su función aún es desconocida. El mismo dominio fue encontrado también en TcNDPK3; aunque la identidad de secuencia de esta región es baja, pueden identificarse puesto que se utilizan programas basados en matrices de perfiles para su predicción (Fig. 29 A). El dominio llamado NDPk_I (definido según la nomenclatura del Pfam) es el clásico dominio que incluye el sitio activo NDPK mientras que el NDPk7B (también definido según el Pfam) está asociado al grupo de NDPKs más divergentes que contienen extensiones como los dominios DM10 antes mencionados.

Los genes ortólogos de estas enzimas también fueron encontrados en el genoma de *T. brucei* y *L. major*, excepto que en este último la isoforma 4 no está presente (tabla 1). Las proteínas homólogas a TcNDPK1 en estos organismos han sido previamente estudiadas por abordajes bioquímicos, presentando ambas las características comunes a las NDPKs clásicas. Además, la de *T. brucei* presentó una localización principalmente nuclear (Hunger-Glaser *et al.*, 2000; Oliviera *et al.*, 2006).

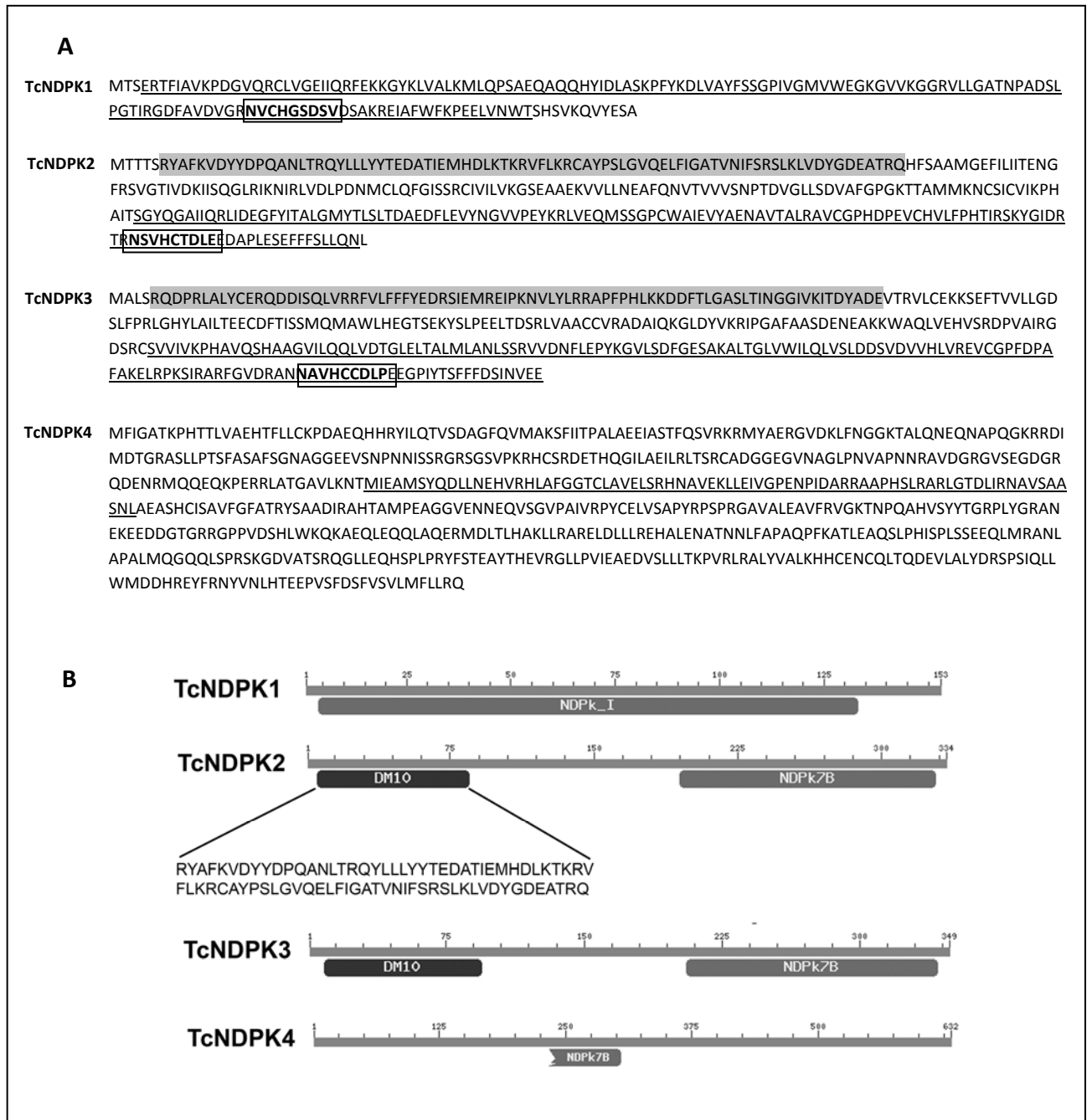


Figura 29: Cuatro posibles isoformas de las NDPKs encontradas en el genoma de *T. cruzi* (TcNDPK1 a 4).

A) Secuencias proteicas. Se resaltan los sitios que incluyen la histidina catalítica (resaltado y recuadrado), los dominios NDPK (aminoácidos subrayados) y los dominios DM10 (aminoácidos en gris). Notar que TcNDPK4 es la isoforma putativa más divergente y carece de sitio catalítico conservado. B) Esquema de las cuatro isoformas. Se muestran las regiones correspondientes a los dominios NDPK y a los dominios DM10. Se indica además la secuencia correspondiente al dominio DM10 de TcNDPK2.

Tabla 1

Nombre	Long	pI	KDa	No. Acc.	<i>L. major</i>	<i>T. brucei</i>
TcNDPK1	153	8,52	16,9	Tc00.1047053508707.200	LmjF32.2950	Tb11.01.7800
TcNDPK2	334	5,34	37,3	Tc00.1047053508461.400	LmjF35.3870	Tb09.211.2560
TcNDPK3	349	5,24	39,1	Tc00.1047053510879.210	LmjF34.2980	Tb927.4.1720
TcNDPK4	600	6,66	69,9	Tc00.1047053508989.100	-	Tb927.8.4510

Tabla 1: Isoformas de NDPK en *T. cruzi* y sus ortólogas en *L. major* y *T. brucei*. Se indican la longitud (aa), punto isoeléctrico (pI) y peso molecular predichos para las NDPKs de *T. cruzi* y los números de acceso de todas las proteínas.

Clonado y caracterización bioquímica de TcNDPK1 y TcNDPK2

De las cuatro posibles isoformas, dos fueron elegidas para la caracterización bioquímica y molecular, la isoforma canónica, TcNDPK1, y una de las variantes “largas” con dominio DM10, TcNDPK2. Los genes fueron amplificados por PCR y clonados en un vector de expresión para *E. coli* como se describe en la sección materiales y métodos. Ambas proteínas recombinantes, purificadas por cromatografía de afinidad (Fig. 30 A), presentaron actividad enzimática en presencia de ATP y dTDP como sustratos, validándose por lo tanto como NDPKs *bona fide*. Las constantes de Michaelis-Menten (K_m) fueron calculadas para el dTDP mediante un gráfico de inversas de Lineweaver-Burk y fueron de 0,86 mM y 0,47 mM para TcNDPK1 y TcNDPK2 respectivamente (Fig. 30 B y C). No se observó inhibición por sustrato en el caso de TcNDPK1, mientras que TcNDPK2 fue fuertemente inhibida a altas concentraciones de dTDP. Según los criterios de la bioquímica clásica, estos resultados indicarían que esta isoforma podría contener un segundo sitio de unión al sustrato inhibitorio y de baja afinidad que actuaría como un mecanismo regulatorio (Fig. 31).

Para asegurarnos que en las fracciones de las proteínas recombinantes purificadas no hubiese actividad NDPK bacteriana contaminante, se realizaron controles con eluidos provenientes de bacterias que no expresaban proteína y no se detectó actividad enzimática.

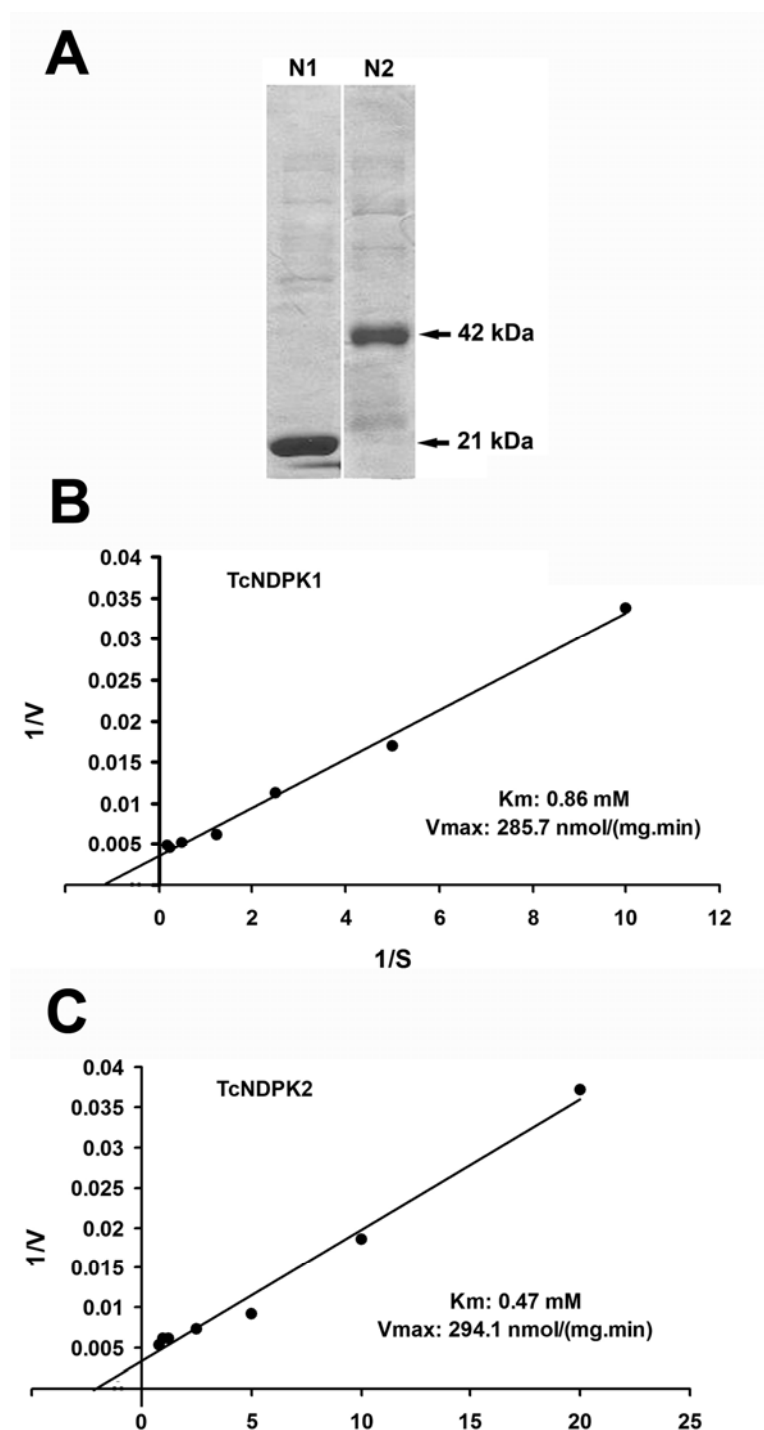


Figura 30: Caracterización bioquímica de TcNDPK1 y TcNDPK2. A) SDS-PAGE teñido con azul de coomasie de las muestras de TcNDPK1 (N1) y TcNDPK2 (N2) purificadas. B) y C) Gráficos de inversas: Determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmax para el dTDP para TcNDPK1 y TcNDPK2 respectivamente.

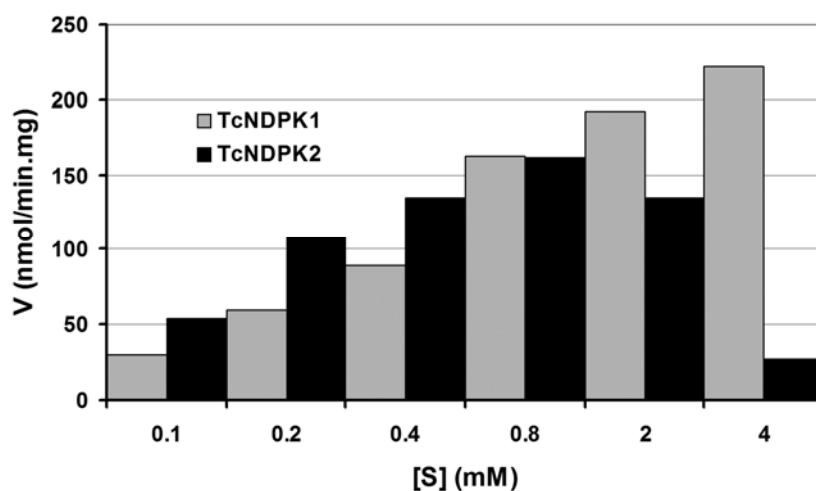


Figura 31: Regulación por sustrato de la actividad NDPK. Se observa que a diferencia de TcNDPK1, TcNDPK2 es inhibida a altas concentraciones de dTDP.

Expresión de TcNDPK1 y TcNDPK2 en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*

Con el objetivo de evaluar la expresión de TcNDPK1 y TcNDPK2 en los tres estadios del parásito, se produjeron anticuerpos policlonales en ratones inmunizados con ambas proteínas recombinantes y llevamos a cabo un WB sobre extractos proteicos totales de epimastigotes, tripomastigotes de cultivo y amastigotes. En la figura 32 puede observarse que TcNDPK1 pudo ser detectada en tripomastigotes y amastigotes mientras que en epimastigotes la banda está presente pero con una señal de muy baja intensidad (Fig. 32). Siete sueros anti-TcNDPK1 independientes fueron evaluados, todos de muy baja calidad. Es posible que las deficiencias de los antisueros obtenidos se deban a la baja antigenicidad de la proteína, lo cual fue predicho mediante un análisis bioinformático (<http://tdrtargets.org/>) y esto explicaría, tal vez, la incapacidad de los sueros de detectar bajos niveles de esta enzima. Por su parte, TcNDPK2 es expresada en niveles similares en los tres estadios. Llamativamente, TcNDPK2 presentó un peso molecular aparente más elevado que el teórico, 20 kDa mayor, indicando que podría estar modificada post-traduccionamente.

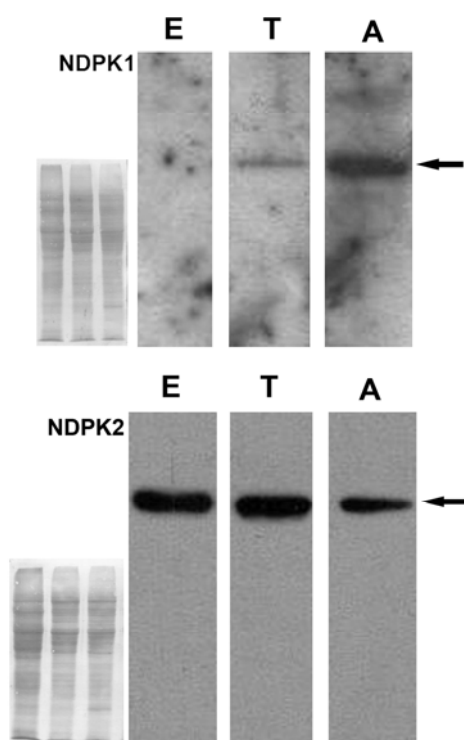


Figura 32: Expresión de TcNDPK1 y TcNDPK2 en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*: epimastigote (E), tripomastigote (T) y amastigote (A). A la derecha de cada WB se muestra el patrón de proteínas sobre la membrana teñido con rojo ponceau antes de realizar las incubaciones con los sueros específicos.

TcNDPK1: Estudio de una nueva actividad y localización subcelular

Caracterización de la actividad nucleasa de TcNDPK1

En los últimos años fueron publicados algunos trabajos reportando la capacidad de las NDPKs de modificar ácidos nucleicos. Con el objetivo de evaluar esta novedosa actividad, se realizaron ensayos *in vitro* que consistieron en incubar moléculas de ADN con la enzima recombinante según se describe en la sección de materiales y métodos. En ensayos preliminares observamos que sólo TcNDPK1 y no TcNDPK2 presentó una actividad nucleasa.

Con la finalidad de caracterizar la actividad nucleasa de TcNDPK1, en primera instancia se utilizó como sustrato un ADN plasmídico linealizado, probándose diferentes tiempos de incubación y cantidades de enzima. Estos ensayos mostraron

que la degradación es dependiente del tiempo de incubación y de la cantidad de proteína utilizada (Fig. 33 A y B).

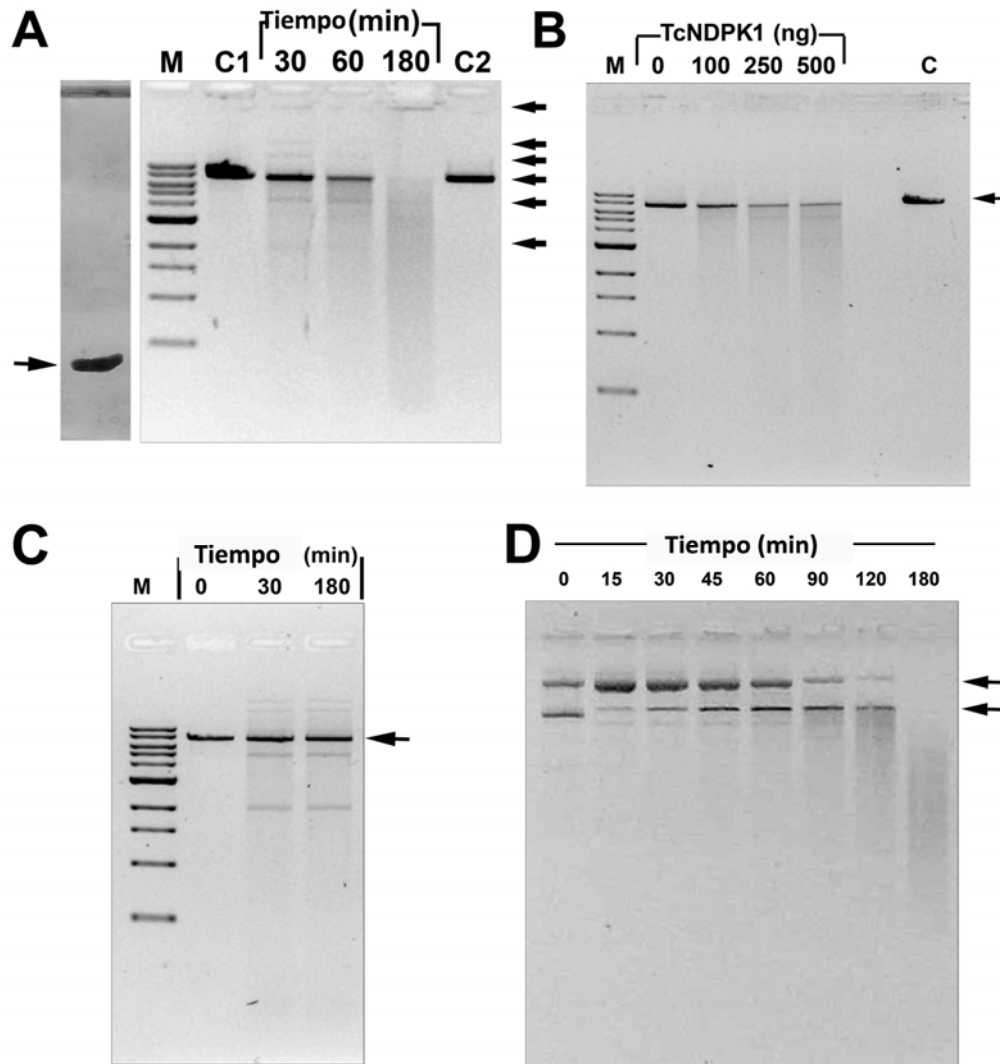


Figura 33: Capacidad de TcNDPK1 de degradar diferentes sustratos de ADN. A) Degradación de ADN lineal en función del tiempo de incubación. 300 ng de ADN fueron incubados con 500 ng de enzima a 37°C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. A la izquierda se muestra en un SDS-PAGE la pureza de las muestras de TcNDPK1 utilizadas. Las flechas indican los diferentes tamaños de las bandas obtenidas. B) Degradación de ADN lineal en función de la cantidad de enzima. 300 ng de ADN fueron incubados con diferentes cantidades de proteínas durante 3 hs a 37°C. C) Incubación de la reacción en hielo (ídem A). D) Degradación de ADN superenrollado en función del tiempo (ídem A). Las flechas marcan el plásmido y sus diferentes estructuras y cantidades relativas. M: marcador de peso molecular; C: ADN sin incubación; C1: incubación de ADN sin enzima; C2: incubación de ADN con 500 ng de TcNDPK2.

Todo el sustrato fue consumido a las 3 hs con 500 ng de enzima; a tiempos o cantidades menores de enzima las digestiones fueron incompletas. Durante el transcurso de la reacción, pudieron observarse diferentes estructuras plasmídicas; es interesante que algunas de ellas correspondieron a bandas de menor movilidad comparada con la del sustrato (Fig. 33 A, flechas), sugiriendo la formación de algún intermediario ADN-enzima. Tal como ocurrió con el sustrato linealizado, el plásmido superenrollado también fue degradado completamente por TcNDPK1 (Fig. 33 D).

Teniendo en cuenta que TcNDPK2 no presentó actividad nucleasa, fue utilizada como control en los diversos ensayos. Otros controles consistieron en la incubación de la reacción sin enzima o en hielo (Fig. 33 C). En todos los casos el ADN sustrato permaneció sin alteraciones.

Por otro lado, para asegurarnos que no hubiera alguna nucleasa de *E. coli* contaminante en la muestra de TcNDPK1, se realizaron también controles con muestras provenientes de bacterias transformadas con el vector de expresión vacío obtenidas en las mismas condiciones que nuestra proteína y no hubo alteración del sustrato. Cabe aclarar además, que la pureza de TcNDPK1 fue también confirmada por HPLC (ver Materiales y Métodos).

Estos resultados demuestran que TcNDPK1 es capaz de degradar ADN lineal y superenrollado de manera tiempo, proteína y temperatura dependiente.

Para evaluar si TcNDPK1 tiene la capacidad de degradar moléculas de ADN más largas, como así también el propio ADN genómico, se llevó a cabo el mismo ensayo descrito en la sección Materiales y Métodos utilizando como sustrato ADN extraído de parásitos (Fig.34). Como puede observarse en la figura 34 la enzima lo degradó completamente en los tiempos indicados en la figura. Los controles consistieron en la utilización de TcNDPK2 y en la incubación sin proteína. Debido a la dualidad de actividades (NDPK y nucleasa) encontrada en TcNDPK1, quisimos evaluar si la actividad nucleasa está regulada por sustratos de la actividad fosfotransferasa. Para ello se realizaron ensayos agregando a la reacción nucleósidos di- o trifosfato, en este caso se utilizaron ADP o ATP. Llamativamente los nucleótidos no afectaron la actividad nucleasa, sugiriendo que las actividades de quinasa y nucleasa son independientes

entre sí a diferencia de lo que ocurre con otras NDPKs (Fig. 35 A). Por el contrario, la ausencia de Mg^{2+} anuló la actividad nucleasa (Fig. 35 A) como ocurre con la mayoría de estas enzimas. A su vez, la actividad de TcNDPK1 fue comparable con la de una nucleasa comercial, la DNAsal (Invitrogen).

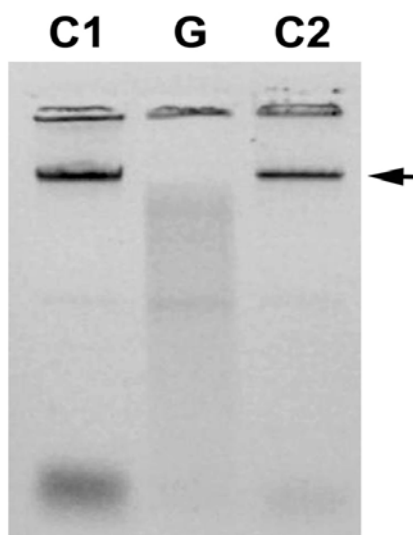


Figura 34: Capacidad de TcNDK1 de degradar ADN genómico de *T. cruzi*. 500 ng de TcNDPK1 fue incubada con 300 ng ADN durante 3 hs a 37°C. C1: incubación sin proteína; G: reacción con ADN genómico; C2: incubación con 500 ng de TcNDPK2.

Bajo las mismas condiciones de reacción y usando diferentes cantidades de enzima (de 2×10^{-2} a 2×10^{-5} unidades), la actividad específica fue estimada en 0,9 ng ADNdc/min.ng enzima mientras que la obtenida para TcNDPK1 fue de 0,06 ng ADNdc/min.ng enzima, casi un orden menos (Fig. 35 B). Estos resultados sugieren que TcNDPK1 tendría una función de nucleasa de alta actividad.

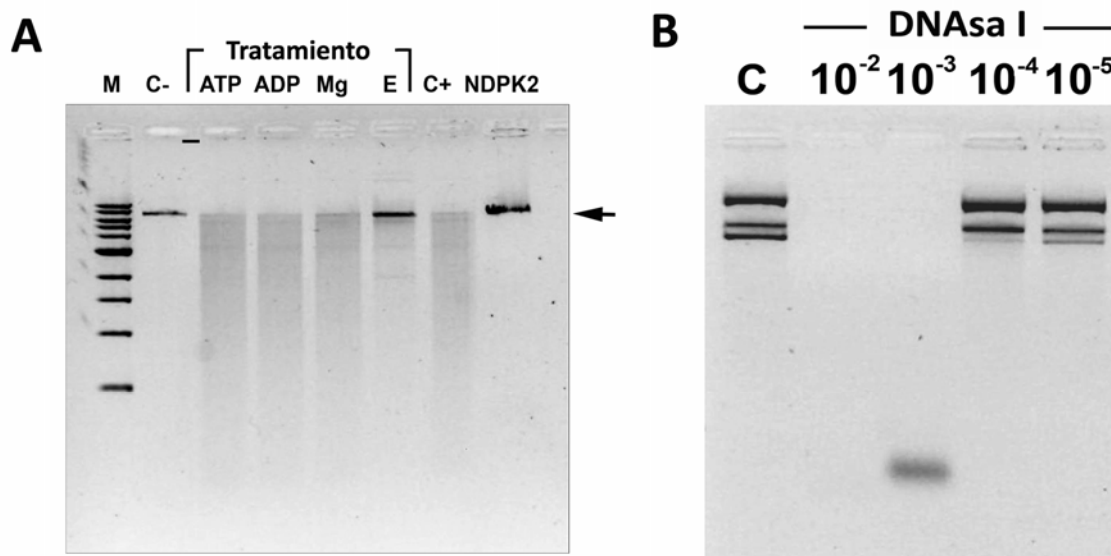


Figura 35: Requerimientos de la actividad nucleasa de TcNDPK1 (A) y comparación con DNAsaI comercial (B). A) Los ensayos fueron realizados en las condiciones estándar con el agregado de 5 mM de ATP (ATP), 5 mM de ADP (ADP) o 5 mM de EDTA (E) y su respectivo control con magnesio (Mg). B) Los ensayos estándares de nucleasa fueron realizados con diferentes cantidades de DNAsaI. M: marcador de peso molecular; C-: ensayo estándar sin enzima; C+: ensayo estándar; NDPK2: ensayo estándar con TcNDPK2.

Para determinar si las actividades nucleasa y quinasa se encuentran determinadas por dominios estructurales comunes dentro de la proteína se estudió el efecto de la temperatura sobre las mismas. El objetivo fue desnaturalizar gradualmente la proteína y evaluar si ambas actividades catalíticas se anulaban en la misma condición. TcNDPK1 fue pre-tratada a diferentes temperaturas (50°C, 60°C, 70°C y 80°C) y luego ensayada en cuanto a su capacidad de degradar ADN y a su actividad NDPK. En la figura 36 puede observarse que existe una correlación entre las dos actividades, variando en forma proporcional a las mismas temperaturas, siendo inhibidas completamente a partir de los 60°C. Estos resultados sugerirían que dominios intramoleculares iguales o cercanos estarían involucrados en ambas actividades catalíticas.

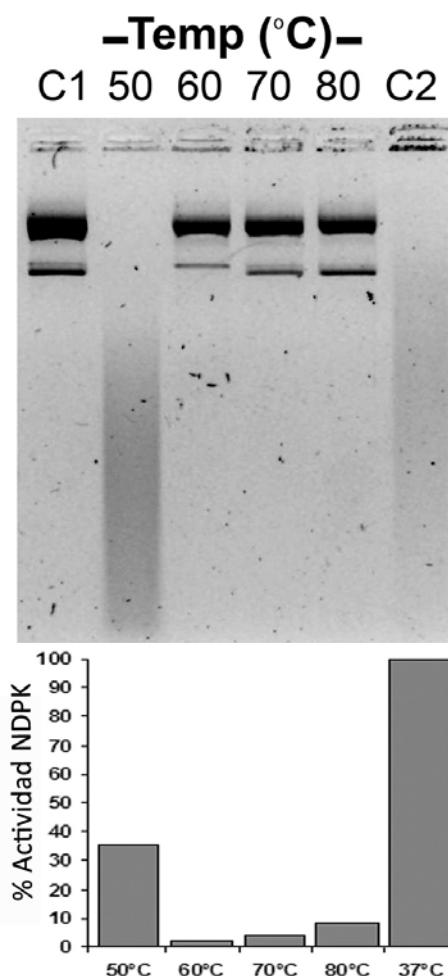


Figura 36: Efecto de la temperatura sobre las actividades nucleasa (panel superior) y NDPK (panel inferior) de TcNDPK1. La enzima fue sometida durante 10 min a diferentes temperaturas entre 50 y 80°C y evaluada para la actividad nucleasa en las condiciones de ensayo estándar, y para la actividad NDPK según se describe en materiales y métodos. C1: control sin enzima; C2: ensayo estándar incubando a 37°C (control).

Comparación de la secuencia de TcNDPK1 con otras NDPKs con actividad nucleasa

En diversos estudios sobre NM23-H2, una NDPK humana con actividad nucleasa, fue reportado que el residuo Lys₁₂ es el aminoácido responsable de dicha actividad (Postel, 2003). Con el objetivo de analizar la presencia de este residuo en TcNDPK1 y su conservación en diferentes proteínas homólogas de especies evolutivamente distantes, se realizó un alineamiento global entre NDPKs con actividad nucleasa reportada. Como era de esperar, la lisina está conservada en todas las proteínas

analizadas (Lys₁₁ en TcNDPK1, Fig. 37 A, flecha). Sin embargo, en un alineamiento entre TcNDPK1 y TcNDPK2, se observó que la lisina está también presente en esta segunda isoforma que carece de actividad nucleasa (Lys₂₀₂), indicando que otros aminoácidos estarían también involucrados en esta función (Fig. 37 B).

En un fenograma construido a partir de NDPKs de diversos organismos con o sin actividad nucleasa reportada, TcNDPK1 estuvo más cercana a la equivalente de *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens* (NM23-H2) (Fig. 37 C).

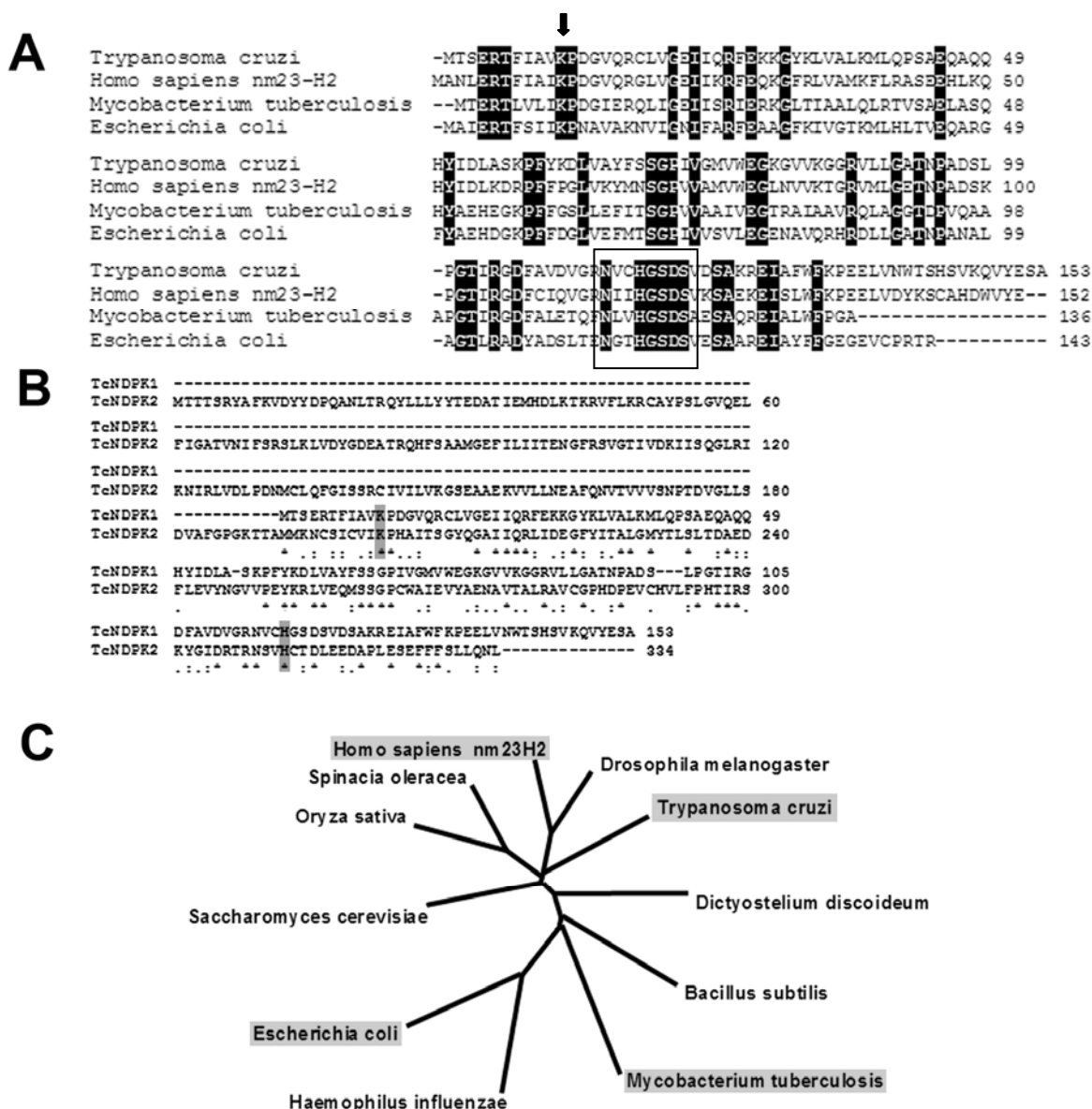


Figura 37: Comparación entre NDPKs de diferentes organismos. A) Alineamiento global de TcNDPK1 con NDPKs con actividad nucleasa reportada de organismos evolutivamente distantes. La flecha señala la

lisina responsable de dicha actividad. En el recuadro se muestra la región correspondiente a la actividad quinasa incluyendo a la His catalítica. B) Alineamiento global entre TcNDPK1 y TcNDPK2. Se resaltan la Lys involucrada en la actividad nucleasa y la His involucrada en la actividad NDPK. C) Fenograma de diversas NDPKs construido a partir de la similitud de secuencias. Se marcan los organismos cuyas NDPKs presentaron actividad nucleasa.

La sobre-expresión de TcNDPK1 y la resistencia al benznidazol

En trabajos de proteómica se reportó que cepas de *T. cruzi* de laboratorio y aisladas de pacientes que eran resistentes al BZL tenían aumentados los niveles de TcNDPK1 (Andrade *et al.*, 2008), sugiriendo la participación de TcNDPK1 en dicha resistencia. Como el BZL es una droga que actúa uniéndose a macromoléculas causando daño al material genético, esta resistencia observada podría estar relacionada de alguna manera con la capacidad de TcNDPK1 de interactuar con ácidos nucleicos, como por ejemplo, en procesos de reparación. Para confirmar las observaciones, generamos epimastigotes transgénicos transfectándolos con el vector pTREX-TcNDPK1 para que sobre-expresen la enzima, los expusimos a concentraciones crecientes de BZL y evaluamos su capacidad de supervivencia. Estos parásitos que presentaban aproximadamente seis veces más actividad NDPK, fueron significativamente más resistentes al tratamiento con BZL que los parásitos control (pTREX-GFP) a 1,25 y 7,5 μ M de la droga (Fig. 38). En conjunto estas observaciones indicarían que TcNDPK1 está involucrada en la resistencia al BZL, aunque resta confirmar que esté relacionada a su actividad nucleasa.

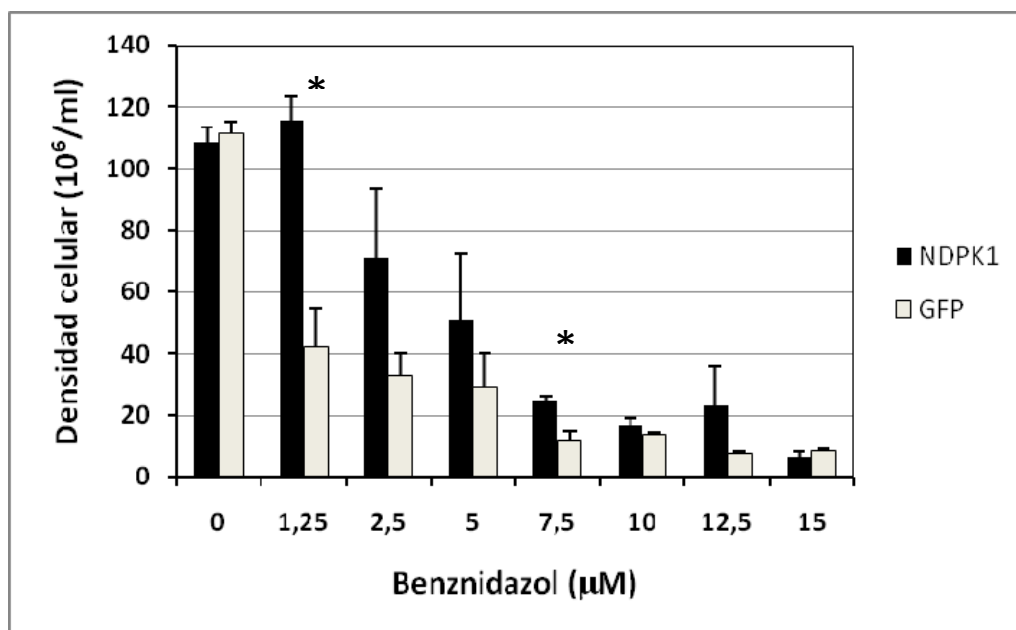


Figura 38: La sobre-expresión de TcNDPK1 y la resistencia al benznidazol(BZL). Parásitos sobre-expresando TcNDPK1 y GFP (N1 y GFP respectivamente) fueron incubados con concentraciones crecientes de BZL en medio de cultivo LIT y contados durante 7 días. Se muestra la densidad celular al día 5 de cultivo. *: Concentraciones a las cuales se observaron diferencias significativas entre los dos grupos por el test de Student.

Localización subcelular de TcNDPK1

Teniendo en cuenta la actividad nucleasa de TcNDPK1 y que la ortóloga en *T. brucei* fue previamente encontrada en el núcleo de los parásitos (Hunger-Glaser *et al.*, 2000), estudiamos la localización subcelular de esta isoforma en epimastigotes de *T. cruzi*. Puesto que los anticuerpos obtenidos contra TcNDPK1 no resultaron adecuados para inmunofluorescencia, la localización subcelular fue estudiada mediante la fusión a eGFP (N1-eGFP) hacia el C-terminal y sobre-expresada en parásitos. Como control se utilizaron parásitos que sobre-expresaban eGFP sola. Las dos líneas celulares expresaron niveles altos de las proteínas correspondientes (Fig. 39).

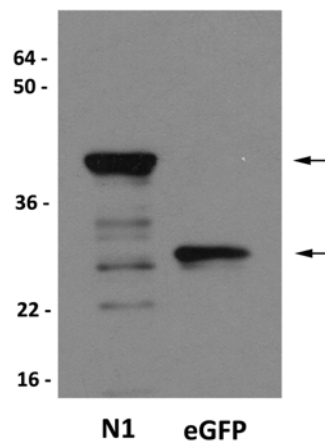


Figura 39: Expresión de las líneas de parásitos transgénicas. WB contra GFP sobre extractos proteicos totales. Las flechas señalan las proteínas N1-eGFP (N1, 44 KDa) y eGFP (27 KDa). A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular.

Llamativamente cuando los parásitos fueron observados al microscopio de fluorescencia, N1-eGFP localizó exclusivamente en un único compartimento de forma redondeada, que no era el núcleo, ubicado principalmente en la región anterior del parásito cerca del bolsillo flagelar. A su vez estas organelas presentaron diferentes tamaños, las más grandes pudieron ser observadas mediante contraste de fase (Fig. 40, N1-eGFP, flechas). Por el contrario, en el control se observó el patrón citosólico típico de la eGFP sola (Fig. 40, eGFP).

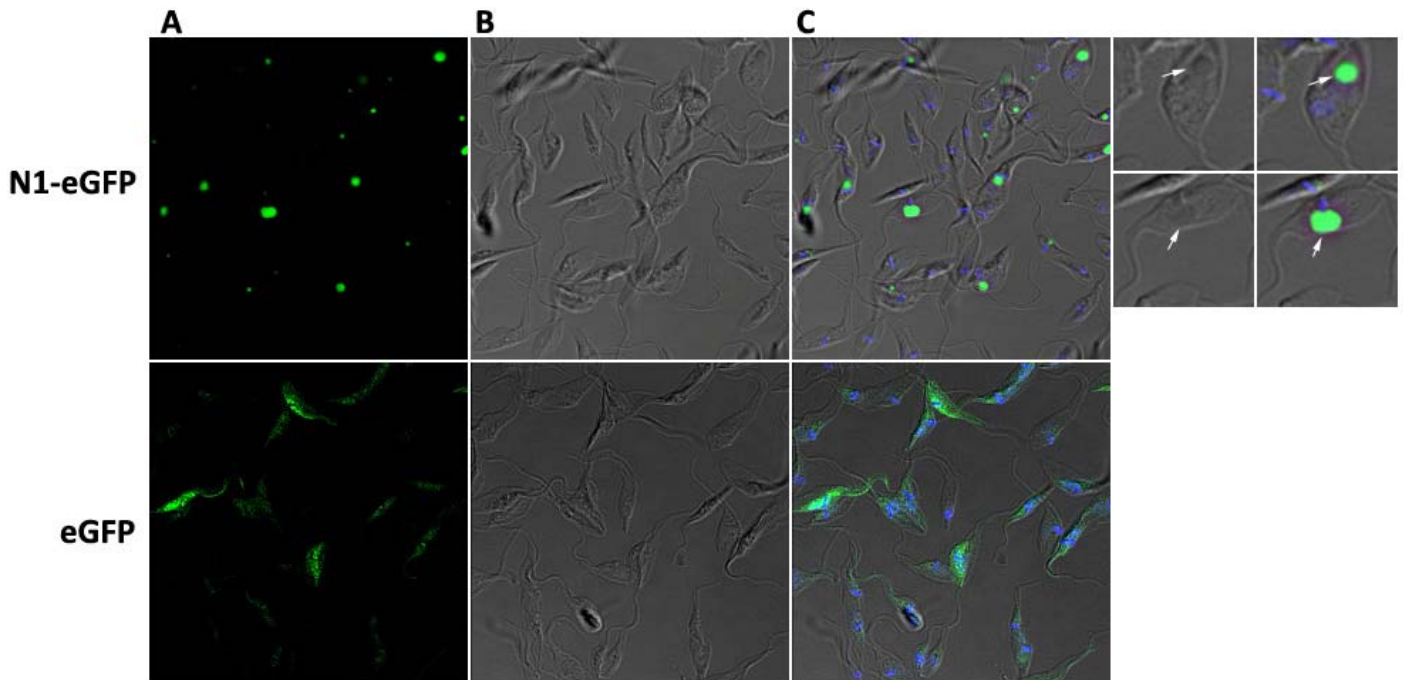


Figura 40: Localización subcelular de TcNDPK1 mediante la fusión a eGFP. La proteína de fusión fue sobre-expresada en epimastigotes utilizando el vector pTREX. Los parásitos fueron fijados y observados directamente al microscopio. A: fluorescencia de la eGFP; B: contraste de fase; C: superposición de A, B y núcleos teñidos con DAPI. Arriba a la derecha se muestra una ampliación de parásitos N1-eGFP.

Como en los tripanosomátidos el complejo de la vacuola contráctil está cerca del bolsillo flagelar exploramos la posibilidad de que TcNDPK1 estuviera localizada en esta estructura y llevamos a cabo ensayos de co-localización utilizando como enzima marcadora una acuaporina de *T. cruzi* (TcAQP) ubicada en la vacuola y en los acidocalcisomas (Montalvetti *et al.*, 2004). En la figura 41 puede observarse que efectivamente N1-eGFP co-localizó con este marcador sugiriendo una localización de TcNDPK1 en el complejo de la vacuola contráctil (Fig. 41).

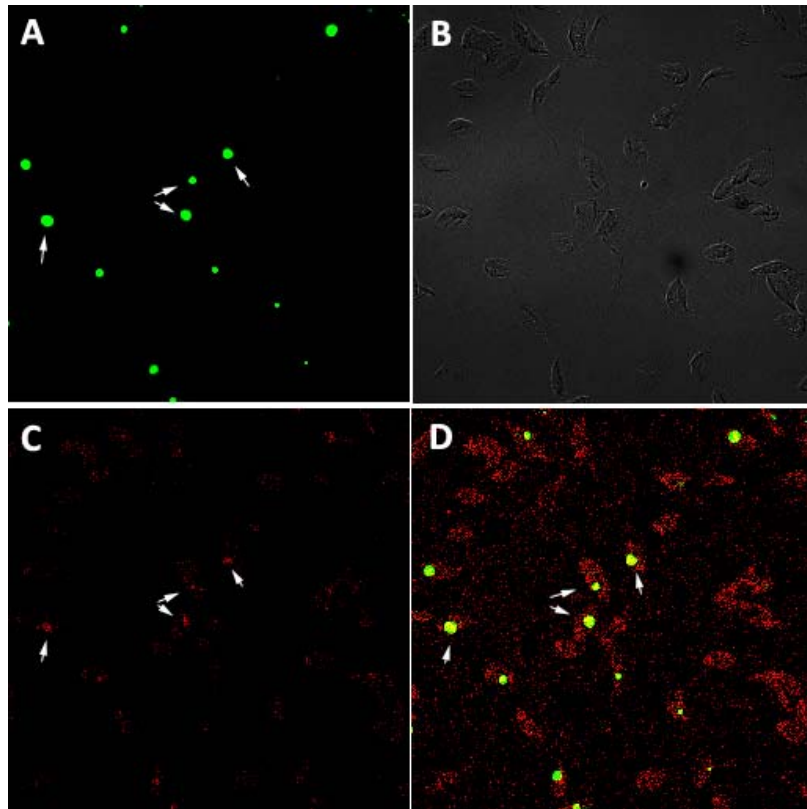


Figura 41: Co-localización de N1-eGFP con la vacuola contráctil. Los parásitos fueron fijados, permeabilizados e incubados con anticuerpos contra la acuaporina vacuolar y anticuerpos secundarios anti-conejo Alexa 546 y observados al microscopio confocal de fluorescencia. A: eGFP; B: contraste de fase; C: TcAQP y D: superposición de A, B y C. Las flechas señalan algunas de las co-localizaciones.

Debido a que la vacuola contráctil está involucrada en la osmorregulación en *T. cruzi* (Rohloff y Docampo, 2008), decidimos investigar si en estos parásitos transgénicos la presencia de vacuolas de mayor tamaño tenía alguna funcionalidad. Para ello los epimastigotes fueron sometidos a estrés hiposmótico en PBS diluido 1:4 en agua destilada (aproximadamente 75 mOsm), recuperados en PBS y observados al microscopio a diferentes tiempos. El shock hiposmótico provocó un cambio en la morfología por aumento en el volumen de los parásitos y sorprendentemente N1-eGFP fue ahora localizada en numerosas y pequeñas vesículas distribuidas por todo el citoplasma, que podrían asemejarse a acidocalcisomas (Fig. 42). Luego del estrés, los parásitos recuperaron la forma y se observaron vesículas de mayor tamaño y en menor cantidad que permanecieron hasta los 60 min post-tratamiento. Por el contrario, en los parásitos control (eGFP) la proteína eGFP no modificó su localización, solamente se

redondearon por efecto del estrés (Fig. 42). Estos resultados confirman la localización de TcNDPK1 en la vacuola, muestran la funcionalidad de esta organela y sugieren una posible participación de esta enzima en la osmorregulación.

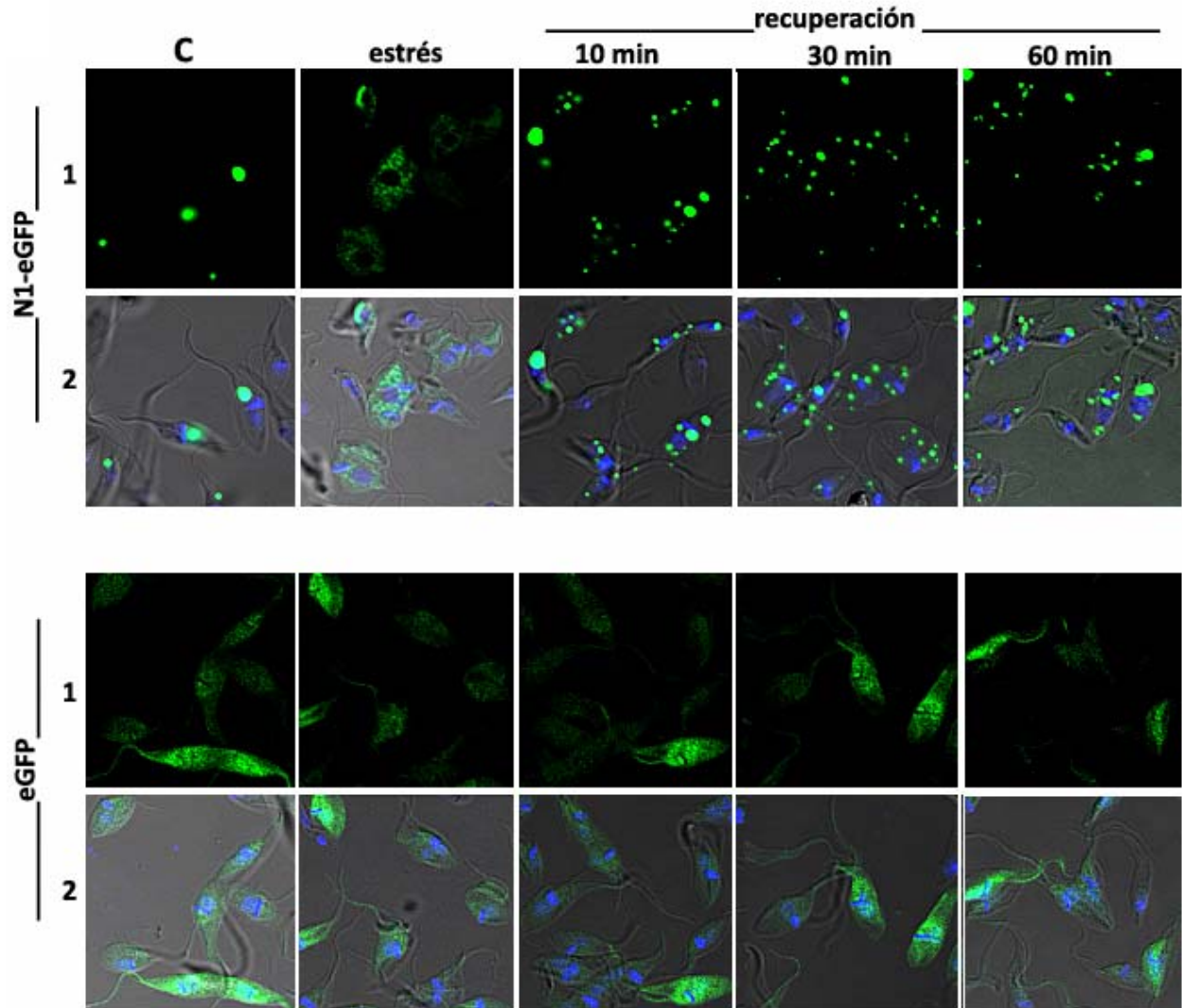


Figura 42: Comportamiento de N1-eGFP frente al estrés hiposmótico. Los parásitos fueron tratados con PBS diluido durante 10 min (estrés), recuperados con PBS y observados al microscopio a los tiempos indicados. C: control sin tratamiento. Fila 1: fluorescencia de la N1-eGFP o eGFP; fila 2: superposición entre N1-eGFP o eGFP con el contraste de fase y núcleos (DAPI). Por las limitaciones de seguir a un único parásito se reporta el comportamiento a nivel poblacional.

TcNDPK2: estudio de la regulación de la expresión, modificación post-traducciona y localización subcelular

Regulación de la expresión en epimastigotes

Con el objetivo de estudiar la regulación de la expresión durante las fases del crecimiento de epimastigotes en cultivo, en donde la composición, los nutrientes, la densidad celular y el pH varían con el tiempo, se tomaron muestras de parásitos a partir del día 1 hasta el día 8 que fueron analizadas por WB. La expresión de TcNDPK2 aumentó continuamente durante la fase logarítmica, alcanzando su máximo al día 5 de cultivo y disminuyendo luego en la fase estacionaria (Fig. 43). Además de haberse sembrado igual número de parásitos proveniente de los diferentes días de cultivo, como control, se analizó la expresión de PAR2, una proteína estructural que forma parte de la PFR (Fig. 43) (Saborio *et al.*, 1989).

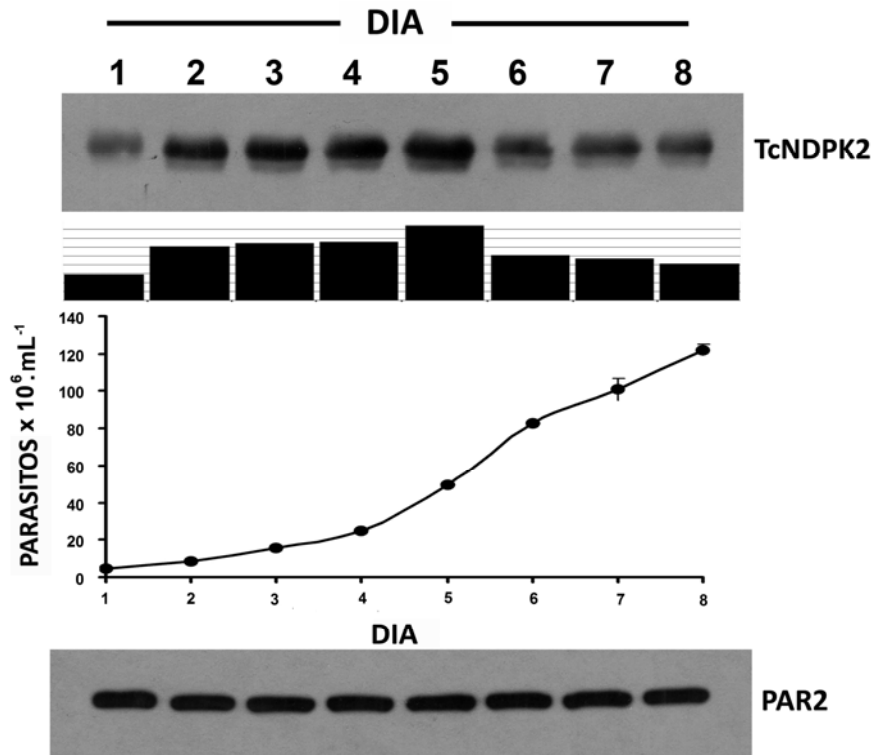


Figura 43: Expresión de TcNDPK2 en las fases del crecimiento en cultivo de epimastigotes. A partir de un cultivo inicial con 10⁶ células/ml, cuya densidad celular fue seguida a través de los días, se tomaron

alícuotas provenientes de los días 1 a 8 con iguales cantidades de parásitos las cuales fueron analizadas por WB. Panel superior: WB anti TcNDPK2. Debajo se muestra la cuantificación por densitometría de las señales obtenidas. Panel intermedio: curva de crecimiento del cultivo. Panel inferior: WB anti-PAR2.

Estudio de la modificación post-traducciona

Como se mencionó anteriormente, TcNDPK2 posee un peso molecular aparente superior al esperado. A partir del análisis de la secuencia usando herramientas del sitio ExPASy (www.expasy.ch/) se predijeron tres sitios posibles de N-glicosilación (Asn₁₉, Asn₁₆₅ y Asn₁₉₅) como así también varios sitios putativos de fosforilación en tirosina, treonina y serina (Tyr₁₃, Tyr₂₂₄, Thr₄, Thr₄₂, Thr₁₀₈, Ser₂₃₄ y Ser₃₁₀). Para investigar la presencia de estas modificaciones se trataron extractos proteicos totales de parásitos con las enzimas endoglicosidasa H o fosfatasa alcalina y se analizaron por WB. En la figura 44 puede observarse que no hubo diferencias en la movilidad de la enzima con los tratamientos sugiriendo que no está N-glicosilada ni fosforilada (Fig. 44 calles 2 y 5).

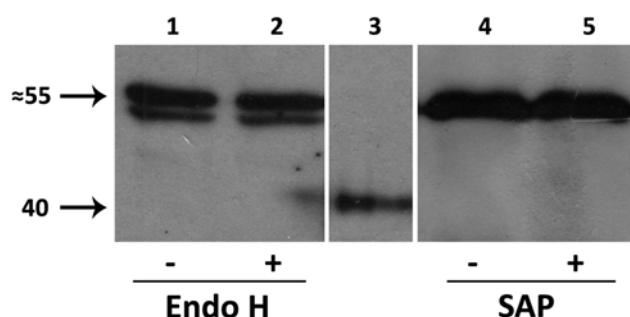


Figura 44: WB para el estudio de la posible modificación post-traducciona de TcNDPK2. Panel izquierdo: con o sin tratamiento con endoglicosilasa H (Endo H, calles 2 y 1 respectivamente). Panel derecho: con o sin tratamiento con fosfatasa alcalina (SAP, calles 5 y 4 respectivamente). Calle 3: TcNDPK2 recombinante (con agregado de 6xHis). Se indican los pesos moleculares de las respectivas proteínas.

Ninguna otra modificación post-traducciona fue predicha mediante el mismo abordaje bioinformático, no se encontraron sitios de miristoilación, palmitoilación, farnesilación, sumoilación ni de unión a GPI. Por otro lado, una posibilidad es que el incremento en el peso molecular de TcNDPK2 estuviera relacionado con la región reguladora 5'UTR del ARNm; una hipótesis puede ser que el *trans-splicing* ocurra en un sitio río arriba, generando un codón de iniciación y dando como resultado una proteína

más larga. Si bien no existen antecedentes sobre estas especulaciones, este punto será retomado más adelante (Ver Función del dominio DM10 y modificación post-traducciona, Pag. 93).

Localización subcelular

Con el objetivo de estudiar la localización subcelular de TcNDPK2, inicialmente se realizaron WB sobre las muestras obtenidas a partir de la extracción con digitonina. El patrón de extracción fue comparado con el de enzimas marcadoras de citosol (NADP⁺ glutamato deshidrogenasa), glicosomas (hexoquinasa), reservosomas (cruzipaína), flagelo (PAR2) y mitocondria (aspartato aminotransferasa). En la figura 45 puede observarse que TcNDPK2 comienza a ser extraída a 0,1 mg/ml de digitonina al igual que el marcador citosólico y permanece asociada a las fracciones insolubles (pellets) hasta altas concentraciones de detergente como ocurre con los marcadores de los demás compartimentos intracelulares (Fig. 45). Estas observaciones indicarían que TcNDPK2 localiza en el citosol y también en alguna estructura u organela no identificada.

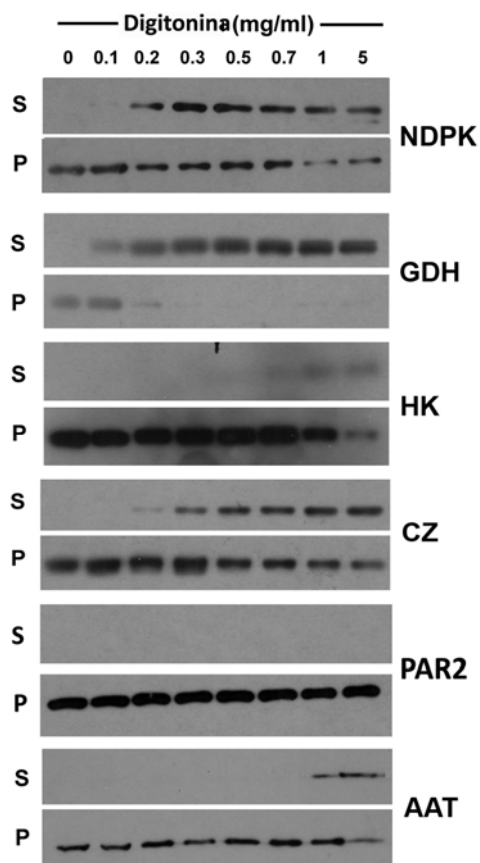


Figura 45: Localización subcelular de TcNDPK2 mediante extracción con digitonina. Los parásitos fueron tratados con concentraciones crecientes de digitonina (0-5 mg/ml) y las fracciones solubles (S) e insolubles (P) al detergente fueron analizadas por WB. NDPK: TcNDPK2; GDH: NADP⁺ glutamato deshidrogenasa (marcador citosólico); HK: hexoquinasa (marcador glicosomal); CZ: cruzipaína (marcador de reservosomas); PAR2 (marcador de flagelos); AAT: aspartato aminotransferasa (marcador mitocondrial).

Estos resultados junto con la detección de un 20% de actividad NDPK en las fracciones insolubles a altas concentraciones de digitonina y que la proteína ortóloga a TcNDPK2 de *T. brucei* fue hallada en el flagelo de este organismo mediante un estudio de proteómica, nos llevaron a pensar que TcNDPK2 podría estar asociada al flagelo del parásito. Para corroborar esta hipótesis se purificaron flagelos y se analizaron por WB. El protocolo consiste en dos extracciones sucesivas con NP-40 seguido por otras dos extracciones con NaCl 1M (las altas concentraciones de sal despolimerizan los microtúbulos subpeliculares) hasta obtener en el pellet final la fracción flagelar. Todas las fracciones obtenidas en la purificación también fueron analizadas (Fig. 46 A). TcNDPK2 fue detectada en las tres primeras fracciones (S1, S2 y S3) y también en los flagelos (F) (Fig. 46 A, calles 2, 3,4, 6), siguiendo un patrón de extracción similar al de la tubulina. Cabe destacar que una gran proporción de estas enzimas fue liberada en presencia de alta concentración de sal (Fig.46 A, calle 4). Otros controles que se utilizaron fueron la PAR2 que localiza exclusivamente en la PFR (que se mantiene unida al axonema luego de la extracción) y la glutamato deshidrogenasa citosólica. A su vez, TcNDPK2 fue detectada en todas las fracciones provenientes de una centrifugación diferencial, inclusive la microsomal (Fig. 46 B). Estas observaciones indican que TcNDPK2 es en parte una enzima soluble y sugieren además una asociación con los microtúbulos, con el flagelo del parásito y en principio con la membrana plasmática. La actividad NDPK detectada en flagelos purificados sustenta estas observaciones (Fig. 46 C).

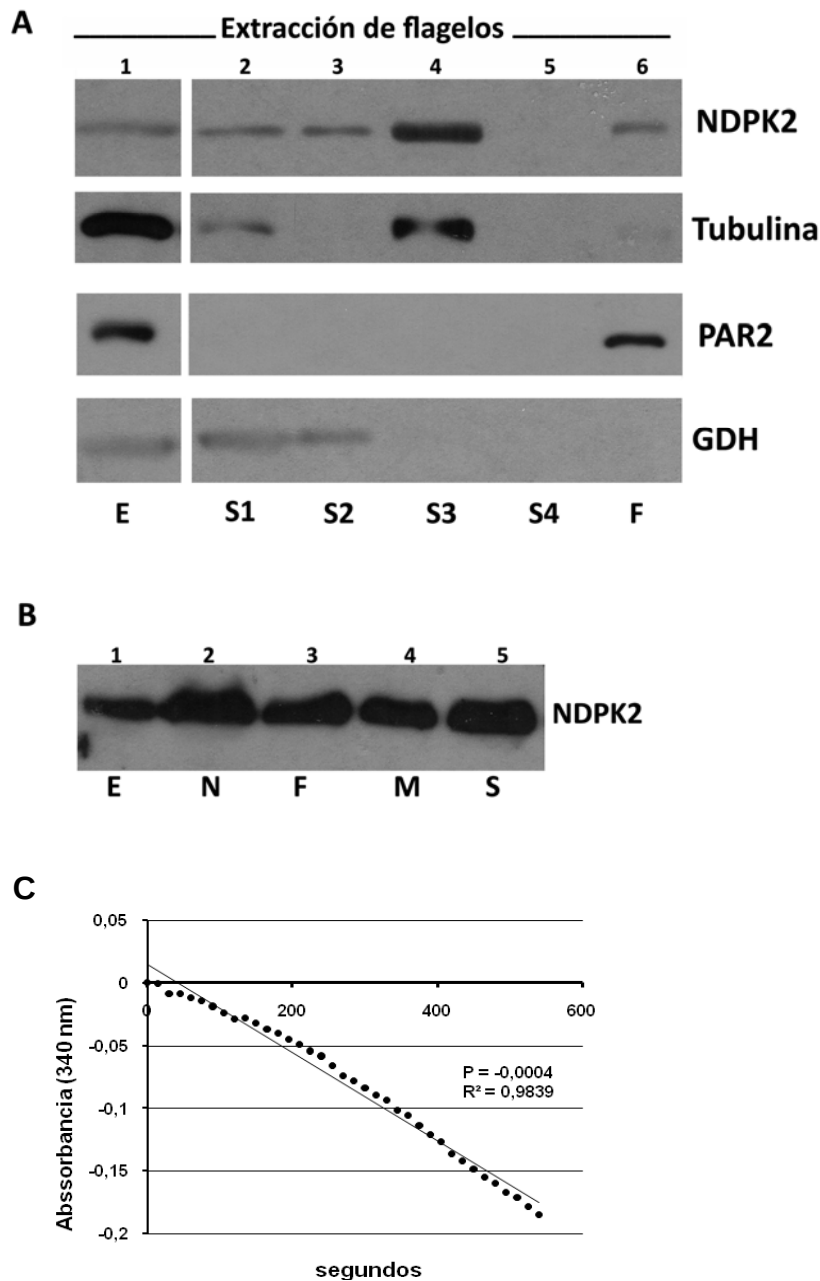


Figura 46: Localización subcelular de TcNDPK2 en flagelos y en microsomas. A) WB sobre fracciones provenientes de la purificación de flagelos. Los parásitos fueron extraídos dos veces con *buffer* conteniendo NP-40 (S1 y S2 respectivamente) y dos veces con *buffer* con alta concentración de sal (S3 y S4 respectivamente), el pellet resultante contenía los flagelos purificados (F). En cada calle se sembró el equivalente a 5×10^6 parásitos. E: extracto proteico total. B) WB sobre fracciones provenientes de una centrifugación diferencial. Los parásitos fueron lisados con sucesivos ciclos de congelado-descongelado y sometidos a centrifugaciones sucesivas a diferentes velocidades. E: extracto proteico total; N: fracción enriquecida en núcleos; F: fracción enriquecida en flagelos; M: fracción microsomal; S: fracción soluble. En cada calle se sembraron 40 μ g de proteínas. C) Actividad NDPK detectada en flagelos purificados.

NDPK2: TcNDPK2; GDH: marcador citosólico (glutamato deshidrogenasa); PAR2: marcador de PFR; Tubulina: α -tubulina

La localización subcelular de TcNDPK2 fue también estudiada por inmunofluorescencia (Fig. 47). En este análisis pudo observarse una marcación proveniente de todo el cuerpo celular, más intensa en el contorno del parásito y cubriendo el núcleo, como así también el flagelo (Fig. 47, columna A). No se observó marcación cuando las incubaciones se hicieron con suero pre-inmune. Estos resultados son compatibles con una localización en el citoesqueleto y en la membrana plasmática, sin embargo, no es posible afirmarlo ya que una proporción de TcNDPK2 es también soluble y la señal puede provenir del citosol. Por esta razón se llevaron a cabo inmunofluorescencias sobre parásitos permeabilizados con NP-40 o Tritón X-100 previamente a su fijación, de manera de provocar el vaciamiento de los mismos y exponer los citoesqueletos (Fig. 48) (Bonhivers *et al.*, 2008, D'Angelo *et al.*, 2004). Como era de esperar, TcNDPK2 fue detectada en el flagelo y en los microtúbulos subpeliculares (Fig. 48, flechas), confirmando su asociación a estas estructuras. Como control positivo se utilizaron anticuerpos contra la PFR (PAR2). Para asegurarnos que las células hubieran perdido todo el citoplasma se utilizó un suero anti-glutamato deshidrogenasa (marcador citosólico), no observándose señal. Tampoco hubo reconocimiento cuando la incubación fue realizada con el anticuerpo secundario solamente.

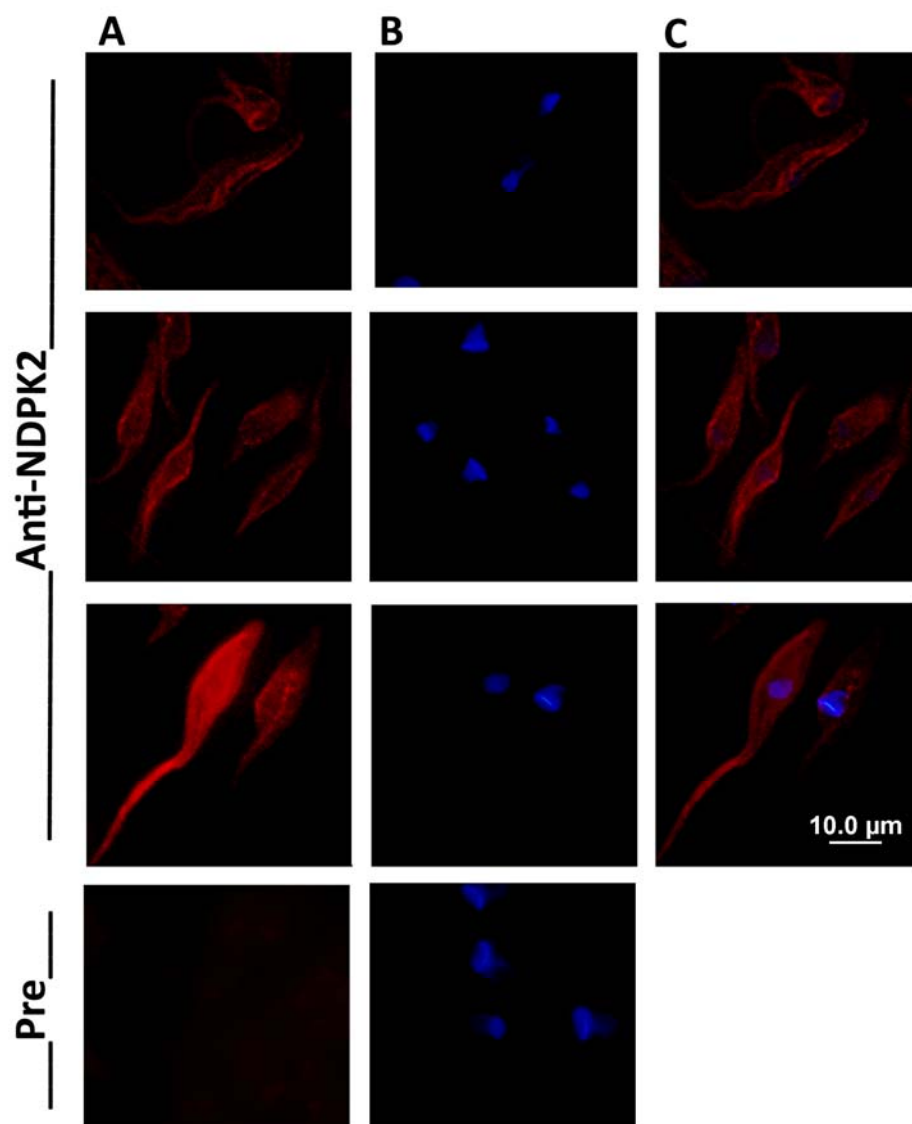


Figura 47: Localización subcelular de TcNDPK2 por inmunofluorescencia indirecta. Los parásitos fueron fijados, permeabilizados e incubados primero con suero de ratón anti-TcNDPK2 o pre-inmune y después con anticuerpos secundarios anti-ratón (Rojo de Texas). Columna A: anti-NDPK2 o pre-inmune; columna B: marcación de núcleos (DAPI); columna C: superposición de A y B.

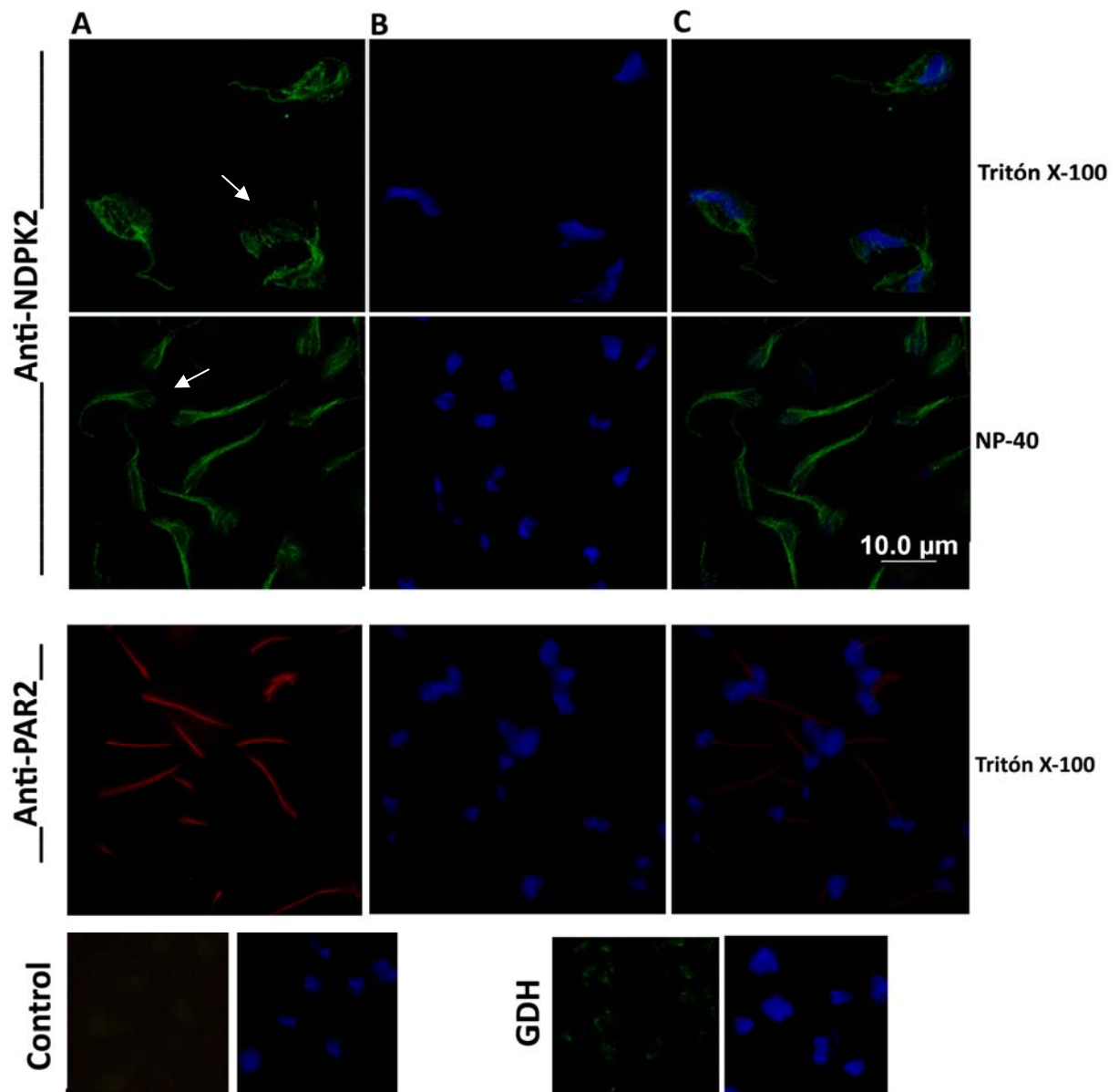


Figura 48: Localización de TcNDPK2 en citoesqueletos. Los parásitos fueron permeabilizados con NP-40 o Tritón X-100, fijados e incubados primero con anticuerpos anti-TcNDPK2 (anti-NDPK2), anti-PAR2 o anti-glutamato deshidrogenasa (GDH) y después con anticuerpo secundario anti-ratón FITC, anti-ratón Rojo de Texas o anti-conejo FITC. Columna A: anti-NDPK2 o anti-PAR2; columna B: marcación de núcleos (DAPI); columna C: superposición de A y B. Se muestran el control y GDH sobre parásitos permeabilizados con Tritón X-100. El control fue realizado con anticuerpo secundario anti-ratón FITC.

Función del dominio DM10 y modificación post-traducciona

Como se mencionó anteriormente TcNDPK2 es una isoforma que contiene un dominio N-terminal denominado DM10 (Fig. 29) y que aparentemente está modificada post-traduccionalmente. Con el objetivo de investigar la participación del dominio DM10 en la localización subcelular de TcNDPK2, en particular su asociación a los microtúbulos y flagelo y de profundizar en la posible modificación post-traducciona, se generaron parásitos transgénicos que expresaban diferentes segmentos de TcNDPK2 fusionada a GFP: el gen completo de TcNDPK2 (N2), la porción correspondiente al dominio DM10 (DM10) y la porción del gen sin el dominio DM10 (Δ DM10) (Fig. 49). Se realizaron otras dos fusiones más que comprendieron el gen completo de TcNDPK2 o el dominio DM10 tomando desde la región 5'UTR y parte del marco de lectura abierto río arriba (Ups-N2 y Ups-DM10 respectivamente) (Fig 49). Como control se utilizaron parásitos expresando GFP sola. En principio, todas estas construcciones, comparándolas unas con otras, nos deberían dar información sobre: a) la función del dominio DM10; b) el rol del dominio DM10 en la localización de TcNDPK2; c) el posible sitio de modificación post-traducciona; d) si el aumento en el peso molecular de TcNDPK2 está relacionado con el *trans-splicing* con la consecuente generación de una proteína más larga.

Mediante WB contra GFP y contra TcNDPK2 se pudo determinar que todas las líneas de parásitos expresaron diferentes niveles de las proteínas de fusión (Fig. 50 A y B; calles 1, 3, 5, 7, 9 y 11). Llamativamente ninguna de las proteínas mostró un retraso en la migración, los pesos moleculares fueron los esperados, sugiriendo que no fueron modificadas post-traduccionalmente. Tampoco se observó una diferencia de peso molecular entre las construcciones Ups-N2 y N2 y Ups-DM10 y DM10 (Fig.50 A y B Calles 3 y 5, 7 y 9) determinando que el incremento en el peso molecular de TcNDPK2 no está relacionado con el *trans-splicing*. Estas observaciones fueron confirmadas mediante el mapeo del 5'UTR del ARNm de TcNDPK2.

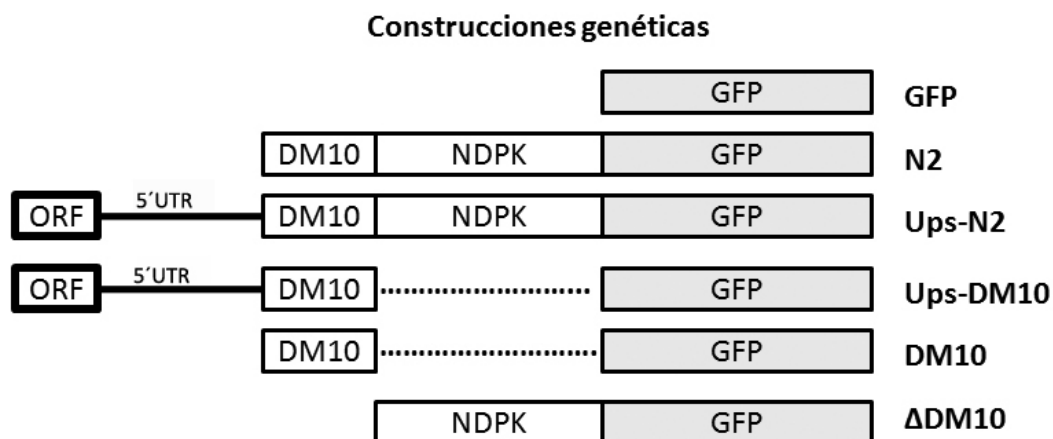


Figura 49: Esquema de las construcciones genéticas de TcNDPK2 que fueron sobre-expresadas en epimastigotes de *T. cruzi*. Las fusiones fueron realizadas como se describe en la sección Materiales y Métodos en el vector pTREX. DM10: dominio N-terminal de TcNDPK2; NDPK: región correspondiente al dominio NDPK de TcNDPK2; DM10-NDPK: TcNDPK2 completa; ORF: porción del marco abierto de lectura río arriba del gen de TcNDPK2 (72 pb); 5'UTR: región intergénica donde ocurre el *trans-splicing* (258 pb). Las líneas punteadas indican que el dominio DM10 fue fusionado directamente a GFP. En el texto se hablará indistintamente de los parásitos o de las proteínas de fusión de acuerdo al nombre que figura a la derecha de cada una de las construcciones. “Ups”-N2 y “Ups”-DM10 proviene de “upstream”.

Por otro lado, todas las proteínas, contrariamente al control GFP, fueron detectadas con anticuerpos anti-GFP en flagelos purificados (Fig. 50 B, calles 2, 4, 6, 8, 10 y 12). N2, Ups-N2, Ups-DM10 y DM10 se hallaron en mayor proporción, mientras que ΔDM10 en menor proporción. Estas observaciones sugieren una asociación a esta estructura mediada por las fusiones generadas. Por su parte los anticuerpos anti-TcNDPK2 (Fig. 50 A calles 2, 4, 6, 8, 10 y 12) reconocieron únicamente a las fusiones con TcNDPK2 completa, N2 y Ups-N2 (Fig. 50 A, calles 4 y 6), lo que es posible debido al menor número de epítopes en las demás construcciones y a los niveles bajos de las proteínas en los flagelos purificados.

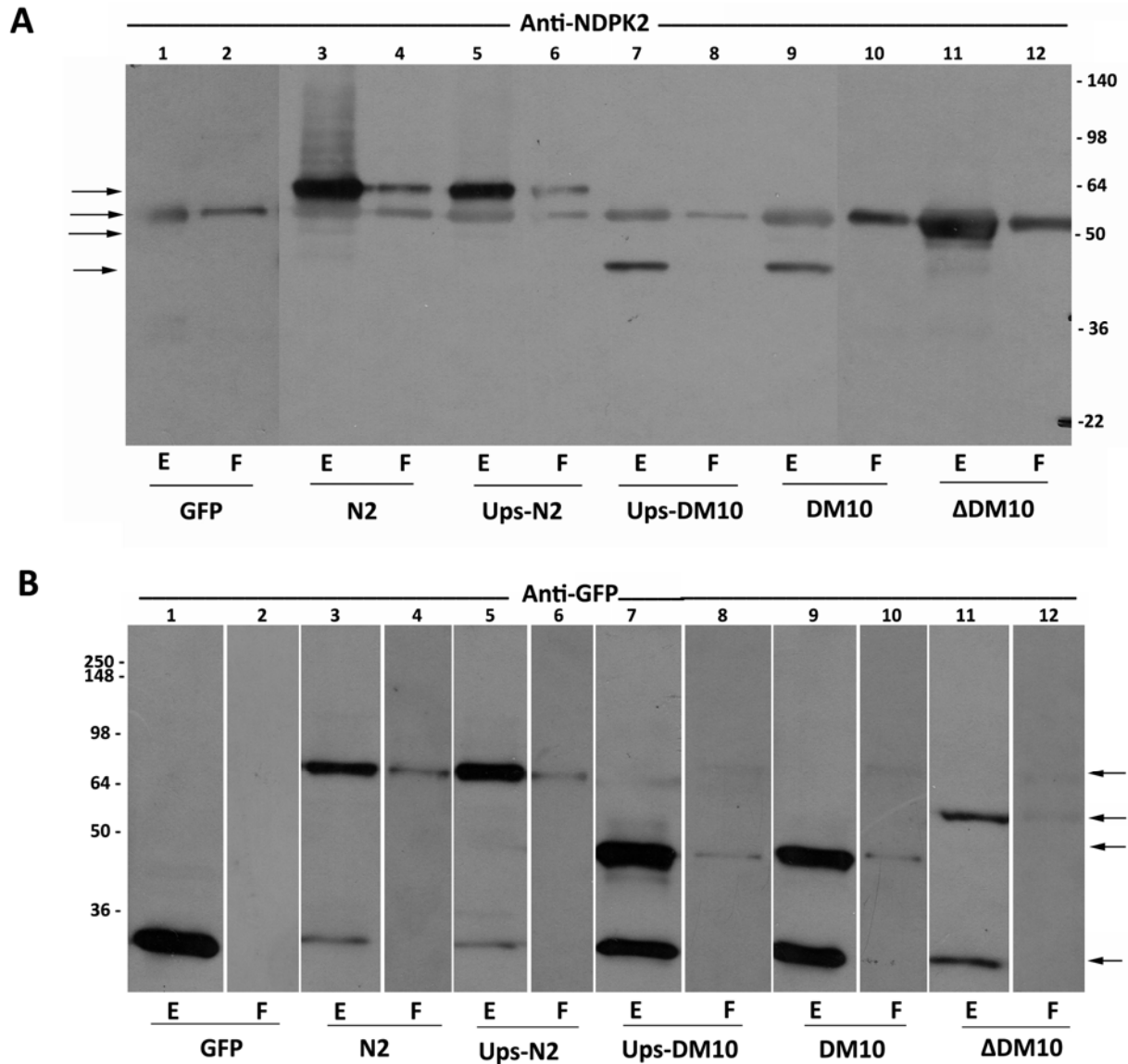


Figura 50: Expresión de las diferentes fusiones a GFP y presencia en flagelos purificados. A) WB contra TcNDPK2 (Anti-NDPK2) en extractos totales (E) y en flagelos purificados (F). Las flechas señalan las diferentes construcciones, de abajo hacia arriba: Ups-DM10 y DM10 (40 KDa), ΔDM10 (56 KDa), TcNDPK2 endógena (55 KDa), N2 y Ups-N2 (66 KDa). B) WB contra GFP en extractos totales (E) y en flagelos purificados (F). Las flechas señalan las diferentes construcciones, de abajo hacia arriba: GFP (27 KDa), Ups-DM10 y DM10 (40 KDa), ΔDM10 (56 KDa), N2 y Ups-N2 (66 KDa). Notar que la GFP está en todos los extractos. A los costados de ambos gráficos se muestran los marcadores de peso molecular. En los bordes inferiores se indican las líneas de parásitos transgénicos.

Para determinar si la GFP fusionada a las diferentes proteínas es dirigida al citoesqueleto y al flagelo, se realizaron inmunofluorescencias sobre parásitos permeabilizados con NP-40 y Tritón X-100. Hay que tener en cuenta que como en estas fusiones el codón de iniciación de la GFP se mantuvo, los parásitos también expresaban esta proteína (ver Fig. 50 B). En la figura 51 puede observarse que las diferentes construcciones, a diferencia del control GFP, localizaron en el citoesqueleto y en el flagelo en mayor o menor proporción; la señal proveniente de los parásitos DM10 y Ups-DM10 es intensa (notar la marcación de microtúbulos subpeliculares, Fig. 51 filas 4 y 5), la de N2 y Ups-N2 intermedia (Fig. 51, filas 2 y 3) y la de Δ DM10 (Fig. 51, fila 6). Estos resultados confirman la asociación de TcNDPK2 a estas estructuras e indican que el dominio DM10 es suficiente para el direccionamiento de proteínas a los microtúbulos subpeliculares y al flagelo. Por otro lado, puesto que las líneas celulares expresaron diferentes niveles, se sugiere en principio, que el dominio DM10 no es indispensable para la localización de TcNDPK2.

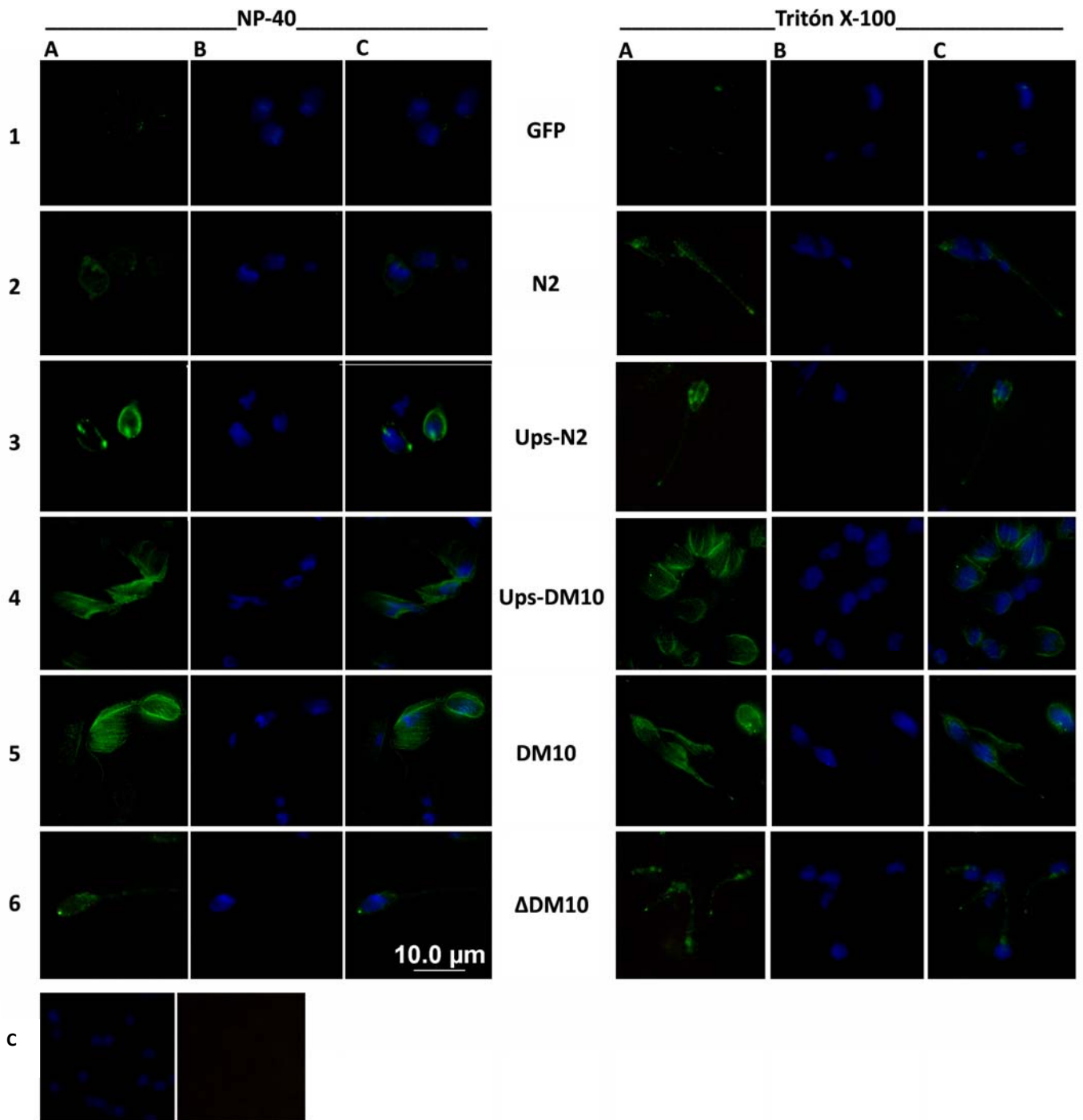


Figura 51: Localización de las proteínas de fusión en el citoesqueleto y en el flagelo. Los parásitos transgénicos fueron permeabilizados con NP-40 (Panel izquierdo) o Tritón X-100 (Panel derecho), fijados e incubados primero con anticuerpos anti-GFP y después con anticuerpo secundario anti-conejo FITC. Columna A: anti-GFP; columna B: marcación de núcleos (DAPI); columna C: superposición de A y B. Fila C: control sobre parásitos DM10 permeabilizados con Tritón X-100 incubados con anticuerpo secundario anti-conejo FITC.

Discusión

En esta segunda parte de la tesis se avanzó en el estudio de las NDPKs de *T. cruzi*, sus isoformas, caracterización bioquímica y funcional y localización subcelular. De cuatro posibles genes que fueron encontrados en el genoma del parásito, dos de ellos, el correspondiente a la isoforma canónica (TcNDPK1) y a una variante con dominio N-terminal DM10 (TcNDPK2) fueron clonados y validados por ensayos bioquímicos de actividad enzimática. TcNDPK1 ha sido ampliamente estudiada en la mayoría de los organismos, mientras que sólo unos pocos reportes de proteínas homólogas a TcNDPK2 existen hoy en día en la bibliografía. En los ensayos de localización subcelular por extracción con digitonina, se encontró que el 80 % de la actividad era soluble mientras que el 20% permaneció en las fracciones insolubles aún a altas concentraciones del detergente. Resultados compatibles con los reportados aquí fueron obtenidos previamente por Ulloa y colaboradores quienes caracterizaron una NDPK soluble y detectaron una actividad asociada a membrana que representaba el 30% de la actividad total (Ulloa *et al.*, 1995). La enzima purificada por estos autores presentó parámetros cinéticos y peso molecular similares a los obtenidos para TcNDPK1 (16 kDa). Teniendo en cuenta que un único gen correspondiente a las NDPKs canónicas fue hallado en el genoma del parásito, es probable que ambos estudios correspondan a la misma enzima. La actividad encontrada a bajas concentraciones de digitonina puede ser en parte atribuida a TcNDPK2, ya que esta última además de estar en el citoesqueleto y el flagelo es también citosólica. Por esta misma razón, TcNDPK2 debiera contribuir a la actividad asociada a las fracciones insolubles al detergente. La presencia de otras isoformas en ambas fracciones no puede ser descartada; de hecho, TcNDPK1, que localizó en la vacuola contráctil, esperaríamos que también estuviera asociada a la fracción soluble.

En la bibliografía existen algunos reportes sobre NDPKs canónicas que interactúan con ácidos nucleicos por lo cual se les han asignado nuevas funciones. Sólo TcNDPK1 presentó actividad nucleasa *in vitro* frente a diferentes sustratos, tanto plasmídicos

como genómicos, lo que permitió tomarla como una nucleasa de amplio espectro. A su vez, la actividad fue cuantitativamente comparable al de las nucleasas comerciales. Esta dualidad de actividades enzimáticas, la nucleasa y la fosfotransferasa, ha sido estudiada en profundidad en una de las NDPK de humanos homóloga a TcNDPK1, NM23-H2. Mientras que la His₁₁₈ es la responsable de la actividad fosfotransferasa, la Lys₁₂, está involucrada en la actividad nucleasa y, a la vez, es también esencial para la actividad NDPK. Por estudios de cristalografía se determinó que los dos residuos forman parte del bolsillo catalítico, por lo cual los autores postularon que ambas actividades están conectadas y que forman parte de un solo mecanismo (Postel, 2003). Nosotros observamos que en *T. cruzi* el equivalente a la Lys₁₂ está conservado en TcNDPK1 y en TcNDPK2, siendo congruente con las investigaciones mencionadas. Sin embargo, la actividad nucleasa de TcNDPK1 no fue inhibida por ninguno de los sustratos de la actividad NDPK probados, sugiriendo la existencia de sitios diferentes para las dos actividades. Es probable que el efecto inhibitorio no haya podido ser observado en las condiciones ensayadas. Se requerirán diferentes estudios funcionales utilizando mutantes puntuales y estudios estructurales para establecer el mecanismo involucrado en la actividad nucleasa detectada en TcNDPK1 y para dilucidar las diferencias encontradas entre ésta y TcNDPK2. Afortunadamente TcNDPK1 ya ha sido cristalizada mediante un trabajo realizado en colaboración con el grupo del Dr. Carlos Aguilar (Universidad Nacional de San Luis). Actualmente se está probando la difracción de rayos x.

Las NDPKs son enzimas multifuncionales que participan en numerosos procesos biológicos y la TcNDPK1 no es la excepción. Observamos que esta isoforma tiene actividades de NDPK y de nucleasa, está involucrada en la resistencia al BZL y localiza en la vacuola contráctil sugiriendo su participación en osmorregulación. Debido a la presencia de actividad nucleasa, otras NDPKs han sido asociadas a la maquinaria de reparación y recombinación entre otras funciones. En nuestro caso, la menor susceptibilidad al BZL mediada por TcNDPK1 (asumiendo que esta droga genera daños en el material genético (Urbina, 2003)) podría haber sido una evidencia de una actividad sobre el ADN *in vivo*. Sin embargo la localización en la vacuola contráctil y no en el núcleo de los parásitos como ocurre en *T. brucei* (Hunger-Glaser *et al.*, 2000), el

pariente más cercano a *T. cruzi*, marcó una gran diferencia no esperada entre ambas especies. Teniendo en cuenta estos resultados podría sugerirse entonces una relación entre la vacuola y la resistencia al BZL, más aún considerando que los mecanismos de entrada y de acción de esta droga no se conocen con exactitud. En *L. major*, una acuaporina que localiza en la vacuola está directamente involucrada con la susceptibilidad a las drogas anti-leishmaniasis (Figarella *et al.*, 2007), si bien se sabe que esta porina es la que transporta los compuestos, la participación de la vacuola no está establecida. En este contexto, podría ser que TcNDPK1 actúe mediando indirectamente la resistencia al BZL a través de la vacuola. Con respecto a la actividad nucleasa de TcNDPK1, su función queda sin ser resuelta por el momento, pero si existe *in vivo* debería estar compartimentalizada o regulada por algún otro mecanismo. Este sería el caso por ejemplo, si participara en muerte celular programada. En otros organismos, se ha reportado que la fosforilación en Ser modula la actividad de la enzima (Dorion *et al.*, 2006) y también se han observado cambios en la localización subcelular dependientes de estímulos; NM23-H1, otra de las homóloga a TcNDPK1 en humanos, localiza en el citosol y migra al núcleo durante apoptosis mediada por linfocitos citotóxicos donde produce daños al ADN (Fan *et al.*, 2003); en *Neurospora crassa* la luz induce la translocación de su NDK-1 de la membrana plasmática al citoplasma (Yoshida y Hasunuma, 2006). También es posible que esta actividad nucleasa sea un remanente de las NDPKs ancestrales y que actualmente no cumpla ninguna función fisiológica.

La localización de TcNDPK1 fue determinada mediante la fusión a eGFP. Es importante destacar que a pesar de estar sobre-expresada, localizó exclusivamente en la vacuola indicando que dicha ubicación es específica y no producto de la sobre-expresión en sí. A su vez, la presencia de vacuolas de diferentes tamaños, podría ser consecuencia de la sobre-expresión de TcNDPK1, como fue previamente reportado para otra enzima de *T. cruzi*, una fosfatidilinositol-3 quinasa, también relacionada con este complejo (Schoijet *et al.*, 2008). Se sabe que este complejo interviene en la osmorregulación en el parásito (Rohloff y Docampo, 2008); por esta razón mediante un shock hiposmótico confirmamos la funcionalidad de estas organelas en los parásitos transgénicos. Llamativamente durante el estrés, N1-eGFP apareció en numerosas y

pequeñas vesículas y luego, durante la recuperación en *buffer* isosmótico, en vesículas más grandes y menos abundantes. Estas observaciones son compatibles con la posible fragmentación de la vacuola y posterior fusión de las vesículas resultantes, como fue postulado previamente en *Dictyostelium discoideum* y *Paramecium calkinsi* (Temesvari *et al.*, 1996; Cronkite *et al.*, 1991). Estos autores sugirieron que las vacuolas no contráctiles bajo el estrés hiposmótico podrían secuestrar y remover el exceso de agua que la vacuola contráctil no alcanzaría a manejar, interviniendo por lo tanto en la homeostasis del volumen celular. *T. cruzi*, cuenta con un mecanismo adaptativo de regulación del volumen conocido como *Regulatory Volume Decrease* (RVD) que involucra la liberación de iones, osmolitos y agua bajo estrés hiposmótico. En estas condiciones, ha sido observada la translocación de la aquaporina (TcAQP) desde los acidocalcisomas hacia la vacuola, como así también un aumento en el volumen de los primeros. Estas evidencias sumadas a otras fueron las que llevaron a postular el rol de los acidocalcisomas en la osmorregulación (Rohloff *et al.*, 2004). Dentro de este contexto es posible que TcNDPK1 se transloque desde la vacuola hacia otras vesículas que podrían ser los acidocalcisomas. Se sabe que este mecanismo involucra al AMPc como segundo mensajero, implicando presencia de sistemas regulatorios en los cuales TcNDPK1 podría estar participando, tal vez mediante una cascada de señalización. Recientemente en un estudio de “fosfoproteómica” de *T. brucei*, en donde se describieron aquellas proteínas fosforiladas por las quinasas endógenas, se encontró que la ortóloga de TcNDPK1 está fosforilada en treonina (T₉₃) (Nett *et al.*, 2009). La osmorregulación constituye un sistema adaptativo del parásito que le permite sobrevivir a diferentes estreses hiper e hiposmóticos y es de particular interés puesto que la forma infectiva debe pasar desde las heces del vector altamente concentradas (600-700 mOsm) a los fluidos del mamífero con una osmolaridad mucho menor (300 mOsm) (Kollien *et al.*, 2001). Además, TcNDPK1, como parte de una red enzimática de fosfotransferencia podría facilitar la disponibilidad de ATP necesario para el funcionamiento de la organela.

Con respecto a TcNDPK2, observamos que su peso molecular era más elevado que el esperado, descartando la posibilidad de que la diferencia se originara a nivel del *trans-splicing*, se sugirió que podía estar modificada post-traduccionalmente.

Aparentemente no se encuentra ni fosforilada ni N-glicosilada y si bien mediante un estudio *in silico* se predijo la ausencia de sitios de palmitoilación, miristoilación, farnesilación, sumoilación y de unión a GPI, no deben desecharse estas posibilidades. Además nuestros ensayos y resultados son preliminares. En *T. cruzi* las modificaciones post-traduccionales han sido poco estudiadas y podría ser que los sitios hubieran divergido y no pudieron ser predichos *in silico*. A su vez otras modificaciones como ubiquitinación, O-glicosilación, fosfoglicosilación (Haynes, 1998), acetilación, poliglutamilación y poliglicilación también deberían ser exploradas (estas tres últimas fueron halladas modificando α y β tubulina, Gull, 1999). El hecho que en ocasiones una o más bandas de menor peso molecular podían observarse en los WB (Ej. Figs.43 y 44), algunas con el peso esperado, sugieren la existencia de diferentes grados de modificación post-traducciona. Este punto permanece sin resolución, pero es importante determinarlo porque podría estar regulando la localización subcelular de TcNDPK2. Además de ubicarse en el citoplasma, microtúbulos subpeliculares y flagelo, TcNDPK2 fue también hallada en fracciones microsomales, sugiriendo su posible asociación con la membrana plasmática. Sin embargo, en *T. cruzi* la membrana plasmática está fuertemente unida a los microtúbulos subpeliculares y permanecen asociados luego de la lisis celular y la purificación de fracciones enriquecidas en membranas (de Souza, 2002), por lo tanto no es posible afirmar dicha asociación. En congruencia con estos datos, en ensayos preliminares de localización por inmunofluorescencia sobre parásitos no permeabilizados no se observó marcación, lo cual indica que TcNDPK2 al menos no localiza en la cara externa de la membrana. Pero no se puede descartar una conexión de TcNDPK2 con la cara interna de la misma. Por otro lado, como esta isoforma presentó un patrón de extracción similar al de tubulina y en las inmunofluorescencias marcó el “corset” de microtúbulos subpeliculares, puede inferirse que en el flagelo está localizada en el axonema y no en la PFR.

En *T. brucei*, otro tripanosomátido, la ortóloga de TcNDPK2 fue encontrada en el flagelo de los parásitos mediante un estudio de proteómica (Broadhead *et al.*, 2006; Baron *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos por estos autores fueron similares a los de TcNDPK2, con la diferencia que nosotros además la encontramos asociada al citoesqueleto. Dada esta ubicación y teniendo en cuenta que TcNDPK2 aumenta su expresión en la fase logarítmica de crecimiento, sugiriéndose una relación con la

división celular, una hipótesis podría ser que TcNDPK2 provea el GTP necesario para la polimerización de los microtúbulos. Estudios previos determinaron la presencia de actividad NDPK en el ensamblado de microtúbulos *in vitro* (Jacobs y Huitorel, 1979) como así también la unión de NDPKs a tubulina (Lombardi *et al.*, 1995). También es posible que no exista una interacción directa y que TcNDPK2 ejerza su efecto modulando la concentración de nucleótidos de guanina en un microentorno (Melki *et al.*, 1992).

Como se mencionó anteriormente, los dominios DM10 están constituidos por 105 aa aproximadamente y aparecen en simple copia o múltiple copia hacia el N-terminal. Estos dominios han sido encontrados únicamente en dos grupos de proteínas, en NDPKs homólogas a TcNDPK2 y en otras proteínas cuya función no es conocida. Representando el primer grupo está TcNDPK2, las homólogas en *T. brucei* (TbCMF40), en humanos (NM23-H7) y en *Chlamydomonas* (p40) (Baron *et al.*, 2007, Munier *et al.*, 2003, Patel-King *et al.*, 2004). En el segundo grupo, se encuentran proteínas con tres dominios DM10 como Rib72 en *Chlamydomonas* y EFCH1 en humanos (Patel-King *et al.*, 2002, de Nijs *et al.*, 2006). Ortólogas de éstas últimas están presentes en muchos otros organismos eucariotas que contienen células con cilias y flagelos móviles como ratón, pepino de mar, *Drosophila*, *Leishmania* y tripanosomas. Se vio que estas proteínas están asociadas al axonema de los flagelos, y se sugirió que estos dominios podrían actuar como módulos regulatorios o unidades específicamente involucradas en el direccionamiento a los axonemas o ensamblado de los mismos (King, 2006). En este trabajo evaluamos la función del dominio DM10 perteneciente a TcNDPK2 en la localización en el citoesqueleto y flagelo de *T. cruzi* mediante la construcción de diferentes fusiones. Puesto que la fusión DM10-GFP direccionó a GFP a estas estructuras, fue posible afirmar que este dominio es responsable de dicha localización y que por lo tanto interviene en la asociación con los microtúbulos o constituye una señal de retención en los mismos. Sin embargo, parece que no es del todo requerido en la localización de TcNDPK2 ya que estando o no presente (N2 vs Δ DM10) las proteínas fueron dirigidas a dichas estructuras. Por esta razón, se deduce que dentro de TcNDPK2 deben existir otras señales involucradas en la localización que no dependen del dominio DM10. Es importante resaltar las limitaciones de la técnica

utilizada. En primer lugar los niveles de las proteínas sobre-expresadas fueron diferentes, por lo tanto no fue posible comparar las intensidades obtenidas en las inmunofluorecencias, puesto que aquéllas que estuvieran más expresadas competirían mejor por los sitios de unión; tal como fue observado. Por otro lado, ninguna de las construcciones fue modificada post-traduccionalmente. En este caso, es posible que la GFP estuviera ejerciendo algún impedimento estérico que inhibiera la modificación; de hecho una de las primeras construcciones obtenidas que había resultado truncada y no expresaba GFP tenía un peso molecular superior al esperado indicando que sí había sido modificada post-traduccionalmente. Esta modificación podría estar interviniendo en la localización de TcNDPK2, lo que explicaría en parte, la baja proporción de las proteínas de fusión en dichas estructuras y la falta de reemplazo de la TcNDPK2 endógena. Otra variable como la funcionalidad de las enzimas heterólogas, no se puede descartar. Muchas de estas objeciones podrían solucionarse tal vez, utilizando un epítotope pequeño en lugar de GFP, como por ejemplo HA.

La maquinaria de translocación de proteínas al flagelo de estos parásitos no está esclarecida, se han reportado muy pocos ejemplos y al parecer no hay señales o secuencias de localización universales. El hallazgo de que un dominio DM10 pueda direccionar proteínas al flagelo y al citoesqueleto abre nuevas puertas y aporta un eslabón más en esta investigación.

Como se ha mencionado a lo largo de este módulo, parte en la introducción y parte en la presente discusión, los humanos tienen ocho NDPKs diferentes (NM23-H1 a NM23-H8), algunas de las cuales presentan homología con las de *T. cruzi*. Se sabe que NM23-H1, H2, H3 y H4 pertenecen al grupo de las isoformas canónicas, se expresan en diferentes niveles en la mayoría de los tejidos y localizan en el núcleo y citoplasma, citoplasma, y mitocondria de las células respectivamente (Lacombe *et al.*, 2000). NM23-H5, H6, H7 y H8 corresponden al segundo grupo de NDPKs más divergentes y han sido menos estudiadas. Todas ellas, a excepción de NM23-H6, se expresan principalmente en tejido testicular, lo que ha llevado a especular que pueden estar asociadas con el axonema del espermatozoide, como es el caso de NM23-H5 (Lacombe *et al.*, 2000; Munier *et al.*, 2001). En un fenograma construido a partir de todas estas proteínas, incluidas las de *T. cruzi*, pudimos observar que TcNDPK1 agrupa

junto con NM23-H1, H2, H3 y H4, mientras que TcNDPK2 y TcNDPK3 con NM23-H7, indicando que podrían ser posibles ortólogos.

Las ciliias y flagelos son organelas muy conservadas evolutivamente. Desde hace varios años se ha puesto especial énfasis en el estudio de la estructura y función de los flagelos de organismos eucariotas unicelulares, los cuales, teniendo en cuenta la similitud encontrada con las ciliias y flagelos de células de mamíferos, fueron tomados como sistemas modelo para el estudio de enfermedades humanas provocadas por fallas en las mismas (Oberholzer *et al.*, 2007). El gen de NM23-H7, posible ortólogo del de TcNDPK2, mapea en un locus asociado a la distrofia de conos y bastones, una enfermedad que genera problemas en la retina y consecuente ceguera (Baron *et al.*, 2007). A su vez, la epilepsia mioclónica juvenil, que genera trastornos en el sistema nervioso, es causada por una mutación en la proteína EFHC1 que contiene tres dominios N-terminales DM10 (de Nijs *et al.*, 2006). El estudio de TcNDPK2 y de su dominio DM10 podría revelar las bases moleculares de estas enfermedades.

En conclusión, en esta parte de la tesis estudiamos dos isoformas de NDPK de *T. cruzi* que fueron caracterizadas molecular y funcionalmente. TcNDPK1, presentó actividad nucleasa *in vitro* y localizó en el complejo de la vacuola contráctil, siendo el primer reporte de una NDPK vacuolar. Posiblemente esta enzima participe en procesos de osmorregulación. TcNDPK2, una isoforma con dominio DM10, además de estar en citosol, localizó en el citoesqueleto del parásito, infiriéndose una posible asociación con los microtúbulos. Por esta razón se hipotetizó que podría proveer el GTP necesario para polimerización de los mismos. Esta localización no sólo estaría mediada por el dominio DM10 sino también por alguna otra señal interna. Nuevos estudios serán necesarios para corroborar las hipótesis planteadas.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Las redes enzimáticas de fosfotransferencia, constituidas por diferentes fosfotransferasas, aseguran la eficiente comunicación entre los compartimentos subcelulares responsables de la producción y utilización de la energía. Las enzimas involucradas son principalmente aquellas encargadas de la homeostasis energética celular, es decir, las relacionadas con el metabolismo de nucleótidos. La CK, AdK y NDPK participan en esta comunicación. Las evidencias que sustentan la existencia de esta red de fosfotransferencia son numerosas. En trabajos realizados sobre tejidos de mamíferos que experimentan una alta demanda energética (músculo y cerebro, por ejemplo) se observó que la deficiencia en la creatina quinasa es complementada por rutas bioenergéticas alternativas provistas por la AdK y enzimas glicolíticas (Dzeja *et al.*, 2000). Dentro de miofibrillas, las AdKs están agrupadas en arreglos lineales y además la pérdida de esta función puede ser complementada por la activación del sistema de creatina quinasa (Dzeja *et al.*, 2002). Se reportó que en cardiomiocitos, una red de fosfotransferencia integrada fue requerida para la movilización de los fosfatos de alta energía desde la mitocondria al núcleo permitiendo el soporte del transporte nuclear (Dzeja *et al.*, 2002). En *E. coli* la deficiencia en la única NDPK fue complementada por actividad AdK (Lu y Inouye, 1996). También se vio que la reacción catalizada por la NDPK está ligada al ciclo de Krebs y la exportación de los fosfatos de alta energía desde la mitocondria (Roberts *et al.*, 1997, Janssen *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta la comunicación que ejercen estas redes entre sitios espacialmente distantes, hay que destacar la importancia de la presencia de diferentes isoformas y sus múltiples localizaciones subcelulares. Nosotros abordamos el estudio de estas redes enzimáticas de fosfotransferencia en *T. cruzi*, un organismo que puede ser tomado como modelo. En trabajos previos reportamos seis AdKs con diferente distribución dentro de la célula (Bouvier *et al.*, 2006) y otra séptima isoforma podría ser nuclear (Ren *et al.*, 2005). A su vez, en el presente trabajo determinamos la existencia de una única AK citosólica, caracterizamos dos NDPKs con localización en el complejo de la vacuola contráctil y en el citoesqueleto y también reportamos otras dos posibles variantes adicionales. Las diferentes isoformas de NDPK proveen una

conexión importante entre la generación de ATP y la distribución de energía a través de la conversión a otros nucleósidos trifosfatos, como así también a través de la regulación de transducción de señales y expresión de genes (Dzeja y Trezic, 2003). En este sentido TcNDPK1 podría formar parte de un mecanismo regulatorio de la vacuola contráctil, ya sea como componente de una cascada de señalización o como enzima abastecedora de energía. Por otro lado, por su actividad nucleasa, no puede ser descartada una posible participación a nivel nuclear. A su vez TcNDPK2, que está asociada al citoesqueleto, podría aportar el GTP necesario para la polimerización de los microtúbulos por conversión del ATP suministrado por un sistema de AdKs o AK, como así también la energía necesaria para el movimiento flagelar. Paralelamente *T. brucei*, un tripanosomátido emparentado con *T. cruzi*, contiene tres AKs, una citosólica y otra con señal de localización en glicosomas (Pereira *et al.*, 2002; este estudio); siete AdKs, tres flagelares, dos posiblemente mitocondriales, una glicosomal y una citosólica (Pullen *et al.*, 2004; Ginger *et al.*, 2005); y cuatro NDPKs, de las cuales una es nuclear y otra flagelar (Hunger-Glaser *et al.*, 2000; Baron *et al.*, 2007; este trabajo). La existencia de tantas fosfotransferasas, todas expresadas al mismo tiempo en una misma célula, excede el número de isoformas previamente descrito en otros organismos; su distribución refuerza la idea de una comunicación integrada entre los compartimentos generadores y consumidores de ATP. Mediante un *shuttle* de AdKs o AKs, el ATP podría salir de la mitocondria o el glicosoma y llegar hasta los sitios consumidores como flagelo, citoesqueleto, vacuola contráctil o núcleo donde puede ser utilizado por una NDPK. A cuenta de la existencia de esta red en *T. cruzi* (Fig. 52), nosotros previamente observamos que la sobre-expresión de TcAK condujo a una disminución en la actividad AdK, indicando una compensación de funciones y la existencia de un mecanismo de regulación conjunta (Bouvier *et al.*, 2006). De hecho, TcAK y TcAdK1, dos fosfotransferasas citosólicas, tienen patrones de expresión similares durante el crecimiento de epimastigotes en cultivo, siendo mayores en fase estacionaria (Pereira *et al.*, 2000, Bouvier no publicado). Además, el aumento de expresión de TcNDPK2 en la fase exponencial es acompañado por el de TcAdK4, una AdK posiblemente flagelar (Bouvier, no publicado). Todas estas observaciones sustentan la existencia de una red integrada, coordinada y altamente regulada. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis marcan el comienzo de esta nueva línea de investigación.

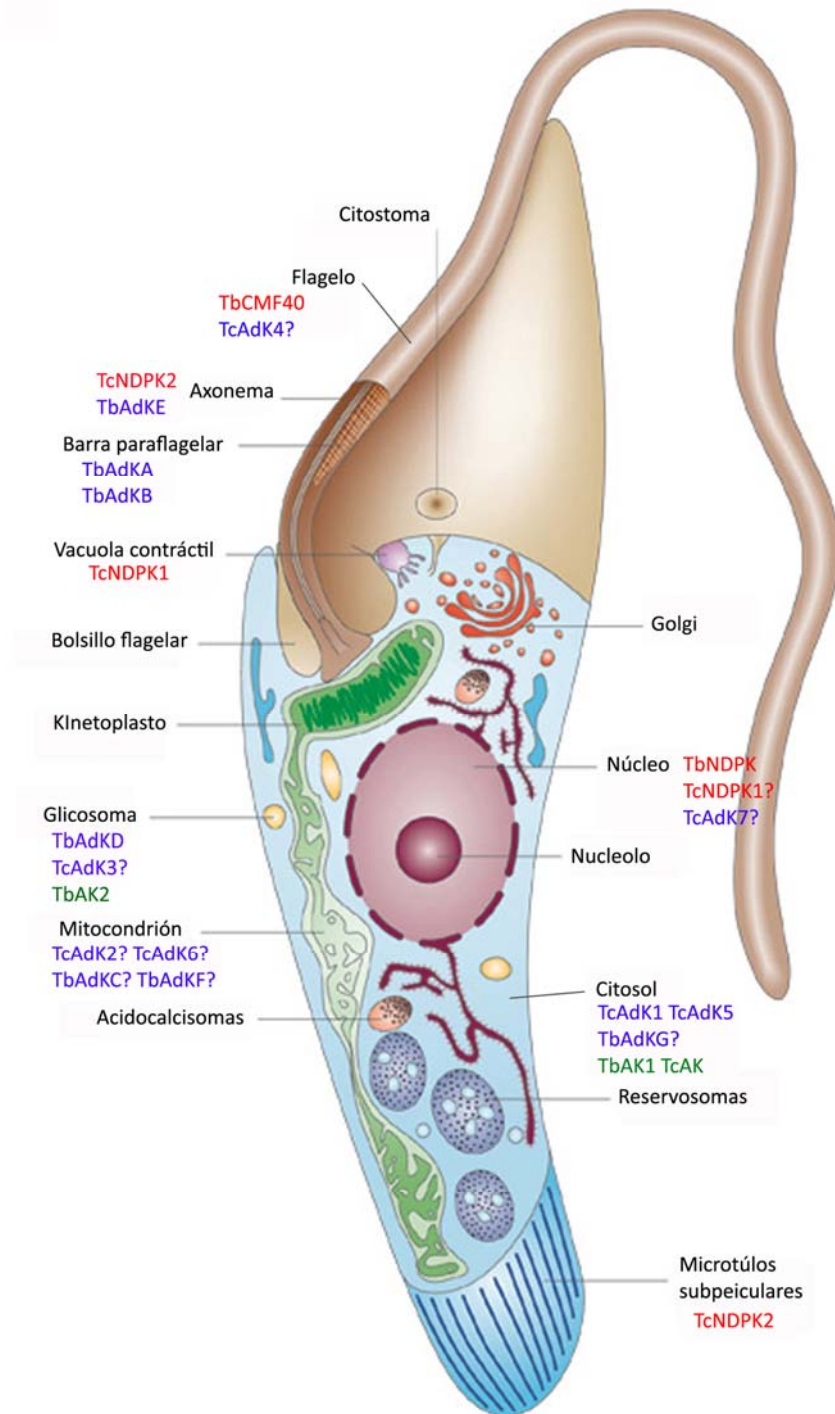


Figura 52: Esquema que representa la ubicación de la red enzimática de fosfotransferencia en *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, a partir de los resultados obtenidos y de datos previos o todavía no publicados. Se indican las diferentes organelas y la ubicación de cada una de las isoformas de adenilato quinasa (AdK, azul), nucleósido difosfato quinasa (NDPK, rojo) y arginina quinasa (AK, verde). TbAdK, TbAK y TbNDPK (TbCMF40) adenilato quinasas, argininas quinasas y nucleósido difosfato quinasas de *T. brucei*; TcADK, TcAK y TcNDPK, adenilato quinasas, argininas quinasas y nucleósido

difosfato quinasas de *T.cruzi*. Los signos de pregunta indican que la localización subcelular está inferida por predicción bioinformática y/o debe ser evaluada.

SECCIÓN III

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas analíticas generales

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las muestras a ser analizadas se prepararon agregándoles los volúmenes correspondientes de *buffer* de siembra 5X y calentándolas por 5 min a 100 °C. Luego se sembraron en geles desnaturalizantes discontinuos (0,1 % SDS, 12-15 % acrilamida) y se corrieron en *buffer* Tris-Glicina-SDS1X (Laemmli, 1970). Los marcadores de peso molecular utilizados cubrían los rangos de 14,3 a 200 KDa (High range, Rainbow, Low range, BIORAD). Se utilizó el equipo miniPROTEAN 3 BIORAD. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

Electroforesis de ADN en geles de agarosa nativos

Los geles de agarosa utilizados se prepararon en *buffer* TAE 1X al 1% con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Antes de la siembra las muestras se resuspendieron con el correspondiente volumen de *buffer* de siembra 6X. Los geles fueron visualizados en un transiluminador UVP y fotografiados.

Western Blots

Las muestras a analizar por WB fueron resueltas en geles de acrilamida desnaturalizantes (12 - 15 %) y transferidas a membranas PVDF (Pierce) durante 1 h a 100 V en *buffer* de transferencia. Las membranas fueron bloqueadas en *buffer* T-PBS con 5% de leche en polvo descremada durante 1h a temperatura ambiente en agitación e incubadas con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo por 12 hs a 4°C. Posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces con T-PBS e incubadas con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa diluido en solución de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente con agitación. Las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS y reveladas con el reactivo para quimioluminiscencia Supersignal™ West Pico (Pierce).

Las diluciones utilizadas de los anticuerpos fueron: anti-NDPK2, 1:2500; anti-TcAK, 1:2000; anti-HK, 1:5000; anti-GDH, 1:10000; anti-cruzapaína, 1:5000; anti-PAR2,

1:2000; anti-mAAT, 1:2500; anti-tubulina, 1:10000; anti-GFP, 1: 5000; anti-His 1: 5000; anti-ratón, 1:5000; anti-conejo, 1:5000.

Cuantificación de proteínas: Método de Bradford

En una placa de 96 wells se colocaron 10 μ l de diferentes diluciones de los extractos proteicos en 200 μ l de reactivo de Bradford 1X (BIORAD). La curva estándar se realizó con soluciones conteniendo de 1 a 0,1 mg/ml de BSA (seroalbúmina bovina). Se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de ELISA, se construyó la curva patrón por la regresión lineal y la concentración de las muestras fue calculada mediante la ecuación de la recta.

Cuantificación de ADN

Las concentraciones de los plásmidos a secuenciar se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm de acuerdo a la relación 1OD= 50 μ g/ml.

Técnicas bioquímicas

Medición de actividades enzimáticas

Medición de actividad arginina quinasa

La actividad arginina quinasa fue medida indirectamente de acuerdo a un ensayo con enzimas acopladas según Pereira et al (Pereira *et al.*, 2003.) Diferentes volúmenes de extractos enzimáticos fueron incorporadas a una mezcla de reacción conteniendo 100 mM Tris-HCl pH 8,2; 1,5 mM Cl_2Mg ; 0,5 mM DTT; 1,5 mM PEP; 0,3 mM NADH; 5 U/ml de PK y 5 U/ml de LDH. Luego de una incubación de 2 min a 35 °C se inició la reacción con el agregado de ATP y arginina a una concentración final de 1,5 mM y 10 mM respectivamente y un volumen total de 500 μ l. La actividad fue medida durante 10 min computando cada 15 seg el descenso de absorbancia a 340 nm correspondiente a la oxidación del NADH.

Medición de actividad nucleósido difosfato quinasa

La actividad nucleósido difosfato quinasa fue medida indirectamente a través de un ensayo con enzimas acopladas según Ulloa y colaboradores (Ulloa *et al.*, 1995).

Diferentes volúmenes de extractos enzimáticos fueron incorporadas a una mezcla de reacción conteniendo 80 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM Cl_2Mg ; 3 mM PEP; 25 mM KCl; 0,3 mM NADH; 1,25 U/ml de PK y 2,2 U/ml de LDH. Luego de una incubación de 2 min a 35 °C se inició la reacción con el agregado de ATP y dTDP a una concentración final de 2 mM y 0,4 mM respectivamente y un volumen total de 500 μl . La actividad fue medida durante 10 min computando cada 15 seg el descenso de absorbancia a 340 nm correspondiente a la oxidación del NADH

Medición de actividad piruvato quinasa

La actividad piruvato quinasa se midió utilizando un ensayo acoplado a la enzima lactato deshidrogenasa según Cazzulo y colaboradores (Cazzulo *et al.*, 1989). Diferentes volúmenes de extractos enzimáticos fueron incorporadas a una mezcla de reacción conteniendo 100 mM Tris-HCl pH 6,9; 15 mM Cl_2Mg ; 1,5 mM PEP; 100 mM KCl; 0,3 mM NADH y 5 U/ml de LDH. Luego de una incubación de 2 min a 35 °C se inició la reacción con el agregado de ADP a una concentración final de 5 mM y un volumen total de 500 μl . La actividad fue medida durante 10 min computando cada 15 seg el descenso de absorbancia a 340 nm correspondiente a la oxidación del NADH

Medición de actividad isocitrato deshidrogenasa NADP^+ dependiente

La actividad isocitrato deshidrogenasa fue medida directamente siguiendo el aumento de la absorbancia a 340 producto de la reducción del NADP^+ por la IDH (Denicola *et al.*, 2002). Diferentes volúmenes de extractos enzimáticos fueron incorporados a una mezcla de reacción conteniendo 160 mM Tris-HCl pH 7,6; 3 mM MgCl_2 y 0,8 mM NADP^+ . Luego de una incubación de 2 min a 35 °C se inició la reacción con el agregado de isocitrato a una concentración final de 3 mM y un volumen total de 500 μl .

Medición de actividad hexoquinasa

La actividad hexoquinasa fue medida mediante un ensayo acoplado a la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa según Cáceres y colaboradores (Cáceres *et al.*, 2003). Diferentes volúmenes de extractos enzimáticos fueron incorporadas a una mezcla de reacción conteniendo 100 mM Tris-HCl pH 7,3; 5 mM Cl_2Mg ; 100 mM KCl; 2 mM DTT; 20 mM glucosa; 1 mM NADP^+ y 2 U/ml de G6PD. Luego de una incubación de 2 min a

35 °C se inició la reacción con el agregado de ATP a una concentración final de 1 mM y un volumen total de 500 µl. La actividad fue medida durante 10 min computando cada 15 seg el aumento de absorbancia a 340 nm correspondiente a la reducción del NADP⁺.

Ensayos de actividad nucleasa in vitro

500 ng de TcNDPK1 fueron incubados con muestras de 300 ng de ADN plasmídico linealizado o superenrollado o ADN genómico en *buffer* Tris-HCl (50 mM pH 7,0) con 10 mM de MgCl₂ en un volumen final de 20 µl a 37°C durante 3 hs. En los casos indicados las condiciones de reacción fueron variadas, incubando en hielo o adicionando otros compuestos como ADP, ATP y EDTA a una concentración final de 5 mM. Los productos de la reacción fueron resueltos en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los resultados mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

El plásmido utilizado como sustrato correspondió al vector pTREX y fue linealizado con la enzima Eco RI. Como control, además de 500 ng de TcNDPK2, se utilizaron muestras de bacterias BL21 pLysS transformadas con el vector pRSET-A vacío a las cuales se las procesó de la misma manera que a las bacterias que expresaban TcNDPK1.

Técnicas de Biología Molecular

Preparación de ADN plasmídico

Las bacterias provenientes de cultivos de 3 a 5 ml crecido durante toda la noche en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina fueron cosechadas por centrifugación a 4.000 r.p.m. por 5 min y resuspendidas en 100 µl de solución PI. Las bacterias fueron lisadas con el agregado de 200 µl de solución PII fresca, el homogenato resultante fue mezclado por inversión y neutralizado con 150 µl de solución PIII. Luego de mezclar suavemente se centrifugó a 12.000 r.p.m. por 10 min, se tomó el sobrenadante y se incubó con 50 µg/ml de ARNasa A por 1 h a 37°C. Pasado ese tiempo se extrajeron proteínas y lípidos dos veces con 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, se precipitó el ADN plasmídico con 500 µl de isopropanol 100% y se centrifugó a máxima

velocidad por 15 min. El pellet obtenido se lavó con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en 32 µl de agua destilada estéril.

Para la obtención de ADN de alta pureza para secuenciar el protocolo se continuó con la precipitación del ADN mediante el agregado de 8 µl de NaCl 4 M y 4 µl de PEG₈₀₀₀ 13% estéril e incubación en hielo durante 20 min. Luego de centrifugar por 15 min a máxima velocidad a 4°C el pellet se lavó con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en 20 µl de agua. Previo a la secuenciación los vectores fueron cuantificados.

Los plásmidos para la transfección de parásitos fueron purificados a través de columnas comerciales (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN).

Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las enzimas utilizadas fueron de New England Biolabs y de Promega. Se utilizaron 5 U de enzima por µg de ADN a digerir incubando en los *buffers* y temperatura sugeridos por el fabricante durante un mínimo de 3hs.

Preparación de vectores y fragmentos de ADN

Los vectores utilizados fueron digeridos con las enzimas de restricción indicadas y purificados mediante electroforesis en geles de agarosa. Las bandas correspondientes fueron aisladas y extraídas con el kit de extracción Illustra GFX^M -PCR DNA and GEL BAND PURIFICATION KIT (GE). En el caso de plásmidos linealizados con una sola enzima de restricción se los desfosforiló incubando con 1 U de SAP (Siamp alkaline Phosphatase, Promega) durante 1h a 37°C en el mismo *buffer* de la reacción de restricción y luego se los purificó como se indica arriba. Para la purificación de productos de PCR se utilizaron las mismas columnas comerciales indicadas arriba.

Ligación de fragmentos de ADN

Las ligaciones se realizaron con una relación molar inserto:vector de 3:1 utilizando 50 ng de vector en un volumen final de 20 µl con 100 U de T4 ADN ligasa (NEB). Las incubaciones fueron a 4°C durante toda la noche.

Para la ligación de productos de PCR al vector pGEM-T Easy (Promega) se prosiguió de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En el caso de las PCRs realizadas con

polimerasa PFU los fragmentos amplificados fueron purificados mediante el kit Illustra GFX^M (GE), incorporados a una reacción de PCR con Taq polimerasa para el agregado de las A y ligados al vector pGEM-T easy.

Reacciones en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Las diferentes PCRs con Taq ADN polimerasa (Promega) fueron llevadas a cabo en *buffer* provisto por los fabricantes con 1000- 10 ng de ADN, 2 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTPs y 10 pmol de cada oligonucleótido en un volumen final de 50 μl. Las amplificaciones se realizaron de acuerdo a los siguientes ciclos:

Desnaturalización inicial: 5 min a 95°C

30 ciclos: desnaturalización: 30 seg a 95°C, anidado: 1 min a la temperatura indicada para cada oligonucleótido, elongación: 1 min por cada Kpb a copiar a 72°C

Elongación final: 10 min a 72°C

Para las amplificaciones con PFU se utilizó el *buffer* proveído por el fabricante con 2 mM de MgSO₄. Los tiempos de elongación fueron mayores según la procesividad de la enzima (1 Kpb/2 min) a una temperatura de 68°C.

Cuando se utilizó como molde ADN genómico el tiempo de desnaturalización inicial fue de 5 min.

Transformación de bacterias

Las bacterias fueron transformadas por el método de “Shock-Térmico”: las bacterias competentes fueron incubadas con el ADN durante 15 min en hielo y sometidas a un golpe térmico a 42°C durante 90 seg. Rápidamente fueron recuperadas con el agregado de 1 ml de medio LB incubando a 37°C por 15 min. Finalmente fueron centrifugadas a baja velocidad y sembradas en placas con LB agar conteniendo el antibiótico correspondiente.

Clonado y obtención de proteínas recombinantes

Los genes de las proteínas TcNDPK1 y TcNDPK2 fueron amplificados por PCR a partir de ADN genómico de parásitos con los primers NDPK1F/NDPK1R (T^ºA: 55°C) y NDPK2F/NDPK2R (T^ºA: 50°C) respectivamente.

Los productos resultantes fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) y luego subclonados en el vector de expresión pRSET-A (Invitrogen) en los sitios de restricción que fueron incorporados a los primers: KpnI y BamHI. Las construcciones se chequearon por mapeos de restricción y por secuenciación.

Para la obtención de las proteínas recombinantes se transformaron bacterias BL21(DE3) pLys S (Invitrogen) y se las indujo de acuerdo al siguiente protocolo: un cultivo de 10 ml en fase estacionaria que creció durante la noche fue diluido en 200 ml de LB (con ampicilina y cloranfenicol) y mantenido en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a 1. Luego se lo indujo con el agregado de IPTG (concentración final, 250 mM) en agitación a temperatura ambiente de 4 a 12 hs. Las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min, lavadas con PBS, resuspendidas en 20 ml del mismo *buffer* y lisadas mediante ciclos de congelado y descongelado. El homogenato obtenido fue tratado con 0,1 U/ml de ADNasa (Invitrogen) y centrifugado a máxima velocidad a 4°C. El sobrenadante obtenido, conteniendo las proteínas recombinantes nativas fusionadas a un epítipo de 6 histidinas en su extremo N-terminal, fue pasado por una resina de Niquel-agarosa (Qiagen) de 1ml. Las proteínas fueron eluidas con cantidades crecientes de imidazol en PBS (0, 5, 20, 50, 100, 250 y 500 mM) y las diferentes alícuotas obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE. TcNDPK1 eluyó a 5mM de imidazol y TcNDPK2 a 100 mM de imidazol. Las fracciones fueron evaluadas por SDS-PAGE y WB con anticuerpos anti-His. Las proteínas recombinantes así obtenidas fueron alicuotadas y guardadas a -70°C para su posterior uso.

Para los ensayos de actividad nucleasa, la pureza de TcNDPK1 fue analizada por HPLC reversa en un equipo Beckman System Gold con una columna C18 de 4,6 mm x150 mm y un loop de 20 µl. Se utilizó un gradiente de elución compuesto por acetonitrilo/ 0,05 % (v/v) trifluoracético en agua de acuerdo al siguiente esquema: 10 min 0/100, 15 min para alcanzar 40/60, 10 min para alcanzar 60/40 y 30 min para alcanzar 100/0. El flujo fue fijado en 0,15 ml/min y la detección se realizó a 280 nm. Un pico que eluyó con un tiempo de retención de 37,6 min correspondió a TcNDPK1 y representó cerca del 90% de todas las proteínas de la muestra.

TcAK recombinante fue producida según Pereira y colaboradores (Pereira *et al.*, 2000) a partir del vector pRSET-A y bacterias BL21 DE3. La proteína con un epítipo de 6 histidinas hacia el extremo N-terminal, fue purificada mediante columnas de afinidad de Niquel-agarosa.

Obtención de anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales anti-TcNDPK1, anti-TcNDPK2 y anti- fueron obtenidos mediante la inoculación de las proteínas recombinantes en ratones. Para ello las proteínas se purificaron mediante electroforesis en gel de acrilamida y aislado de la banda correspondiente. Se inyectaron intraperitonealmente 3 hembras de 45 días de la cepa Balb/c con 10 µg de proteína previamente homogeneizada con adyuvante de Freund (Sigma). Luego de 3 dosis espaciadas por un intervalo de 15 días los ratones fueron sangrados y los sueros resultantes fueron evaluados por WB y utilizados en los diferentes estudios.

Manipulación de parásitos

Cultivo de parásitos

Los epimastigotes de la cepa CL Brener fueron cultivados en 5 ml de medio de cultivo LIT (Camargo, 1964) a 28°C en botellas de 25 ml. En los casos en donde se necesitara una cantidad mayor de parásitos, éstos fueron cultivados en erlenmeyers de mayor volumen de acuerdo a las necesidades.

Los extractos de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes utilizados en los WB pertenecen a la cepa Y y fueron gentilmente cedidos por la Dra. María Julia Manso-Alves de la Universidad de San Pablo, Brasil.

En todos los casos, los parásitos fueron contados utilizando una cámara hemocitométrica (cámara de Neubauer).

Preparación de extractos proteicos

Para los ensayos de actividad enzimática los epimastigotes fueron contados en una cámara de Neubauer, lavados dos veces con PBS y resuspendidos en *Buffer* de lisis (50

mM *Buffer* Tris-HCl pH 7, 10 μ M de inhibidor de proteasas E-64). Los parásitos fueron lisados con 7 ciclos de congelado y descongelado en nitrógeno líquido para obtener los extractos totales. En los casos indicados, alícuotas de los mismos fueron centrifugadas a 12.000 rpm y el sobrenadante fue separado del pellet obteniéndose el extracto soluble y el pellet respectivamente. Las proteínas fueron cuantificadas según el método de Bradford.

Para los ensayos de WB los parásitos fueron contados, lavados dos veces con PBS y resuspendidos directamente en *buffer* de siembra 1X (*Cracking buffer*).

Preparación de ADN genómico de epimastigotes de T. cruzi

Un cultivo de 1-2 ml de epimastigotes en fase logarítmica tardía fue centrifugado a 3.000 r.p.m durante 5 min y lavado con PBS. Los parásitos fueron resuspendidos en 1 ml de *buffer* de lisis (Tris-HCl, 10 mM pH 7,5; EDTA, 100 mM; SDS, 0,1%), se les agregó 0,5 ml de PIC (Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1, equilibrado con Tris) y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13.200 r.p.m por 1 min y se volvió a repetir la extracción con PIC. Luego se extrajo con 0,5 ml de cloroformo isoamílico (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1) y se precipitó el ADN con el agregado de un volumen de isopropanol centrifugando durante 20 min a máxima velocidad. El pellet se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 100-200 μ l de agua.

Extracción con Digitonina

Se recolectaron $5,2 \times 10^9$ epimastigotes provenientes de un cultivo de 200 ml en fase logarítmica, se los lavó dos veces con PBS y se los resuspendió en 4 ml de *Buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7.5 con 250 mM de sacarosa y 10 μ M de E-64. Se colocaron alícuotas de 500 μ l en diferentes eppendorfs a las cuales se les adhirió 450 μ l del mismo *buffer* y la cantidad necesaria de una solución concentrada de digitonina (100 mg/ml) para llegar a una concentración final de 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 1 y 5 mg/ml de digitonina. Todos los tubos se llevaron a 1 ml y fueron incubados durante 2,5 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se centrifugaron a 12.000 rpm por 2 min, el sobrenadante se alicuotó y congeló a -70 °C. Los pellets fueron lavados dos veces con *buffer*, resuspendidos en el mismo volumen y sometidos a 5 ciclos de congelado y descongelado; luego fueron alicuotados y congelados a -70°C. Las muestras fueron

cuantificadas por el método de Bradford y analizadas para actividad enzimática y WB. La actividad enzimática fue evaluada según el porcentaje de actividad soluble de acuerdo a la siguiente ecuación: % actividad soluble = $\frac{\text{actividad sobrenadante}}{\text{actividad sobrenadante} + \text{actividad en pellet}} \times 100$

Purificación de flagelos

Todo el proceso de purificación fue realizada a 4°C según Saborio y colaboradores (Saborio *et al.*, 1989). Aproximadamente 10^9 epimastigotes fueron cosechados por centrifugación a 1.500 xg por 10 min, resuspendidos en 4 ml de *buffer* de lisis (*Buffer* Tricina 100 mM pH 8,5, 1% NP-40, 20 μ M de E-64, 50 μ M TLCK, 50 μ M PMSF), lisadas en hielo durante 10 min y centrifugadas nuevamente a 1500 xg por 10 min. El sobrenadante obtenido (S1) fue conservado y el pellet se extrajo por segunda vez con el mismo *buffer*. Luego de una centrifugación a 1.500 xg el sobrenadante (S2) fue conservado y el pellet fue resuspendido en 4 ml de *buffer* con alta concentración de sal para despolimerizar los microtúbulos (*Buffer* Tricina 100 mM pH 8,5, 0,1% NP-40, 1M de NaCl, 20 μ M de E-64, 50 μ M TLCK, 50 μ M PMSF), incubado 10 min en hielo y centrifugado a 300 xg por 10 min para separar nucleoproteínas de alto peso molecular y agregados grandes. Posteriormente se centrifugó otros 10 min a 12.000 xg, el sobrenadante (S3) fue guardado y el pellet se extrajo nuevamente con el mismo *buffer*. Luego de una centrifugación a la misma velocidad se conservó el sobrenadante (S4) y el pellet conteniendo los flagelos purificados (F) fue resuspendido en 400 μ l de *Buffer* Tricina 100mM. Todas las fracciones fueron alicuotadas y guardadas a -70°C para su posterior análisis.

Preparación de fracciones de membranas

Las membranas fueron extraídas según Ulloa y col. (Ulloa *et al.*, 1995). Toda la extracción fue llevada a cabo a 4°C. 410^9 epimastigotes provenientes de 100 ml de cultivo fueron recolectados por centrifugación a 5000 rpm y lavados en 5 ml de *buffer* isotónico (Tris 50mM pH 7, 250 mM sacarosa, 10 μ M E-64). El pellet de parásitos fue resuspendido en 1ml de *buffer* Tris 100 mM pH 7, 10 μ M E-64 y lisado mediante 5 ciclos de congelado y descongelado. El extracto total obtenido (E) fue sometido a 3 centrifugaciones sucesivas, 121 xg por 15 min, 1000 xg por 15 min y 105000 xg por 60

min. Los sedimentos de cada centrifugación fueron lavados 2 veces con el mismo *buffer* y resuspendidos en 500 μ l. Los mismos corresponden a fracciones enriquecidas en núcleos (N), flagelos (F) y membranas (M) respectivamente. El sobrenadante obtenido corresponde a la fracción soluble (S).

Tratamiento de extractos con endoglicosilasa H y fosfatasa alcalina

Un extracto proteico obtenido mediante sucesivos ciclos de congelado y descongelado a partir de 2×10^8 epimastigotes en 400 μ l de *buffer* Tris 50 mM pH 7, 20 μ M E-64 (5 μ g de proteínas/ μ l) fue dividido en dos tubos a los cuales se les agregó *buffer* para endoH y a uno de ellos se le adicionó la enzima. Las muestras fueron incubadas y analizadas por WB con anticuerpos anti-TcNDPK2. Este procedimiento fue llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Caramelo (Laboratorio de Biología Estructural y Celular, Fundación Leloir).

Para el tratamiento con SAP se procedió de la misma manera. Se resuspendieron parásitos a una concentración de 5×10^6 /20 μ l de *buffer* Tris 100 mM pH 8, se les adicionó *buffer* SAP y 1 U de la enzima. El tubo control no recibió la enzima. Las muestras fueron incubadas durante 4 hs a 37°C y analizadas por WB con anticuerpos anti-TcNDPK2.

Tratamiento de parásitos sobre-expresando TcNDPK1 con benznidazol

En diferentes pocillos de una microplaca se depositaron parásitos en medio LIT fresco a los cuales se les adicionó el volumen necesario de benznidazol (Roche) diluido en el mismo medio para llegar a las concentraciones finales de 20- 17,5-15-12,5-10-7,5-5-2,5-1,25-0 μ M y 10^6 epimastigotes/ml en 200 μ l. Los cultivos fueron incubados a 28°C y contados durante 7 días. Las curvas se realizaron por duplicado y como control se utilizaron parásitos sobre-expresando la proteína GFP. Los datos mostrados son representativos de tres ensayos independientes.

Tratamiento con estrés hiposmótico de parásitos N1-eGFP

Los parásitos transgénicos sobre-expresando la proteína de fusión N1-eGFP y los parásitos control (eGFP) fueron adheridos a varios portaobjetos tratados con polilisinas durante 20 min en PBS isosmótico. Luego de quitar el exceso de parásitos por volcado,

se los lavó y cubrió con PBS diluido 1:4 para someterlos a un estrés hiposmótico durante 10 min. Pasado ese tiempo se lavaron y sumergieron en PBS isosmótico nuevamente. El proceso fue seguido durante una hora. A los diferentes tiempos (0 min (control), 10 min de estrés, 10-30 y 60 min post-estrés, los parásitos fueron fijados en 4% de para-formaldehído durante 20 min, sumergidos en metanol para limpiarlos, lavados con PBS tres veces y montados con líquido de montaje conteniendo DAPI. Las diferentes muestras fueron observadas y fotografiadas al microscopio de fluorescencia confocal Zeiss LSM50.

Ensayos con peróxido de hidrógeno y otros agentes oxidantes

Para los ensayos de inducción, un total de 10^7 parásitos en fase exponencial de crecimiento fueron tratados con 200 μM de peróxido de hidrógeno en 10 ml medio LIT. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas con igual nº de parásitos, fueron lavadas 2 veces con PBS y resuspendidas en el mismo volumen de *buffer* de lisis (Tris 50 mM pH 7.3, E-64 10 μM). Las células fueron lisadas mediante 5 ciclos de congelado y descongelado, centrifugadas 5 min a máxima velocidad y el sobrenadante obtenido fue analizado por WB para la detección de TcAK. El tiempo 0 corresponde al momento previo a la adición del H_2O_2 . En los casos del tratamiento con nitroprusiato de sodio, azul de metileno, benznidazol y nifurtimox se procedió de igual manera pero exponiendo a los parásitos a diferentes concentraciones durante 2 hs. Se ensayaron para el nitroprusiato: 0- 40-200-1000 μM ; para el azul de metileno: 0-20-100-500 μM ; para el benznidazol y nifurtimox: 0-2-10-50 μM .

Los ensayos de supervivencia al H_2O_2 para los parásitos transgénicos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. Se partió de 10^6 parásitos/ml que fueron expuestos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0-100-300-500-1000 μM) en un volumen final de 200 μl . La densidad celular fue registrada a los días 5, 6 y 7 de cultivo.

Medición de tioles

Los tioles totales, incluyendo los de bajo peso molecular, fueron cuantificados utilizando un ensayo con DNTB (Ellman, 1959). Muestras de $5 \cdot 10^7$ parásitos fueron lavadas con PBS y resuspendidas en *buffer* Tris conteniendo 1% de tritón X-100 y 10 mM EDTA e incubadas a 4°C durante 10 min. Luego de ser centrifugadas los tioles

presentes en 20 μ l del sobrenadante se mezclaron con 80 μ l del reactivo DNTB y se midió la absorbancia a 412 nm. Como estandar se utilizó glutatión reducido (Sigma).

Transfección de epimastigotes y selección

Aproximadamente 10^8 parásitos fueron recolectados por centrifugación a baja velocidad, lavados 1 vez con *buffer* de transfección (PBS conteniendo 0,5 mM MgCl y 0,1 mM de CaCl₂) y resuspendidos en 400 μ l del mismo *buffer*. Los parásitos fueron depositados en una cubeta para electroporación de 0,2 cm (BioRad) junto con 50 μ g de ADN, sometidos a un pulso de 400 V y 500 μ F con una constante de tiempo de aproximadamente 5 ms y colocados en botellas con 5ml de LIT fresco. Luego de 24 hs de incubación a 28°C se comenzó el proceso de selección con el agregado de 500 μ g/ml de G418 (Gibco BRL). Cuando los parásitos comenzaron a crecer fueron repicados manteniendo la concentración de droga; cuando estuvieron en su totalidad seleccionados fueron mantenidos en cultivo con 200 μ g/ml. Como control de selección se utilizaron epimastigotes transfectados con el mismo vector expresando a la proteína marcadora GFP.

Mapeo del 5'UTR del ARNm de TcNDPK2

Para el mapeo del 5'UTR se extrajo el ARN total de 5×10^7 epimastigotes con el kit Nucleospin RNAII (MACHEREY-NAGEL) a partir del cual se obtuvo el ADNc con la siguiente reacción: 1 μ l de oligodT (500 ng/ μ l, Biodynamics), 1 μ l de transcriptasa reversa (MMLV, Promega), 1 μ l de dNTPs (50 mM, Promega), 1 μ l de inhibidor de ARNasa (Promega), 4 μ l de *buffer* (5X, Promega) y 10 μ l de ARN en un volumen final de 20 μ l durante 1 h a 38 °C y luego 5 min a 95 °C para inactivar la enzima. El ARNm de TcNDPK2 se amplificó con los oligos SL y NDPK2R (T[°]A: 57°C), el producto obtenido fue utilizado en una segunda PCR semianidada con oligos SL y DM10R (T[°]A: 54°C). El resultado fue una única banda de aproximadamente 400 pb que fue clonada en el vector pGEM-T Easy y secuenciada en 4 de los clones obtenidos.

Construcciones genéticas para *T. cruzi*

Construcción del vector de sobre-expresión de TcNDPK1

El gen de TcNDPK1 (Tc00.1047053508707.200) clonado en el vector pGEM-T Easy fue extraído con la enzima de restricción EcoRI, ligado al vector pTREX previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado. La orientación del gen fue chequeada con las enzimas BamHI, EcoRI y KpnI. La construcción fue secuenciada y transfectada en epimastigotes.

Construcción de la fusión TcNDPK1-eGFP (N1-eGFP)

El gen de TcNDPK1 (Tc00.1047053508707.200) fue amplificado en una PCR con PFU a partir del vector pRSET A-NDPK1 con los oligonucleótidos N1FF y N1FR (TªA: 54°C) y subclonado en el vector pGEM-T Easy. Esta construcción fue chequeada con las enzimas EcoRI, XbaI y PstI para determinar la orientación del inserto, ya que río abajo se clonará la eGFP. Luego se la digirió con Sall y NsiI para linealizarla y se le fusionó la eGFP río abajo (sin el ATG inicial y sin el codón STOP) liberada de un vector pGEM-T Easy con las enzimas Sall y PstI (PstI y NsiI son enzimas compatibles). Una vez obtenida la fusión N1-eGFP “stopless” en el pGEM-T Easy, se clonó en el vector pTREX entre los sitios XbaI y HindIII (que provienen del primer N1FF y del fragmento eGFP). Para la generación del codón stop se digirió el plásmido obtenido con HindIII, se realizó un llenado de los extremos con la enzima Klenow (NEB) y se religaron los extremos romos. Como en el rellenado se formó un sitio para NheI, los clones fueron chequeados con esa enzima.

Para la construcción control pTREX-eGFP, se amplificó con PFU el gen de la eGFP a partir de la fusión terminada pTREX-N1-eGFP con los oligonucleótidos XATGS-eGFP y IG1G2T2CR (TªA: 54°C). El producto de PCR fue digerido directamente con XbaI y XhoI (este sitio proviene del vector pTREX molde ya que el oligonucleótido se une cerca de la región gapdh I II) y clonado en los mismos sitios en el vector de expresión pTREX. Las construcciones fueron chequeadas por mapeo de restricción y transfectadas en epimastigotes.

Construcción de la fusión Ups-TcNDPK2-GFP (Ups-N2)

El gen de TcNDPK2 (Tc00.1047053508461.400), su región intergénica y parte del marco de lectura abierto río arriba (Ups-N2, 72 nucleótidos del ORF más 258 pb de la región intergénica, (<http://www.genedb.org/>) fueron amplificados a partir de ADN genómico con los oligonucleótidos NOUF/NNSR en una PCR con la enzima PFU (TªA: 54ºC) (Fig. 53). El producto obtenido fue subclonado en el vector pGEM-T Easy y clonado en el vector pTREX con las enzimas BamHI y XbaI (ambos sitios incorporados en los oligonucleótidos). A esta construcción se le adicionó entre los sitios XbaI y Sall la GFP proveniente del vector pTREX-GFP liberada con las enzimas XbaI y XhoI. La construcción final fue chequeada por mapeo de restricción e introducida en epimastigotes. Notar que el segmento HX1 del pTREX no forma parte de la construcción final por las enzimas de restricción utilizadas, constituyendo un vector de expresión similar al pRIBOTEX. A su vez la GFP mantuvo su codón de iniciación de la traducción.

Construcción de la fusión Ups-DM10-GFP (Ups-DM10)

El dominio DM10 junto con la región intergénica y parte del marco de lectura abierto río arriba del gen de TcNDPK2 fue amplificado a partir del vector pGEM-T Easy conteniendo el fragmento Ups-N2 con los oligonucleótidos NOUF/DM10R en una PCR con la enzima PFU (TªA: 54ºC) (Fig. 53). El producto obtenido fue subclonado en el vector pGEM-T Easy y clonado en el vector pTREX con las enzimas BamHI y XbaI. A esta construcción se le adicionó entre los sitios XbaI y Sall la GFP proveniente del vector pTREX-GFP liberada con las enzimas XbaI y XhoI. La construcción final fue chequeada por mapeo de restricción e introducida en epimastigotes.

Notar que el segmento HX1 del pTREX no forma parte de la construcción final por las enzimas de restricción utilizadas, constituyendo un vector de expresión similar al pRIBOTEX. A su vez la GFP mantuvo su codón de iniciación de la traducción.

Construcción de la fusión TcNDPK2-GFP (N2)

El gen de TcNDPK2 completo fue amplificado a partir del vector pGEM-T Easy conteniendo el fragmento Ups-N2 con los oligonucleótidos DM10F y NNSR (TªA: 54ºC)

en una reacción de PCR utilizando la enzima PFU y subclonado en el vector pGEM-Teasy (Fig. 53). El gen fue fusionado a GFP mediante la digestión con XbaI, cuyo sitio fue incorporado en ambos oligonucleótidos, y ligación en el vector pTREX-GFP previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado. La construcción fue chequeada por mapeo de restricción y transfectada en epimastigotes.

Construcción de la fusión DM10-GFP (DM10)

El dominio DM10 fue amplificado por PCR a partir del vector pRSETA-NDPK2 con los primers DM10F y DM10R (T[°]A: 54°C), ambos conteniendo los sitios para la enzima de restricción XbaI (Fig. 53). El producto de PCR fue directamente digerido y ligado al vector pTREX-GFP previamente linealizado con la misma enzima y desfosforilado. La construcción fue chequeada por mapeo de restricción y secuenciación e introducida en epimastigotes. Tener en cuenta que la GFP mantuvo su codón de iniciación de la traducción.

Construcción de la fusión ΔDM10-GFP (ΔDM10)

El gen de TcNDPK2 sin su dominio N-terminal DM10 fue amplificado a partir del vector pGEM-T Easy conteniendo el fragmento Ups-N2 con los oligonucleótidos NdDM10 y NNSR (T[°]A: 54°C) en una reacción de PCR utilizando la enzima PFU y subclonado en el vector pGEM-Teasy (Fig. 53). El gen fue fusionado a GFP mediante la digestión con XbaI (sitios provenientes de los oligonucleótidos) y ligación en el vector pTREX-GFP previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado. La construcción fue chequeada por mapeo de restricción y transfectada en epimastigotes

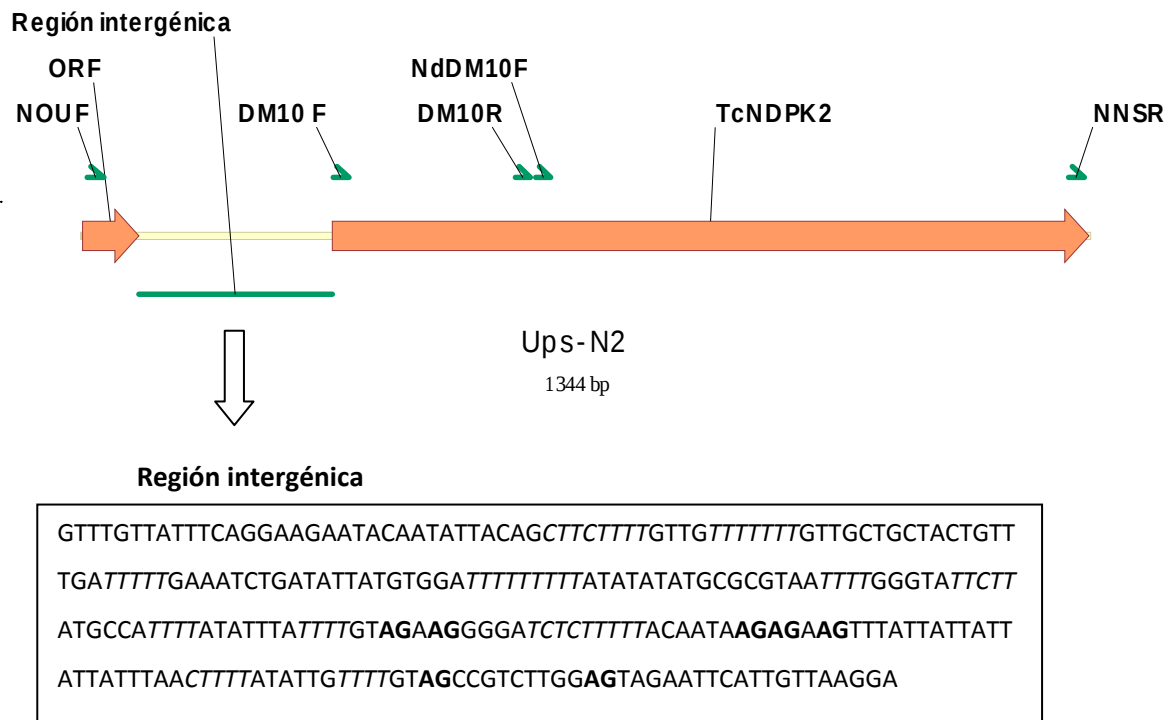


Figura 53: Esquema de la PCR para Ups-N2 a partir de la cual se llevaron a cabo las demás construcciones. Se muestran a TcNDPK2, parte del ORF río arriba y la región intergénica. También se indican los oligonucleótidos utilizados en todas las construcciones. Se detalla la región intergénica con las regiones ricas en polipirimidinas (italizadas) que son los sitios reconocidos para *trans-splicing* y los nucleótidos AG (resaltados) que son las posibles secuenciasceptoras del SL.

Inmunofluorescencias

Aproximadamente 5×10^7 parásitos en fase exponencial fueron recolectados, lavados con PBS y resuspendidos en 500 μ l del mismo *buffer*. 200 μ l de la suspensión fueron depositados en portaobjetos pretratados con polilisinas durante 20 min. Los parásitos adheridos al vidrio se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 min y se permeabilizaron con metanol a -20°C por 5 min o con 0,1% Tritón-X100 en PBS por 10 min. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon durante 10 min con 1% BSA en PBS. Luego, en una cámara húmeda, se incubó 45 min con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, se lavó 3 veces con PBS y se incubó 30 min más con el anticuerpo secundario en la misma solución. Los parásitos fueron lavados

tres veces con PBS y montados con líquido de montaje VECTASHIELD (Vector) conteniendo DAPI.

Para las inmunofluorescencias sobre citoesqueletos extraídos, los parásitos adheridos al vidrio fueron tratados *in situ* durante 2 min con *buffer* PIPES 100 mM pH 7 conteniendo 1% de Tritón X-100 y 1 mM de NaCl frío (adaptado de D'angelo *et al.*, 2004) o con *buffer* Pipes 100 mM pH 7 conteniendo 0,25 % NP-40 y 1 mM MgCl₂ durante 5 min (Bonhivers *et al.*, 2008). Luego del tratamiento las muestras fueron lavadas 4 veces con PBS y fijadas como se detalla arriba.

La marcación con Mitotracker Red CMXRos (M7512, Molecular Probes) se realizó incubando los parásitos con 100 nM del colorante en LIT completo durante 60 min a 28°C. Se los lavó dos veces con LIT y se los incubó por 30 min más a 28°C en el mismo medio y finalmente se procedió según el protocolo para inmunofluorescencia. Las inmunofluorescencias control (suero Pre-inmune o incubación con anticuerpo secundario únicamente) se realizaron sin previo bloqueo.

Las diluciones de los anticuerpos utilizados fueron: anti-TcAK, 1:50; anti-TcNDPK2, 1:100; anti-GFP, 1:500; anti-GDH, 1:500; anti-HK, 1:200; anti-cruzipaína, 1:200 y anti-PAR2, 1:100; anti-PPasa, 1:100; anti-aqp 1:500; anti-ratón conjugado a Rojo de Texas 1:200; anti-ratón conjugado a FITC 1:1000; anti-conejo conjugado a FITC 1:1000; anti-conejo conjugado a Alexa 546 1:1000.

Las fotos fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 o en el caso de la co-localización de TcNDPK1-eGFP con la vacuola contráctil en un microscopio de fluorescencia confocal Zeiss LSM50.

Inmunocitoquímica

Los parásitos provenientes de un cultivo de 10 ml en fase exponencial tardía fueron centrifugados a baja velocidad, lavados dos veces con PBS y fijados en 10 ml de *buffer* cacodilato 100 mM pH 7,2, 0,1% glutaraldehído, 4% paraformaldehído, 5mM CaCl₂ y 3,7% sacarosa durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de dos lavados con PBS se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol en un volumen final de 2 ml de acuerdo a lo siguiente: etanol 30% 20 min a 4°C, etanol 50% 20 min a 4°C, etanol 70% 20 min a -20°C, etanol 90% 20 min a -20°C y dos veces etanol 100% 20 min a -

20°C. Posteriormente los parásitos se centrifugaron y se dejaron embebiendo en resina acrílica (UNICRYL, Sigma) aumentando la proporción resina:etanol sucesivamente durante 5 días. Una vez que la resina estuvo polimerizada por acción de la luz UV a -20°C, se cortó en capas ultrafinas con micrótomo para los ensayos de inmunocitoquímica. Las grillas conteniendo los cortes de los parásitos se incubaron 30 min con glicina 50 mM en PBS y se bloquearon con PBS 1,5% BSA; 0,01% Tween20 durante otros 30 min más. Luego, se las incubó 1 h en una solución de heparán sulfato 1µg/ml para bloquear el ADN nuclear y mitocondrial y se incubó con suero anti-TcNDPK2 diluido 1:100 en solución de bloqueo durante 1 h. Se realizaron 3 lavados de 5 min con *buffer* de bloqueo y las grillas se incubaron nuevamente con anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro de 10 nm diluido 1:100 en la misma solución por una hora más. Las grillas se lavaron con agua estéril y luego de 24 hs se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de chumbo. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200. Estos estudios fueron realizados en el laboratorio de Ultra Estructura de *Trypanosoma cruzi*, de la Universidad Nacional de Río de Janeiro dirigido por el Dr. Prof. Wanderley de Souza.

Análisis Bioinformáticos

Las secuencias de las NDPKs de *T. cruzi* fueron obtenidas de los proyectos genoma “Tritryps” en la bases de datos GeneDB (<http://www.genedb.org/>) y TcruzidB (<http://tcruzidb.org/>). Los alineamientos locales se realizaron con el programa BLAST disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los alineamientos globales, el análisis de las secuencias de ADN y el diseño de oligonucleótidos fue llevado a cabo mediante el programa Vector NTI v.10 (Invitrogen).

Para la construcción del fenograma y alineamientos respectivos se seleccionaron un grupo de secuencias aminoacídicas de NDPKs disponibles en el GeneBank, se realizó un alineamiento y se agruparon de acuerdo a su identidad con el algoritmo ClustalW (Higgins y Sharp, 1988), luego se representó esquemáticamente con el programa Treeview (Page, 1996). Para la predicción de modificaciones post-traduccionales de TcNDPK2 se utilizaron los programas disponibles en el sitio EXPASY (<http://www.expasy.ch/tools/>)

Oligonucleótidos

NDPK1F 5' GGATCCATGACCAGTGAGCGTACCTT 3' (BamHI)

NDPK1R 5' GGTACCTCAACGCTGTCAGAGCCATGGCACACGTTTC 3' (KpnI)

NDPK2F 5' GGATCCATGACAACACTTCTCGTTA 3' (BamHI)

NDPK2R 5' GGTACCTTGATTACTTTTTCTCAATC 3' (KpnI)

DM10F 5' AAATTCTAGATGACAACACTTCTCGTTATG 3' (XbaI)

DM10R 5' AAATTCTAGACGAAAAAGTGTGCGCGTTG 3' (XbaI)

NOUF 5' GGATCCATAAAGCCCCTTGCTCAACGTA 3' (BamHI)

NNSR 5' TCTAGAAAGGTTTTGGAGAAGCGAAAA 3' (XbaI)

NdDM10F 5' TCTAGATGGGGGAGTTTATTCTAATT 3' (XbaI)

NdpK1FF 5' TCTAGATGACCAGTGAGCGTACCTTC 3' (XbaI)

NdpK1FR 5' GTCGACTGCAGACTCGTAGACCTGCTT 3' (SalI)

XATGS-eGFPF 5' TTTTTCTAGATGGTCGACGTGAGCAAGGGC 3' (XbaI)

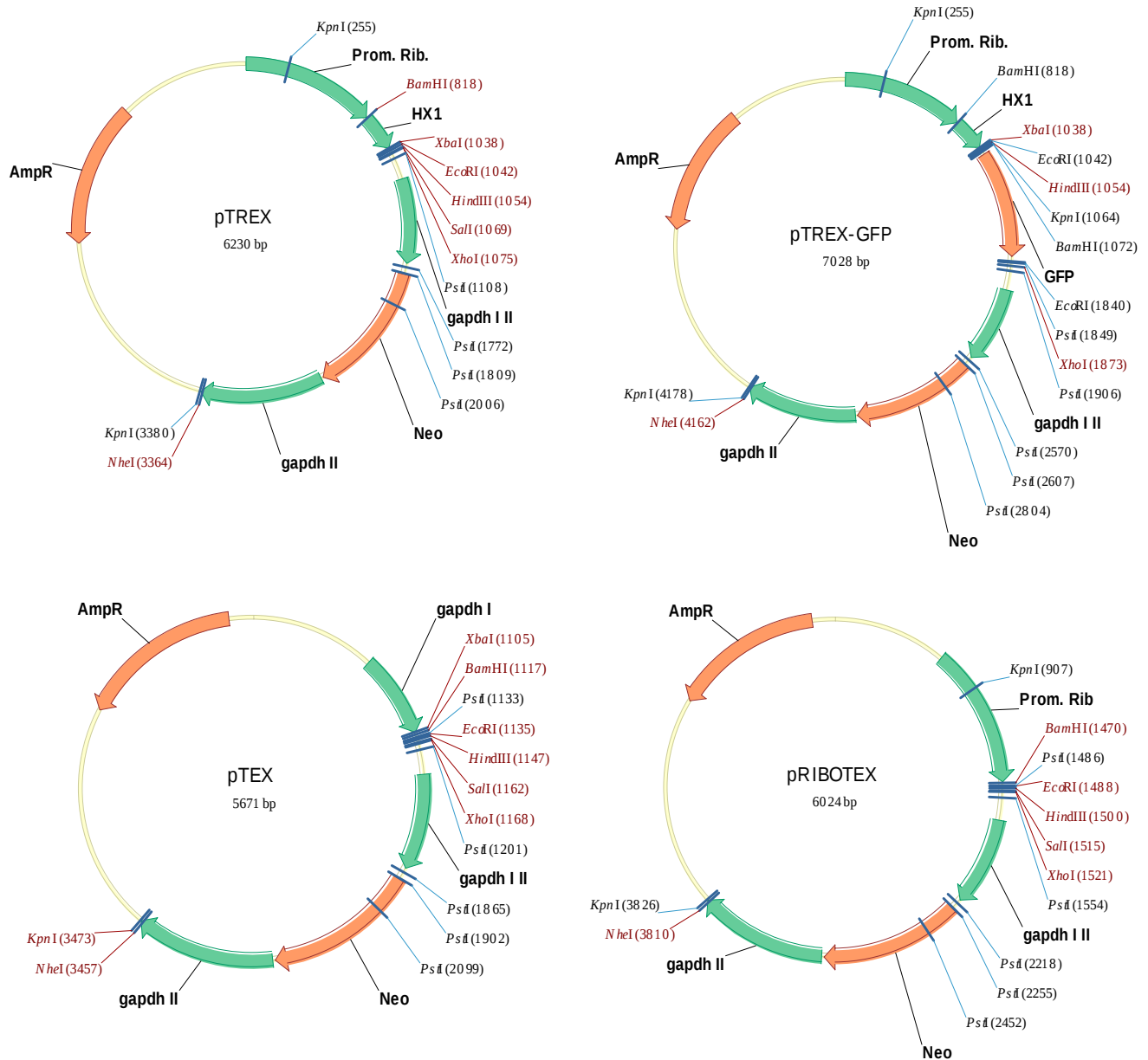
IG1G2T2CR 5' CGCTGTGTCACCTTGGATCGTG 3'

SL 5' AACGCTATTATTGATACAGTTTCTGTACTATATTG 3'

Las secuencias subrayadas indican los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción anotadas en paréntesis.

Plásmidos

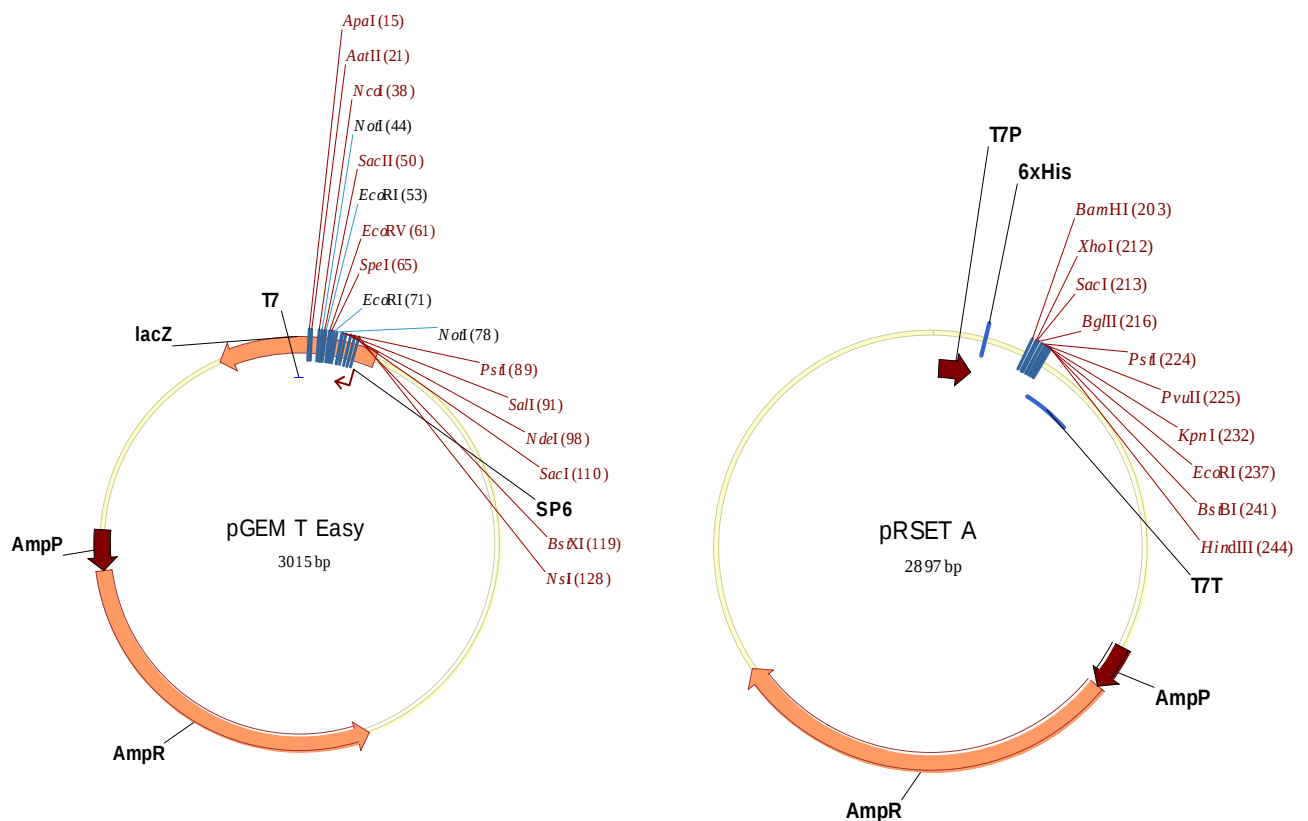
Vectores para *T. cruzi*: pTREX, pRIBOTEX y pTEX



Vectores para *T. cruzi* utilizados en el estudio: pTREX y pTREX-GFP. Se muestran también el pRIBOTEX y pTEX, otros dos vectores también usados para el estudio del parásito. Se indican en cada uno las secuencias que lo conforman. Prom. Rib: promotor ribosomal; HX1: secuencia señal de tran-splicing; gapdh I, I II y II: regiones intergénicas de los genes de la gapdh I y II (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa I y II) ubicados

en un mismo locus génico dentro del parásito; neo: marcador de resistencia para G418 (neomicina); AmpR: marcador de resistencia a ampicilina; GFP: gen de la proteína verde fluorescente. Dentro de cada vector figura el tamaño en pb. Se indican los sitios para las enzimas de restricción utilizadas en trabajo, notar que las que están escritas en rojo tienen un único sitio de reconocimiento. Con pTREX se obtienen niveles más altos de expresión que con el pRIBOTEX, y a su vez, con este último niveles mayores que con pTEX (Kelly *et al.*, 1992, Martinez-Calvillo *et al.*, 1997, Vazquez y Levin, 1999).

Plásmidos comerciales: pGEM-T Easy y pRSET A



Vectores de clonado y de expresión en bacterias utilizados en este trabajo, pGEM-T Easy (Promega) y pRSET A (Invitrogen). Se indican las secuencias que componen a cada

uno de los vectores: AmpP: promotor para la transcripción del marcador de resistencia; AmpR: marcador de resistencia a ampicilina; lacZ: gen de la β -galactosidasa; T7P: promotor para la polimerasa del fago T7; T7T: terminador de la transcripción para la polimerasa del fago T7; T7 y SP6: sitios de unión a oligonucleótidos; 6xHis: cola N-terminal de 6 histidinas para marcar la proteína de interés. Dentro de cada vector figura el tamaño en pb. Se indican las enzimas de restricción pertenecientes al sitio de clonado múltiple.

Anticuerpos

Los anticuerpos policlonales de conejo anti-HK fueron cedidos por el Dr. Juan Luis Concepción (Universidad de los Andes, Venezuela), los anticuerpos policlonales de conejo anti-GDH por el Dr. Juan José Cazzulo (Universidad Nacional de San Martín, Argentina), los anticuerpos monoclonales anti-PAR2 por la Dra. Maria Julia Manso Alves (Universidad de San de Pablo, Brasil) , los anticuerpos monoclonales anti-PPasa y los policlonales de conejo anti-AQP por el Dr. Roberto Docampo (Universidad de Georgia, Estados Unidos) y los anticuerpos de ratón anti-mAAT por la Dra. Cristina Nowicki (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires). Los anticuerpos policlonales de ratón anti-TcNDPK2 y anti-TcAK fueron producidos en el laboratorio como se indica en esta sección. Anticuerpos comerciales utilizados: anti-ratón y anti-conejo conjugados a fosfatasa alcalina y anti-ratón Rojo de Texas (Vector Laboratories); anti-tubulina, (Oncogene); anti-GFP y anti-his (Invitrogene); anti-conejo FITC (Sigma); anti-ratón FITC (Vector Laboratories); anti-ratón oro 10 nm (BB international).

Soluciones

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7

Buffer Tris-Glicina-SDS 10X: (1 litro) 30,3 g Tris Base; 144 g glicina; 1% (v/v) SDS

Buffer Tris-Glicina 10X: (1 litro) 30,3 g Tris Base; 144 g glicina

Buffer de siembra para muestras de proteínas (*Cracking buffer*) 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 de siembra para muestras de ADN (*Loading buffer*) 6X: 0,25% (p/v) azul de bromofenol; 0,25 % (p/v) Xylen Cyanol; 30% glicerol

TAE 50X: (1 litro) 242 g Tris Base; 57,1 ml de ácido acético glacial; 100 ml 0,5 M EDTA (pH8)

Azul de Coomassie: 0,25% (v/v) Coomassie R250; 30% metanol; 10% ácido acético

PI: 25 mM Tris-HCl (pH 8); 10 mM EDTA (pH 8); 50 mM glucosa

PII: 0,2 N NaOH; 1% SDS

PIII: 3M acetato de potasio (pH 4,8) o 3M acetato de sodio (pH 5,2)

Buffer de transferencia: *Buffer* Tris-Glicina 1X; 20% metanol

Buffer T-PBS: PBS; 0,05% Tween20

Medios de cultivo

LB: Invitrogen

LB agar: LB 2% (p/v) bactoagar

LIT: 1 (litro) 5g Triptosa; 5g extracto de hígado; 3,97 g NaCl; 0,395 g KCl; 3,12 g HPO_4Na_2 ; 2g glucosa. Suplementado con 10% SFB, 20 $\mu\text{g/ml}$ hemina y STR/PEN, 100 $\mu\text{g/ml}$ y 100 U/ml respectivamente

Ampicilina: 100 $\mu\text{g/ml}$ concentración final

Cloranfenicol: 40 $\mu\text{g/ml}$ concentración final

Para el clonado en pGEM-T Easy

IPTG: 0,4 mM concentración final

X-Gal: 0,2% concentración final

Cepas bacterianas

E. coli DH5 α F': F'/endA hsdR17(r_k^- m $_k^+$) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nal r) relA1 $\Delta(lacZYA-argF)U169$ (Φ 80dlacZ Δ M15) Cm s

E. coli BL21 DE3 pLysS: F $^-$ ompT hsdS $_B$ (r_B^- m $_B^-$) gal dcm λ (DE3) pLysS Cm r

SECCIÓN IV

7. BIBLIOGRAFÍA

Anderca MI, Furuichi T, Pinontoan R, Muto S. Identification of a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase from the green alga *Dunaliella tertiolecta*. Plant Cell Physiol. 2002; 43(11):1276-84.

Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P, Romanha AJ. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. J Proteome Res. 2008; 7(6):2357-67

Aranda, A., Maugeri, D., Uttaro, A.D., Oppendoes, F., Cazzulo, J.J., Nowicki, C. The malate dehydrogenase isoforms from *Trypanosoma brucei*: subcellular localization and differential expression in bloodstream and procyclic forms. Int. J. Parasitol. 2006; 36: 295-307.

Ariyanayagam MR, Fairlamb AH Diamine auxotrophy may be a universal feature of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Mol Biochem Parasitol. 1997; 84(1):111-21.

Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. Ovotiol and trypanotione as antioxidants in trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. 2001; 115: 189-198.

Atwood JA 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Oppendoes FR, Orlando R, Tarleton RL. The *Trypanosoma cruzi* proteome. Science. 2005; 309(5733):473-6.

Bakker BM, Walsh MC, ter Kuile BH, Mensonides FI, Michels PA, Oppendoes FR, Westerhoff HV. Contribution of glucose transport to the control of the glycolytic flux in *Trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(18):10098-103.

Barderis P, Campetella O, Frasch AC, Santomé JA, Hellman U, Pettersson U, Cazzulo JJ. The NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: sequence, genomic organization and expression. *Biochem J*. 1998; 330 (Pt 2):951-8.

Baron DM, Ralston KS, Kabututu ZP, Hill KL. Functional genomics in *Trypanosoma brucei* identifies evolutionarily conserved components of motile flagella. *J Cell Sci*. 2007; 120(Pt 3):478-91.

Barrett M.P., Burchmore R.J., Stich A., Lazzari J.O., Frasch A.C., Cazzulo J.J., Krishna S.,. The trypanosomiasis. *Lancet*; 2003, 362(9394):1469-80.

Bastin P, Gull K. Assembly and function of complex flagellar structures illustrated by the paraflagellar rod of trypanosomes. *Protist*. 1999; 150(2):113-23.

Bastin P, Pullen TJ, Moreira-Leite FF, Gull K. Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. *Microbes Infect*. 2000; 2(15):1865-74.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U y col. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. 2005; 309(5733):416-22.

Beverley SM. Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nat Rev Genet*. 2003; 4(1):11-19.

Biggs J, Hersperger E, Steeg PS, Liotta LA, Shearn A. A *Drosophila* gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell*. 1990; 63, 933–940.

Blattner J; Dörsam; Clayton CE. Function of N-terminal import signals in trypanosome microbodies. *FEBS Lett*. 1995; 360: 310-314

Blattner J; Swinkels BW; Dörsam H; Prospero T; Subramani S; Clayton C. Glycosome assembly in trypanosomes: variations in the acceptable degeneracy of a COOH-terminal microbody targeting signal. *J. Cell Biol.* 1992; 119: 1129-1136.

Bloodgood RA. Protein targeting to flagella of trypanosomatid protozoa. *Cell Biol Int.* 2000; 24(12):857-62

Bogitsh B.J., Cheng T.C., 1998. *Human Parasitology*, second edition, Academic Press.

Bominaar AA, Molijn AC, Pestel M, Veron M, Van Haastert PJ Activation of G-proteins by receptor-stimulated nucleoside diphosphate kinase in *Dictyostelium*. *EMBO J.* 1993; 12, 2275–2279.

Bonhivers M, Nowacki S, Landrein N, Robinson DR. Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated. *PLoS Biol.* 2008; 6(5):e105.

Bouvier LA, Miranda MR, Canepa GE, Alves MJ, Pereira CA. An expanded adenylate kinase gene family in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1760(6):913-21.

Branche C, Ochaya S, Aslund L, Andersson B. Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 147(1):30-8.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973, 27: 347-383.

Bringaud F, Riviere L, Coustou V. Energy metabolism of Trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 149: 1-9.

Broadhead R, Dawe HR, Farr H, Griffiths S, Hart SR, Portman N, Shaw MK, Ginger ML, Gaskell SJ, McKean PG, Gull K. Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature*. 2006; 440(7081):224-7.

Cáceres AJ, Portillo R, Acosta H, Rosales D, Quiñones W, Avilan L, Salazar L, Dubourdieu M, Michels PA, Concepción JL. Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003; 126(2):251-62.

Camargo, E.P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 12, 93–100.

Canepa GE, Silber AM, Bouvier LA, Pereira CA. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 236(1):79-84.

Cannata JJ, Cazzulo JJ. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B*. 1984; 79(3):297-308.

Canonaco F, Schlattner U, Pruett PS, Wallimann T, Sauer U. Functional expression of phosphagen kinase systems confers resistance to transient stresses in *Saccharomyces cerevisiae* by buffering the ATP pool. *J Biol Chem*. 2002; 277(35):31303-9.

Canonaco F, Schlattner U, Wallimann T, Sauer U. Functional expression of arginine kinase improves recovery from pH stress of *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*. 2003; 25(13):1013-7.

Carrillo C, Cejas S, González NS, Algranati ID. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. *FEBS Lett*. 1999; 454(3):192-6.

Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C., Franke de Cazzulo, B.M., 1989. On the regulatory properties of the pyruvate kinase from epimastigotes. FEMS Microbiol. Lett. 50, 259–263.

Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. EMBO J. 2002; 21(8):1881-8.

Cronkite DL, Neuman J, Walker D, Pierce SK. The response of contractile and non-contractile vacuoles of *Paramecium calkinsi* to widely varying salinities. J Protozool. 1991; 38(6):565-73.

Cunha-e-Silva N, Sant'Anna C, Pereira MG, Porto-Carreiro I, Jeovanio AL, de Souza W. Reservosomes: multipurpose organelles? Parasitol Res. 2006; 99(4):325-7.

D'Angelo MA, Sanguineti S, Reece JM, Birnbaumer L, Torres HN, Flawiá MM. Identification, characterization and subcellular localization of TcPDE1, a novel cAMP-specific phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. Biochem J. 2004; 378(Pt 1):63-72.

Darling TN, Davis DG, London RE, Blum JJ. Products of *Leishmania braziliensis* glucose catabolism: release of D-lactate and, under anaerobic conditions, glycerol. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84(20):7129-33

De Melo, L.D., Sant'Anna, C., Reis, S.A., Lourenço, D., De Souza, W., Lopes, U.G., Cunha-e-Silva, N.L. Evolutionary conservation of actinbinding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. Parasitology. 2008; 135: 955-965.

de Nijs L, Lakaye B, Coumans B, Léon C, Ikeda T, Delgado-Escueta AV, Grisar T, Chanas G. EFHC1, a protein mutated in juvenile myoclonic epilepsy, associates with the mitotic spindle through its N-terminus. Exp Cell Res. 2006; 312(15):2872-9.

de Oliveira AH, Cruz AK, Ruiz, JC Greene, LJ Rosa, RJ Ward. Sub-proteomics analysis of soluble proteins of the microsomal fraction from *Leishmania* species. Comp. Biochem. Physiol. Part D. 2006.

de Oliveira AH, Ruiz JC, Cruz AK, Greene LJ, Rosa JC, Ward RJ. Expression in *E. coli* and purification of the nucleoside diphosphate kinase b from *Leishmania major*. Protein Expr Purif. 2006; 49(2):244-50.

de Souza W, Carreiro IP, Miranda K, Silva NL. Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc. 2000; 72(3):421-32.

de Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr Pharm Des. 2002; 8(4):269-85.

de Souza W. Special organelles of some pathogenic protozoa. Parasitol Res. 2002; 88(12):1013-25.

Denicola A, Rubbo H, Haden L, Turrens JF. Extramitochondrial localization of NADH-fumarate reductase in trypanosomatids. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2002; 133(1):23-7

Docampo R; Moreno SNJ. Acidocalcisome: a novel Ca^{2+} storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. Parasitology Today. 1999; 15: 443-448.

Dorion S, Dumas F, Rivoal J. Autophosphorylation of Solanum chacoense cytosolic nucleoside diphosphate kinase on Ser117. J Exp Bot. 2006; 57(15):4079-88.

Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3(4):e419.

Dzeja PP, Bortolon R, Perez-Terzic C, Holmuhamedov EL, Terzic A. Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(15):10156-61.

Dzeja PP, Pucar D, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A. Reduced activity of enzymes coupling ATP-generating with ATP-consuming processes in the failing myocardium. *Mol Cell Biochem*. 1999; 201(1-2):33-40.

Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A. Failing energetics in failing hearts. *Curr Cardiol Rep*. 2000; 2(3):212-7.

Dzeja PP, Terzic A. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol*. 2003; 206(Pt 12):2039-47.

Dzeja PP, Zeleznikar RJ, Goldberg ND. Suppression of creatine kinase-catalyzed phosphotransfer results in increased phosphoryl transfer by adenylate kinase in intact skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1996; 271(22):12847-51.

Ellington WR, Suzuki T. Early evolution of the creatine kinase gene family and the capacity for creatine biosynthesis and membrane transport. *Subcell Biochem*. 2007;46:17-26.

Ellington WR. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu Rev Physiol*. 2001; 63:289-325

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70–77.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ y col. The genome sequence of

Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. Science. 2005; 309(5733):409-15.

Ersfeld K, Gull K. Targeting of cytoskeletal proteins to the flagellum of *Trypanosoma brucei*. J Cell Sci. 2000; 114(Pt 1):141-148

Fairlamb AH; Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. Annu Rev Microbiol. 1992; 46: 695-729.

Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. Cell. 2003; 112(5):659-72

Ferella, M., Li, Z.H., Andersson, B., Docampo, R. Farnesyl diphosphate synthase localizes to the cytoplasm of *Trypanosoma cruzi* and *T.brucei*. Exp. Parasitol. 2008; 119: 308-312.

Fernandez P, Haouz A, Pereira CA, Aguilar C, Alzari PM. The crystal structure of *Trypanosoma cruzi* arginine kinase. Proteins. 2007; 69(1):209-12.

Figarella K, Uzcategui NL, Zhou Y, LeFurgey A, Ouellette M, Bhattacharjee H, Mukhopadhyay R. Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis. Mol Microbiol. 2007; 65(4):1006-17.

Finzi, J.K., Chiavegatto, C.W., Corat, K.F., Lopez, J.A., Cabrera, O.G., Mielniczki-Pereira, A.A., Colli, W., Alves, M.J., Gadelha, F.R., 2004. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. Mol. Biochem. Parasitol 133, 37–43.

Fouts DL, Stryker GA, Gorski KS, Miller MJ, Nguyen TV, Wrightsman RA, Manning JE. Evidence for four distinct major protein components in the paraflagellar rod of *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 1998; 273(34):21846-55.

Ginger ML, Ngazoa ES, Pereira CA, Pullen TJ, Kabiri M, Becker K, Gull K, Steverding D. Intracellular positioning of isoforms explains an unusually large adenylate kinase gene family in the parasite *Trypanosoma brucei*. J Biol Chem. 2005; 280(12):11781-9.

Godsel LM, Engman DM. Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism. EMBO J. 1999; 18(8):2057-65.

Gull K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. Annu Rev Microbiol. 1999; 53:629-55.

Hammargren J, Salinas T, Marechal-Drouard L, Knorpp C. The pea mitochondrial nucleoside diphosphate kinase cleaves DNA and RNA. FEBS Letters. 2007; 581, 3507–3511.

Hartsough MT, Morrison DK, Salerno M, Palmieri D, Ouatas T, Mair M, Patrick J, Steeg PS. Nm23-H1 metastasis suppressor phosphorylation of kinase suppressor of Ras via a histidine protein kinase pathway. J Biol Chem. 2002; 277(35):32389-99

Haynes PA. Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? Glycobiology. 1998; 8(1):1-5.

Higgins DG, Sharp P M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. Gene 1988; 73, 237–244.

Hill JE, Scott DA, Luo S, Docampo R. Cloning and functional expression of a gene encoding a vacuolar-type proton-translocating pyrophosphatase from *Trypanosoma cruzi*. Biochem J. 2000; 351(Pt 1):281-8.

Hoare C.A., 1972. The Trypanosomes of Mammals, Blackwell Scientific Publications, USA.

Hunger-Glaser I, Hemphill A, Shalaby T, Hänni M, Seebeck T. Nucleoside diphosphate kinase of *Trypanosoma brucei*. Gene. 2000; 257, 251–257.

Hunneken F and Whiteley H. Comparative Biochemistry, Voll, Chap.4. Florkin M, Mason S (Eds) 1960, Academic Press. New York, USA.

Igoillo-Esteve M, Cazzulo JJ. The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: its role in the defense of the parasite against oxidative stress. Mol Biochem Parasitol. 2006; 149(2):170-81.

Irigoin F, Cibils L, Comini MA, Wilkinson SR, Flohé L, Radi R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. Free Radic Biol Med. 2008; 45(6):733-42.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, y col. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science. 2005; 309(5733):436-42.

Jacobs M, Huitorel P. Tubulin-associated nucleoside diphosphokinase. Eur J Biochem. 1979; 99(3):613-22.

Janin J, Dumas C, Moréra S, Xu Y, Meyer P, Chiadmi M, Cherfils J. Three-dimensional structure of nucleoside diphosphate kinase. J Bioenerg Biomembr. 2000; 32(3):215-25.

Janssen E, Dzeja PP, Oerlemans F, Simonetti AW, Heerschap A, de Haan A, Rush PS, Terjung RR, Wieringa B, Terzic A. Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement. *EMBO J.* 2000; 19(23):6371-81.

Kantor JD, McCormick B, Steeg PS, Zetter BR. Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res.* 1993; 53, 1971–1973.

Kelly JM, Taylor MC, Smith K, Hunter KJ, Fairlamb AH. Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which over-express trypanothione reductase. Sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress. *Eur J Biochem.* 1993; 218(1):29-37.

Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20(15):3963-9.

King, S.M., 2006. Axonemal protofilament ribbons, DM10 domains, and the link to juvenile myoclonic epilepsy. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 245–253.

Kolli BK, Kostal J, Zaborina O, Chakrabarty AM, Chang KP. *Leishmania*-released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP-mediated cytolysis of macrophages. *Mol Biochem Parasitol.* 2008; 158(2):163-75.

Kollien AH, Grospietsch T, Kleffmann T, Zerbst-Boroffka I, Schaub GA. Ionic composition of the rectal contents and excreta of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol.* 2001; 47(7):739-747.

Krauth-Siegel LR, Comini MA, Schlecker T. The trypanothione system. *Subcell Biochem.* 2007; 44:231-51.

Kumar P, Verma A, Saini AK, Chopra P, Chakraborti PK, Singh Y, Chowdhury S. Nucleoside diphosphate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* cleaves single strand DNA within the human c-myc promoter in an enzyme-catalyzed reaction. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(8):2707-14.

Lacombe ML, Milon L, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO. The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000; 32, 247–258.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227, 680-5.

Landfear SM, Ignatushchenko M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 115(1):1-17.

Lascu L, Gonin P. The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000; 32, 237–246.

Lee SH, Stephens JL, Englund PT. A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Apr; 5(4):287-97.

Leroux, A., Fleming-Canepa, X., Aranda, A., Maugeri, D., Cazzulo, J.J., Sánchez, M.A., Nowicki, C. Functional characterization and subcellular localization of the three malate dehydrogenase isozymes in *Leishmania* spp. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006; 149: 74-85.

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR 3rd, Lom J, Lynn D., et al. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.* 1980; 27: 37-58

Levit MN, Abramczyk BM, Stock JB, Postel EH. Interactions between *Escherichia coli* nucleoside-diphosphate kinase and DNA. 2002; *J. Biol. Chem.* 277, 5163–5167.

Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*. 2003; 2(5):830-40.

Lombardi D, Lacombe ML, Paggi MG. nm23: unraveling its biological function in cell differentiation. *J. Cell. Physiol*. 2000; 182, 144–1449.

Lombardi D, Sacchi A, D'Agostino G, Tibursi G. The association of the Nm23-M1 protein and beta-tubulin correlates with cell differentiation. *Exp Cell Res*. 1995; 217(2):267-71.

Lu Q, Inouye M. Adenylate kinase complements nucleoside diphosphate kinase deficiency in nucleotide metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(12):5720-5.

Lu Q, Park H, Egger LA, Inouye M. Nucleoside-diphosphate kinase mediated signal transduction via histidyl–aspartyl phosphorelay systems in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. 1996; 271, 32886–32893.

MacDonald NJ, De la Rosa A, Benedict MA, Freije JM, Krutsch H, Steeg PS. A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J. Biol. Chem*. 1993; 268, 25780–25789.

Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, Falcone FH, Gavrilescu C, Montgomery JL, Santori MI, Stern LS, Wang Z, Ullu E, Tschudi C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA*. 2000; 6(2):163-9.

Marciano D, Llorente C, Maugeri DA, de la Fuente C, Oppendoes F, Cazzulo JJ, Nowicki C. Biochemical characterization of stage-specific isoforms of aspartate aminotransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2008; 161(1):12-20.

Martínez-Calvillo S, López I, Hernández R. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. Gene. 1997; 199(1-2):71-6.

Maugeri DA, Cazzulo JJ . The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 2004; 234(1):117-23

Maya, J.D, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule,C Morello A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathion and trypanothion content in epimastigotes, trypomastigote and amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol.Biochem. Parasitol.; 1997, 86:101-106.

Melki R, Lascu I, Carlier MF, Véron M. Nucleoside diphosphate kinase does not directly interact with tubulin nor microtubules. Biochem Biophys Res Commun. 1992; 187(1):65-72.

Montalvetti A, Rohloff P, Docampo R. A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 2004; 279(37):38673-82.

Morrison JF. In: Boyer PD (ed.), The Enzymes. Academic Press, New York. 1973, Vol. 8 p: 457-486.

Müller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. Trends Parasitol. 2003; 19(7):320-8.

Munier A, Serres C, Kann ML, Boissan M, Lesaffre C, Capeau J, Fouquet JP, Lacombe ML. Nm23/NDP kinases in human male germ cells: role in spermiogenesis and sperm motility? Exp Cell Res. 2003; 289(2):295-306.

Nett IR, Martin DM, Miranda-Saavedra D, Lamont D, Barber JD, Mehlert A, Ferguson MA. The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. *Mol Cell Proteomics*. 2009, en prensa.

Neuberguer G; Maurer-Stroh; Eisenhaber B; Hartig A; Eisenhaber F. Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon specific differences. *J Mol Biol*. 2003; 328: 567-579.

Noguchi M, Sawada T, Akazawa T. ATP-regenerating system in the cilia of *Paramecium caudatum*. *J Exp Biol*. 2001; 204(Pt 6):1063-71.

Oberholzer M, Bregy P, Marti G, Minca M, Peier M, Seebeck T. Trypanosomes and mammalian sperm: one of a kind? *Trends Parasitol*. 2007; 23(2):71-7.

Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards SW, Weijers PJ, Misset O. Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*. 1984; 98(4):1178-84.

Opperdoes FR, Borst P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett*. 1977; 80(2):360-4.

Oza SL, Tetaud E, Ariyanayagam MR, Warnon SS, Fairlamb AH. A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2002; 277(39):35853-61.

Packchanian A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurantoin compounds. *Antibiot Chemoter*. 1957; 7:13-23.

Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 1996; 12, 357–358.

Parks REJ, Agarwal RP. Nucleoside diphosphokinases. *Enzymes* 1973; 8, 307–334.

Parsons M; Furuya T; Pal S; Kessler P. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biol Parasitol.* 2001; 115:19-28.

Patel-King RS, Benashski SE, King SM. A bipartite Ca^{2+} -regulated nucleoside-diphosphate kinase system within the *Chlamydomonas* flagellum. The regulatory subunit p72. *J Biol Chem.* 2002; 277(37):34271-9.

Patel-King RS, Gorbatyuk O, Takebe S, King SM. Flagellar radial spokes contain a Ca^{2+} -stimulated nucleoside diphosphate kinase. *Mol Biol Cell.* 2004; 15(8):3891-902.

Paulin JJ. The chondriome of selected trypanosomatids. A three-dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy. *J Cell Biol.* 1975; 66(2):404-13.

Paveto C, Güida MC, Esteva MI, Martino V, Coussio J, Flawiá MM, Torres HN. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(1):69-74.

Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Bouvier LA, Torres HN, Flawiá MM. Screening of substrate analogs as potential enzyme inhibitors for the arginine kinase of *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol.* 2003; 50(2):132-4.

Pereira CA, Alonso GD, Torres HN, Flawiá MM. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol.* 2002; 49(1):82-5.

Pereira CA, Carrillo C, Miranda MR, Bouvier LA, Cánepa GE. *Trypanosoma cruzi*: transport of essential metabolites acquired from the host. *Medicina (B Aires).* 2008; 68(5):398-404.

Pereira, C.A., Alonso, G.D., Ivaldi, S., Silber, A.M., Alves, M.J., Torres, H.N., Flawia, M.M., 2003. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. FEBS Letters 554, 201–205.

Pereira, C.A., Alonso, G.D., Paveto, C., Iribarren, A., Cabanas, M.L., Torres, H.N., Flawiá, M.M. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. The Journal of Biological Chemistry. 2000; 275, 1495–1501.

Pereira, C.A., Alonso, G.D., Paveto, M.C., Flawiá, M.M., Torres, H.N., 1999. L-Arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. The Journal of Eukaryotic Microbiology 46, 566–570.

Piacenza L, Irigoín F, Alvarez MN, Peluffo G, Taylor MC, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression.. Biochem J. 2007 Apr 15; 403(2):323-34.

Piacenza L, Peluffo G, Radi R. L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(13):7301-6.

Postel EH, Berberich SJ, Flint SJ, Ferrone CA. Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. Science. 1993; 261, 478–480.

Postel EH, Berberich SJ, Rooney JW, Kaetzel DM. Human NM23/nucleoside diphosphate kinase regulates gene expression through DNA binding to nuclease-hypersensitive transcriptional elements. J. Bioenerg. Biomembr. 2000; 32, 277–284.

Postel EH. Cleavage of DNA by human NM23-H2/nucleoside diphosphate kinase involves formation of a covalent protein–DNA complex. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 22821–22829.

Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomembr.* 2003; 35(1):31-40.

Pullen TJ, Ginger ML, Gaskell SJ, Gull K. Protein targeting of an unusual, evolutionarily conserved adenylate kinase to a eukaryotic flagellum. *Mol Biol Cell.* 2004; 15(7):3257-65.

Ralston KS, Hill KL. The flagellum of *Trypanosoma brucei*: new tricks from an old dog. *Int J Parasitol.* 2008; 38(8-9):869-84.

Randazzo PA, Northup JK, Kahn RA. Regulatory GTP-binding proteins (ADP-ribosylation factor, Gt, and RAS) are not activated directly by nucleoside diphosphate kinase. *J. Biol. Chem.* 1992; 267, 18182–18189.

Ren H, Wang L, Bennett M, Liang Y, Zheng X, Lu F, Li L, Nan J, Luo M, Eriksson S, Zhang C, Su XD. The crystal structure of human adenylate kinase 6: An adenylate kinase localized to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(2):303-8.

Roberts J, Aubert S, Gout E, Bligny R, Douce R. Cooperation and Competition between Adenylate Kinase, Nucleoside Diphosphokinase, Electron Transport, and ATP Synthase in Plant Mitochondria Studied by ³¹P-Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiol.* 1997; 113(1):191-199.

Rohloff P, Docampo R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 2008; 118(1):17-24.

Rohloff P, Montalvetti A, Docampo R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 2004; 279(50):52270-81.

Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, Biggs JR, Barker E, Margulies IM, King CR, Liotta LA, Steeg PS. Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. Nature. 1989; 342, 177–180.

Saborio JL, Manuel Hernandez J, Narayanswami S, Wrightsman R, Palmer E, Manning J. Isolation and characterization of paraflagellar proteins from *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 1989; 264(7):4071-5.

Saini AK, Maithal K, Chand P, Chowdhury S, Vhra R, Goyal A, Dubey GP, Chopra P, Chandra R, Tyagi AK, Singh Y, Tandon V. Nuclear localization and in situ DNA damage by *Mycobacterium tuberculosis* nucleoside-diphosphate kinase. Journal of Biological Chemistry 2004; 29, 50142–50149.

Sant'Anna C, Parussini F, Lourenço D, de Souza W, Cazzulo JJ, Cunha-e-Silva NL. All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles. Histochem Cell Biol. 2008; 130(6):1187-98.

Sant'Anna C, Pereira MG, Lemgruber L, de Souza W, Cunha e Silva NL. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. Microsc Res Tech. 2008; 71(8):599-605.

Sarkar M, Hamilton CJ, Fairlamb AH. Properties of phosphoenolpyruvate mutase, the first enzyme in the aminoethylphosphonate biosynthetic pathway in *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 2003; 278(25):22703-8.

Sauer U, Schlattner U. Inverse metabolic engineering with phosphagen kinase systems improves the cellular energy state. Metab Eng. 2004; 6(3):220-8.

Schlattner U, Forstner M, Eder M, Stachowiak O, Fritz-Wolf K, Wallimann T. Functional aspects of the X-ray structure of mitochondrial creatine kinase: a molecular physiology approach. *Mol Cell Biochem.* 1998; 184(1-2):125-40.

Schmidt A; Krauth-Siegel L. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for anti trypanosomal drug development. *Curr Top Med Chem.* 2002; 2: 1239-1259.

Schoijet AC, Miranda K, Girard-Dias W, de Souza W, Flawiá MM, Torres HN, Docampo R, Alonso GD. A *Trypanosoma cruzi* phosphatidylinositol 3-kinase (TcVps34) is involved in osmoregulation and receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem.* 2008; 283(46):31541-50.

Shapiro TA; Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 117-143.

Simpson AG, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 2006; 22(4):168-74.

Simpson L, Sbicego S, Aphasizhev R. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: A complex business. *RNA.* 2003; 9: 265-276.

Soares MJ, De Souza W. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1988; 20(2):349-61

Soares MJ, de Souza W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 1991; 77(6):461-8.

Sona S, Suzuki T, Ellington WR. Cloning and expression of mitochondrial and protoflagellar creatine kinases from a marine sponge: implications for the origin of

intracellular energy transport systems. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 May 14; 317(4):1207-14.

Suzuki T, Kawasaki Y, Furukohri T, Ellington WR. Evolution of phosphagen kinase. VI. Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of lombricine kinase from the earthworm *Eisenia foetida*, and identification of a possible candidate for the guanidine substrate recognition site. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1343(2):152-9.

Taylor MC, Kelly JM. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol*. 2006; 6:32.

Temesvari LA, Rodriguez-Paris JM, Bush JM, Zhang L, Cardelli JA. Involvement of the vacuolar proton-translocating ATPase in multiple steps of the endo-lysosomal system and in the contractile vacuole system of *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci*. 1996; 109 (Pt 6):1479-95.

Tielens AG, Van Hellemond JJ. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. *Parasitol Today*. 1998; 14(7):265-72.

Turrens, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspects of Medicine*; 2004, 25: 211–220.

Tyler KM; Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int Journal for Parasitol*. 2001; 31: 472-481.

Ulloa, R.M., Muschietti, J.P., Veron, M., Torres, H.N., Tellez-Iñón, M.T. Purification and characterization of a soluble nucleoside diphosphate kinase in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1995; 70, 119–129.

Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 2003; 19(11):495-501.

Urbina JA. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des.* 2002; 8(4):287-95.

Urbina JA. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology.* 1997; 114 (suppl): S91-99.

van Hellemond JJ, Tielens AG. Adaptations in the lipid metabolism of the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 2006; 580(23):5552-8.

Vanhame L; Pays E. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev.* 1995; 59: 223-240.

Vazquez MP, Levin MJ. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene.* 1999; 239(2):217-25.

Vazquez MP. The genetics and genomics of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science. Global Science books journals.* 2007, 1(1): 1-11

Vieira M, Rohloff P, Luo S, Cunha-e-Silva NL, de Souza W, Docampo R. Role for a P-type H⁺-ATPase in the acidification of the endocytic pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 2005; 392(Pt 3):467-74.

Wagner PD, Steeg PS, Vu ND. Two-component kinase-like activity of nm23 correlates with its motility-suppressing activity. in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997; 94, 9000–9005.

Wagner PD, Vu ND. Phosphorylation of geranyl and farnesyl pyrophosphates by Nm23 proteins/nucleoside diphosphate kinases. J. Biol. Chem. 275. 2000, 35570–35576.

Watts DC, Bannister LH. Location of arginine kinase in the cilia of *Tetrahymena pyriformis*. Nature. 1970; 226(5244):450-1.

Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio IL, Kelly JM. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(21):13453-8.

Wilkinson SR; Meyer DJ; Taylor MC; Bromley EV; Miles MA; Kelly SM. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. J Biol Chem. 2002; 277: 17062-17071.

Wilkinson SR; Taylor MC; Touithas S; Mauricio IL; Meyer DJ; Kelly JM. TcGPXII, a glutathione/dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase restricted to fatty acids and phospholipids hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. Biochem J. 2002; 364:787-794.

Wilkinson SR; Temperton NJ; Mondragon A; Kelly JM. Distinct Mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 2000; 275: 8220-8225.

Yoon JH, Singh P, Lee DH, Qiu J, Cai S, O'Connor TR, Chen Y, Shen B, Pfeifer GP. Characterization of the 3' --> 5' exonuclease activity found in human nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK1) and several of its homologues. Biochemistry. 2005; 44(48):15774-86.

Yoshida Y, Hasunuma K. Light-dependent subcellular localization of nucleoside diphosphate kinase-1 in *Neurospora crassa*. FEMS Microbiol Lett. 2006; 261(1):64-8.

Zeledon R. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture.II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. J Parasitol 1960; 46: 541-51.

Zhang SQ, Hu Y, Jong AY. Temporal and spatial distributions of yeast nucleoside diphosphate kinase activities and its association with the Cdc8p.Cell Mol Biol Res. 1995; 41(5):333-46.

8. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Research brief

Trypanosoma cruzi: Oxidative stress induces arginine kinase expression

Mariana R. Miranda, Gaspar E. Canepa, Leon A. Bouvier, Claudio A. Pereira *

Laboratorio de Biología Molecular de *Trypanosoma cruzi* (LBMTc), Departamento de Sustancias Vasoactivas, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Received 11 January 2006; received in revised form 7 April 2006; accepted 8 April 2006
Available online 24 May 2006

Abstract

Trypanosoma cruzi arginine kinase is a key enzyme in cell energy management and is also involved in pH and nutritional stress response mechanisms. *T. cruzi* epimastigotes treated with hydrogen peroxide presented a time-dependent increase in arginine kinase expression, up to 10-fold, when compared with untreated parasites. Among other oxidative stress-generating compounds tested, only nifurtimox produced more than 2-fold increase in arginine kinase expression. Moreover, parasites overexpressing arginine kinase showed significantly increased survival capability during hydrogen peroxide exposure. These findings suggest the participation of arginine kinase in oxidative stress response systems.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Index Descriptors and Abbreviations: Trypanosomatidae; *Trypanosoma cruzi*; Arginine kinase; Phosphotransferases; Oxidative stress; Hydrogen peroxide; Chagas' disease; AK, arginine kinase; GFP, green fluorescent protein; ROS, reactive oxygen species

1. Introduction

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* has a complex life cycle that comprises the passage through insect vectors and vertebrate hosts including humans. During its life cycle *T. cruzi* is exposed to different reactive oxygen species (ROS) generated by the parasite aerobic metabolism, the host immune response and occasionally those released by drugs used in the treatment of Chagas' disease (Turens, 2004). ROS can lead to membrane disruption, inactivation of essential enzymes, mutagenesis, and damage to DNA repair machinery. *T. cruzi* possess different ROS detoxifying mechanisms to maintain redox homeostasis, most of them based on the trypanothione pathway (Fairlamb et al., 1985). The success of the infection within an oxidant environment largely depends on the ability of parasites to survive using these detoxifying

mechanisms. Arginine kinase (E.C. 2.7.3.3) is a phosphotransferase which catalyzes the interconversion between phosphoarginine and ATP. This enzyme is present in some invertebrates and is an analogous system to vertebrate creatine kinase. Phosphoarginine acts as an energy reservoir because its high-energy phosphate can be rapidly transferred to ADP when the renewal of ATP is required (Ellington, 2001). It is important to note that arginine kinase is absent from *T. cruzi* mammalian hosts, providing a potential drug target for Chagas' disease (Pereira et al., 1999, 2000). We have previously demonstrated that arginine kinase overexpression increases *T. cruzi* survival capability under pH and nutritional stress conditions (Pereira et al., 2003). Furthermore, when a heterologous arginine kinase is expressed in organisms lacking any kind of phosphagen kinase, such as yeast and bacteria, they also become more tolerant to pH and nutritional stress conditions probably due to the ATP buffer effect of phosphoarginine (Canonaco et al., 2002, 2003).

* Corresponding author. Fax: +5411 4514 8708.

E-mail address: cpereira@mail.retina.ar (C.A. Pereira).

In this work we investigated the relationship between the expression levels of *T. cruzi* arginine kinase and the parasite resistance to reactive oxygen species.

2. Materials and methods

2.1. Parasite cultures and treatments

Epimastigotes of the CL Brener strain, were cultured at 28 °C in 25 cm² plastic flasks, containing 5 ml LIT medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/l streptomycin (complete LIT medium) (Camargo, 1964). Parasites obtained from the same culture batch were treated with the different compounds for the indicated times and concentrations. All the treatments were performed using a single compound. The toxicity of nifurtimox and benznidazole was also verified in CL Brener epimastigotes. Cells were counted using a hemocytometric chamber, harvested by centrifugation at 1500g for 10 min and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄). Cell pellets were then resuspended in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.3, containing 10 µM of the protease inhibitor trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guandino)butane (E64), and lysed by 5 cycles of freezing and thawing. *T. cruzi* parasites overexpressing arginine kinase were previously obtained by transfection of epimastigotes with a pTREX plasmid containing the *T. cruzi* arginine kinase gene (Pereira et al., 2003). Transfected parasites were maintained in complete LIT medium supplemented with 500 µg/ml G418 (Gibco BRL).

2.2. Western blot analysis

Arginine kinase antiserum was obtained from BALB/c mice immunized with recombinant arginine kinase. Soluble extract samples from *T. cruzi* epimastigotes were resolved by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were electrotransferred from polyacrylamide gels to Hybond-C membranes (Amersham Biosciences). For reaction with the antibody, transferred membranes were blocked with 10% (w/v) non-fat milk suspension for 60 min. After incubation for 4 h with a 1:4000 dilution of the mouse anti-arginine kinase antiserum, detection was carried out by incubating with a 1:5000 dilution of anti-mouse Ig conjugated with horseradish peroxidase (Vector Laboratories). The latter was developed with the ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagent (Amersham Biosciences). Band quantitation was performed using the ImageJ program (National Institute of Health, USA) and the values were normalized among the different samples comparing them with total protein profiles obtained by Coomassie Brilliant Blue gel staining.

2.3. Thiol measurements

Total and low molecular weight thiols were quantitated using the DTNB assay (Ellman, 1959).

3. Results and discussion

3.1. Arginine kinase expression levels under different oxidative stress conditions

To study if arginine kinase participates in oxidative stress responses, different assays using hydrogen peroxide treatment were performed. First, the concentration of hydrogen peroxide that inhibits 50% of parasite growth (IC₅₀) was calculated using concentrations between 0 and 500 µM. Parasite survival was evaluated 96 h after treatment. The obtained IC₅₀ was about 190 µM, similar values were previously reported by other authors (Finzi et al., 2004). A total of 10⁷ epimastigotes were treated for different times with a H₂O₂ concentration close to the IC₅₀ (200 µM) and later assayed for arginine kinase expression by Western blot. Arginine kinase expression levels were estimated by band densitometry and compared with samples of untreated parasites from the same culture batch (control parasites). Interestingly, a continuous increase in arginine kinase expression levels was measured between 0 and 60 min after H₂O₂ exposure (Fig. 1A). When the expression of arginine kinase was analyzed for longer periods of time, it was observed that arginine kinase levels reached maximum values at 180 min (about 10-fold) and later diminished at 240 min (Fig. 1B). No differences were observed in parasites without treatment. These results suggest that arginine kinase is one of the constituents of the parasite hydroperoxide detoxification cascade.

Other stress-inducing compounds were also tested at different concentrations: sodium nitroprusside (0–1000 µM), a nitric oxide donor; methylene blue (0–500 µM), a phenothiazine drug which mimics oxidative stress; nifurtimox (0–50 µM) and benznidazole (0–50 µM) a nitrofur and a nitroimidazole, respectively, used in Chagas' disease therapy. Parasites exposed to hydrogen peroxide were used as positive control. Although most of these compounds generate (or mimic) oxidative conditions, only nifurtimox induced arginine kinase expression. This induction showed a dose-dependent pattern up to 2.3-fold when compared to controls without treatment, at 10 µM nifurtimox and decrease at higher concentrations (Figs. 1C and D).

3.2. Arginine kinase overexpressing parasites capability to endure oxidative stress

To study if augmented levels of arginine kinase improve the parasite survival under hydrogen peroxide treatment, *T. cruzi* epimastigotes overexpressing the arginine kinase gene (AK) were subjected to increasing concentrations of H₂O₂ (0–1000 µM) for 2 h and counted 72 h and 96 h after treatments. Green fluorescent protein (GFP) expressing parasites were used as controls. The obtained H₂O₂ toxicity thresholds vary between independent assays in the ranges of 0.1–0.3 mM H₂O₂ and 0.25–0.45 mM H₂O₂ for GFP and AK overexpressing parasites, respectively. However, AK overexpressing parasites always present a resistant

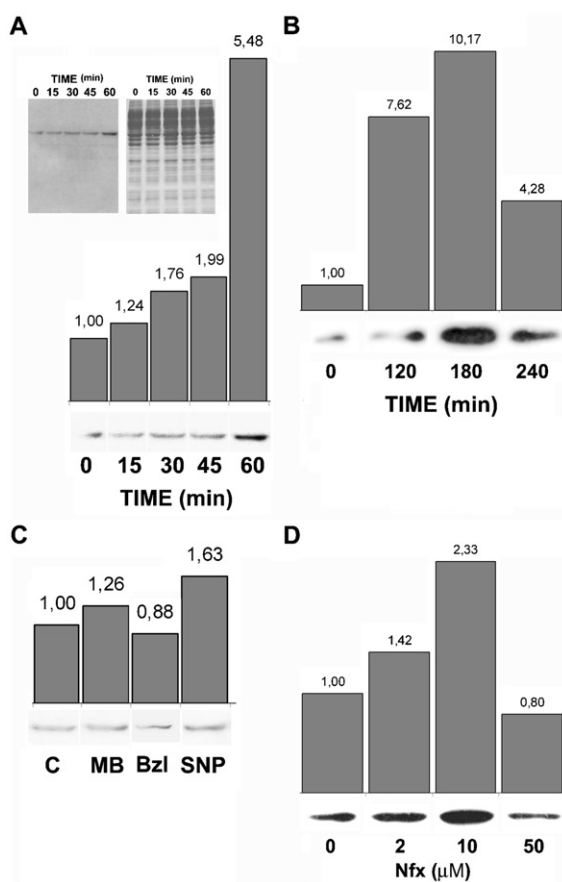


Fig. 1. Arginine kinase expression analysis. Western blot analyses were performed using a mouse polyclonal anti-*T. cruzi* arginine kinase antibody. Arginine kinase bands were quantified using the Image J software (National Institute of Health, USA) and normalized using total protein profile obtained by Coomassie brilliant blue gel staining (A, right inset). A figure of the complete AK Western blot was also included (A, left inset). Bars represent arginine kinase band intensities respect to the control without treatment. Samples were obtained from 10^7 parasites treated with: (A) 200 μ M hydrogen peroxide for 0, 15, 30, 45, and 60 min; (B) 200 μ M hydrogen peroxide for 0, 120, 180, and 240 min; (C) C, control without treatment; MB, 100 μ M methylene blue; Bzl, 10 μ M Benznidazole, and SNP, 200 μ M sodium nitroprusside; and (D) Nfx, Nifurtimox 0, 2, 10, and 50 μ M for 2 h. In the experiments included in (C) and (D) parasites were treated only with the indicated compound.

phenotype. Fig. 2 illustrates a representative experiment in which GFP expressing parasites treated with 0.3 mM hydrogen peroxide showed a strong decrease in cell density, of about 71.4% when compared with parasites without treatment. AK overexpressing parasite density was not significantly affected by 0.3 mM hydrogen peroxide. When parasites were treated with 0.5 mM hydrogen peroxide or higher concentrations, cell survival was lower than 10% in both cases (Fig. 2).

Trypanothione is a thiol molecule only found in trypanosomatids, which acts as an antioxidant and is synthesized by ATP-dependent reactions (Turrens, 2004). Under oxidative stress conditions, increased levels of arginine kinase could account for the rapid ATP renewal from ADP and phosphoarginine, and consequently preserving the reducing power for trypanothione recycling, while the resulting ATP

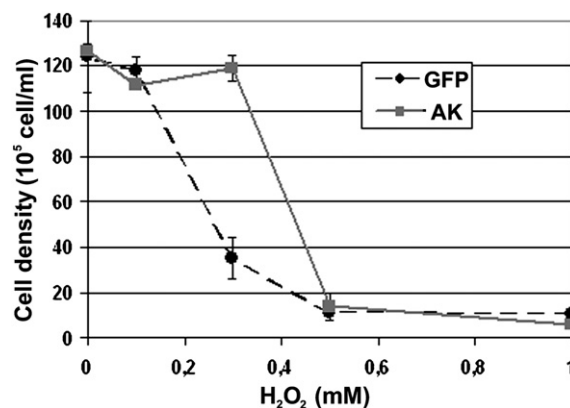


Fig. 2. Parasites growth kinetic under hydrogen peroxide treatments. About 7.10^5 parasites transfected with a plasmid containing the green fluorescent protein gene (●- GFP) or the *T. cruzi* arginine kinase gene (■- AK) were treated with different concentrations of hydrogen peroxide from 0 to 1000 μ M and counted 96 h after treatment.

might also be used in trypanothione synthesis. To test this hypothesis, total and low molecular weight thiols were quantitated in arginine kinase and GFP overexpressing parasites. The thiol levels obtained showed no significant differences between the parasite groups (data not shown). This suggests that the observed effect of arginine kinase on parasites survival might involve other uncharacterized stress-response mechanisms.

The report of stress-induced arginine kinase expression in *T. cruzi* opens a path to study the linkage between energy metabolism and stress response mechanisms. These findings might also help to elucidate the nature and extent of parasitic adaptations to hostile environments.

Acknowledgments

We are deeply grateful to Dr. Esteban Serra, Dr. Cristina Paveto, Dr. Catalina Güida, and Prof. Leandro Gado for helpful advice and technical assistance. This study was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 5492), University of Buenos Aires (UBACyT X073), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (IM40-65 and FONCYT-PICT REDES 2003-00300), and Fundación A. Roemmers (Argentina). C.A.P. is member of the career of scientific investigator of CONICET (Argentina), M.R.M. is a research fellow from Fundación YPF, G.E.C. is a research fellow from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, and L.A.B. is a research fellow from CONICET.

References

- Camargo, E.P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 12, 93–100.
- Canonaco, F., Schlattner, U., Pruetz, P.S., Wallimann, T., Sauer, U., 2002. Functional expression of phosphagen kinase systems confers resistance to transient stresses in *Saccharomyces cerevisiae* by

- buffering the ATP pool. The Journal of Biological Chemistry 277, 31303–31309.
- Canonaco, F., Schlattner, U., Wallimann, T., Sauer, U., 2003. Functional expression of arginine kinase improves recovery from pH stress of *Escherichia coli*. Biotechnology Letters 25, 1013–1017.
- Ellington, W.R., 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. Annual Review of Physiology 63, 289–325.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics 82, 70–77.
- Fairlamb, A.H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B.T., Cerami, A., 1985. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. Science 227, 1485–1487.
- Finzi, J.K., Chiavegatto, C.W., Corat, K.F., Lopez, J.A., Cabrera, O.G., Mielniczki-Pereira, A.A., Colli, W., Alves, M.J., Gadelha, F.R., 2004. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. Molecular and Biochemical Parasitology 133, 37–43.
- Pereira, C.A., Alonso, G.D., Ivaldi, S., Silber, A.M., Alves, M.J., Torres, H.N., Flawia, M.M., 2003. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. FEBS Letters 554, 201–205.
- Pereira, C.A., Alonso, G.D., Paveto, C., Iribarren, A., Cabanas, M.L., Torres, H.N., Flawia, M.M., 2000. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. The Journal of Biological Chemistry 275, 1495–1501.
- Pereira, C.A., Alonso, G.D., Paveto, M.C., Flawia, M.M., Torres, H.N., 1999. L-Arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. The Journal of Eukaryotic Microbiology 46, 566–570.
- Turrens, J.F., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Molecular Aspects of Medicine 25, 211–220.



Research brief

Trypanosoma cruzi: Multiple nucleoside diphosphate kinase isoforms in a single cell

Mariana R. Miranda, Gaspar E. Canepa, León A. Bouvier, Claudio A. Pereira *

Laboratorio de Biología Molecular de *Trypanosoma cruzi* (LBMTc), Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires and CONICET, Av. Combatientes de Malvinas 3150, 1427 Capital Federal, Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2008

Received in revised form 28 March 2008

Accepted 25 April 2008

Available online 1 May 2008

Index Descriptors and Abbreviations:

Trypanosomatidae

Trypanosoma cruzi

Chagas disease

Nucleoside diphosphate kinase

DM10 motif

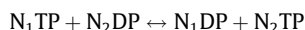
ABSTRACT

Nucleoside diphosphate kinases (NDPKs) are multifunctional enzymes involved mainly in the conservation of nucleotides and deoxynucleotides at intracellular levels. Here we report the characterization of two NDPKs from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. TcNDPK1 and TcNDPK2 were biochemically characterized presenting different kinetic parameters and regulation mechanisms. NDPK activity was mainly detected in soluble fractions according to the digitonin extraction technique; however 20% of the activity remains insoluble at digitonin concentrations up to 5 mg ml⁻¹. TcNDPK1 is a short enzyme isoform, whereas TcNDPK2 is a long one containing a DM10 motif. In addition, two other putative NDPK genes (TcNDPK3 and TcNDPK4) were detected by data mining at the *T. cruzi* genome database. The large number and diversity of NDPK isoforms are in agreement with those previously observed for other *T. cruzi* phosphotransferases, such as adenylate kinases.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Nucleoside diphosphate kinases (NDPK, EC 2.7.4.6) are ubiquitous and conserved enzymes essential for cellular homeostasis. They play a key role in the maintenance of intracellular ratios of NTPs and dNTPs catalyzing the reversible phosphorylation of nucleoside diphosphates to nucleoside triphosphates (Parks and Agarwal, 1973) as follows:



Although the high-energy phosphate is mainly supplied by ATP these enzymes have broad substrate specificity and use the ribose and deoxyribose forms of both, purine and pyrimidine nucleotides. It was postulated a “ping-pong” mechanism with a phosphoenzyme (phosphohistidine) intermediary involved in the transfer reaction (Lascu and Gonin, 2000).

The crystal structures and biochemical studies have shown that prokaryotic enzymes have a tetrameric structure, whereas the eukaryotic ones are hexamers. Each NDPK monomer have a molecular mass of 15–18 kDa and are conserved during evolution, presenting about 43% identity between *Escherichia coli* and humans enzymes (Lascu and Gonin, 2000).

Far more than house-keeping enzymes, a lot of accumulated evidence involves NDPKs in many biological processes other than the biosynthetic one. NDPKs appear to be associated in signal transduction by providing GTP to G proteins activation (Bominaur et al., 1993; Randazzo et al., 1992). Regarding to the high-energy

phosphohistidine formation it was also postulated a cell signaling role because the phosphate can be transferred to different acceptors such as other histidine residue as part of a phosphorylation cascade (Lu et al., 1996) or to serine/threonine or aspartate residues in other proteins (MacDonald et al., 1993; Wagner et al., 1997; Wagner and Vu, 2000). In this sense some functions in cell development, proliferation, differentiation, tumor metastasis, apoptosis and motility were attributed (MacDonald et al., 1993; Biggs et al., 1990; Kantor et al., 1993; Rosengard et al., 1989; Lombardi et al., 2000; Lacombe et al., 2000). It was also suggested that NDPK activity could be involved in bacterial two-component signal transduction systems (Stock et al., 2000). During the last years, some roles in DNA processing have also been assigned. In humans NM23-H2/NDPK B appears to be a transcription factor because of its sequence-specific DNA binding activity. Also the recognition, cleavage and structural alterations of the DNA targets suggest a possible participation in DNA repair (Postel et al., 1993, 2000; Postel, 1999). In addition, *E. coli* NDPK is capable of bind and cleave DNA molecules (Levit et al., 2002).

An interesting model to study the role of NDPKs is constituted by protozoan parasites, including *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. In contrast to mammals, these organisms are not able to synthesize purines de novo and therefore rely upon the salvage pathway in which free purines are converted subsequently to nucleotides involving NDPK activities (Hammond and Gutteridge, 1984; Marr, 1991). These parasites constitute a serious health problem that affect millions of Americas, so this metabolic pathway could be a possible target for future drug development. In *T. cruzi*, a soluble NDPK activity was previously purified and biochemically characterized (Ulloa et al., 1995). Interestingly, in

* Corresponding author. Fax: +54 11 4514 8708.

E-mail address: cpereira@mail.retina.ar (C.A. Pereira).

Trypanosoma brucei a nuclear isoform of NDPK has been identified (Hunger-Glaser et al., 2000). The presence of NDPK isoforms within different cellular compartments may be critical for their biological functions and also for their specific role in the phosphotransfer network involved in the cellular energy transport and homeostasis. In this work we report the molecular and biochemical characterization of different NDPK isoforms from *T. cruzi*.

2. Materials and methods

2.1. Parasite cultures and cell extracts

Epimastigotes of the CL Brener strain, were cultured at 28 °C in 25 cm² plastic flasks, containing 5 ml of LIT medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 mg/l streptomycin (Camargo, 1964). Cells were counted using a hemocytometric chamber, harvested by centrifugation at 1500g for 10 min and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). Cell pellets were then resuspended in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.3, containing 10 μM of the protease inhibitor trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane (E64), and lysed by five cycles of freezing and thawing.

2.2. Bioinformatics, cloning and expression of NDPKs

Sequences from the “Tritryps” genome projects (*T. cruzi*, *T. brucei* and *Leishmania major*) were obtained at GeneDB (<http://www.genedb.org/>) and TcruzidB (<http://tcruzidb.org/>). Assembly and analysis of the DNA sequence data, including prediction of open reading frames, were carried out using the software package Vector NTI v. 10 (Invitrogen Corporation) and the online version of BLAST at the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Fragments carrying the entire *T. cruzi* TcNDPK1 and TcNDPK2 sequences (GeneDB systematic IDs Tc00.1047053508707.200 and Tc00.1047053508461.400) were obtained by PCR amplification (NDPK1: forward primer GGATCCATGACCAGTGAGCGTACCTT, reverse primer GGTACCTCAACGCTGTCAGAGCCATGGCAGCTTTC;

NDPK 2: forward primer GGATCCATGACAACACTACTTCTCGTTA, reverse primer GGTACCTTGATTACTTTTCTCAATC) and ligated to the pRSET A expression vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). Overexpression of the recombinant NDPKs were performed in *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, Carlsbad, CA). Recombinant proteins were purified by affinity chromatography using a Ni²⁺-agarose resin (Qiagen, MD, USA).

2.3. Digitonin extractions

The extraction protocol was performed as previously described (Bouvier et al., 2006). Briefly, 5.2 × 10⁹ epimastigote cells from a 200-ml culture were washed twice and resuspended in 4 ml of 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, containing 0.25 M sucrose and 10 μM E64. Aliquots of 950 μl containing 6.5 × 10⁸ parasites were mixed with 50 μl of the same buffer containing increasing amounts of digitonin (0–5 mg ml^{−1}). After 2.5 min of incubation at room temperature, tubes were centrifuged at 16,100g for 2 min. Supernatants were kept frozen for enzyme assays. Pellets were resuspended in the same buffer, lysed by five cycles of freezing and thawing and kept frozen for further assays.

2.4. Enzyme assays

Nucleoside diphosphate kinase activity was measured determining the rate of ADP formation as previously described (Ulloa et al., 1995). Briefly, a 25 μg of recombinant protein fraction was added to the reaction mixture (100 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, 3 mM phosphoenolpyruvate, 10 mM MgCl₂, 0.3 mM NADH, 25 mM KCl, 1.25 U/ml pyruvate kinase and 2.2 U/ml lactate dehydrogenase) in a cuvette to give a final volume of 0.5 ml. After 5 min at 35 °C the reaction was started by the addition of a small volume of ATP and dTDP to final concentrations of 2 mM and 0.4 mM, respectively. The activity was calculated measuring the decrease in absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADH. When purified recombinant NDPKs were assayed for enzyme activity or SDS–PAGE, the same purification protocol

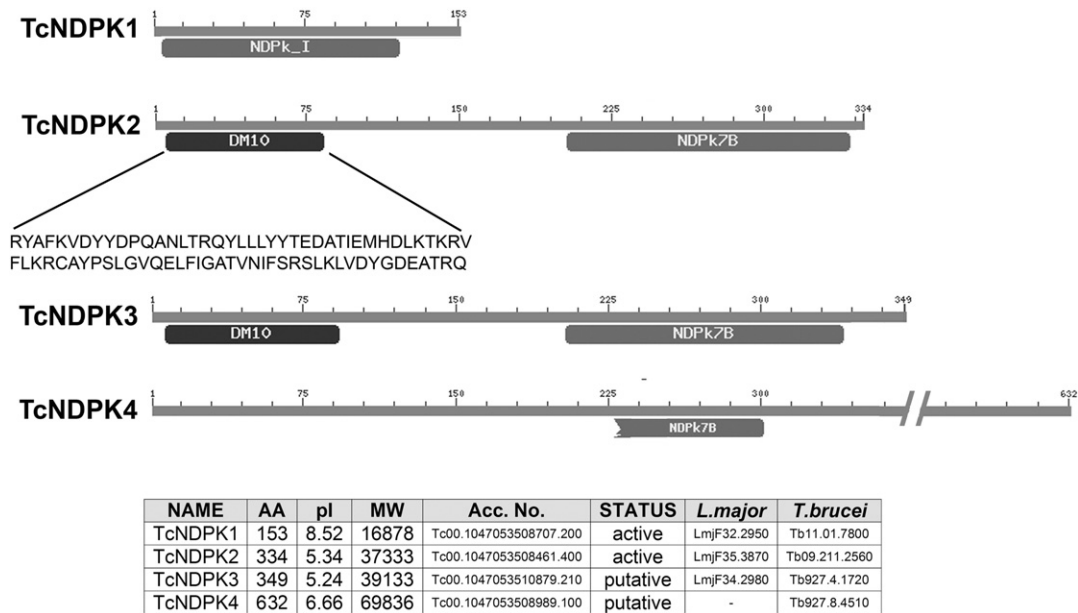


Fig. 1. Summary of features and predicted properties from each TcNDPK. Schematic representation of the four *T. cruzi* NDPK isoforms. Boxes indicate conserved domains predicted using the “CD-Search Service” at the NCBI: NDPK_I (cd04413), NDPK7B (cd04412) and DM10 (smart00676) (top). The table shows main features of each predicted *T. cruzi* NDPK: gene name, amino acid length, isoelectric point, molecular weight, GeneDB systematic IDs, status (biochemically active or putative), GeneDB systematic IDs of the sequence orthologs from *L. major* and *T. brucei* (bottom).

was applied to induced wild-type *E. coli* extracts and used as controls.

Pyruvate kinase and hexokinase activities were determined using a lactic dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase coupled assay, respectively (Cazzulo et al., 1989; Caceres et al., 2003). NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase activity was determined as previously described (Denicola et al., 2002).

All assays were performed at least in triplicates and data are representative of at least three independent experiments.

2.5. Western blot analysis

Nucleoside diphosphate kinase antisera were obtained from BALB/c mice immunized with recombinants TcNDPK1 or TcNDPK2. Extract samples from *T. cruzi* epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes were resolved by SDS–PAGE. Proteins were electrotransferred from polyacrylamide gels to PVDF membranes (Pierce). For reaction with the antibody, transferred membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat milk suspension for 60 min. TcNDPK1 and TcNDPK2 antibodies were added and incubated for 12 h at a dilution of 1:1000, 1:2500, respectively. Antiserum detection was carried out by incubating with a 1:5000 dilution of anti-mouse Ig conjugated with horseradish peroxidase (Vector Laboratories). The latter was developed with Supersignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

3. Results and discussion

3.1. Nucleoside diphosphate kinases in Trypanosomatids

Using the recently released data from the “Tritryps” genome projects a database screening was performed at the GeneDB (<http://www.genedb.org>) followed by a bioinformatic sequence analysis. Four putative NDPK genes were found in the *T. cruzi* genome (TcNDPK1–4) coding for predicted polypeptides between 153 and 602 aa long. All the sequence orthologs were also found in *T. brucei*, however *L. major* lack the gene corresponding to the putative NDPK4. A summary of NDPK sequences is shown in Fig. 1. Amino acid identities between the different *T. cruzi* predicted polypeptides were in the range of 6–28% and similarities between 18 and 48%, being TcNDPK4 the most divergent sequence of the group. TcNDPK1 is the shorter enzyme isoform with the highest isoelectric point (8.5), all the others are acidic polypeptides and present an N-terminal extension (≈200 aa), additionally TcNDPK4 shows a C-terminal extension (≈350 aa). Interestingly, TcNDPK2 presents a conserved DM10 motif (≈88 aa) at the N-terminal domain. The presence of a single DM10 at the N-terminus was found only in a subfamily of NDPK, but the function of such motif remains unknown. Even so, other unrelated proteins have three DM10 motifs at the C-terminus that probably participates in axonemal targeting (King, 2006). The same motif is also present in the predicted TcNDPK3.

The domain called “NDPK_I” is a canonical NDPK motif whereas the “NDPK7B” is associated with NDPKs that contain a DM10 motif (Fig. 1).

3.2. Biochemical properties of TcNDPK1 and TcNDPK2

Two putative NDPK genes corresponding to the unique “short” isoform (TcNDPK1) and one of the “long” DM10-containing isoform (TcNDPK2) were chosen for biochemical characterization. Both genes were amplified by PCR, cloned, overexpressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography (Fig. 2A). Obtained polypeptides showed NDPK activity in the presence of ATP and

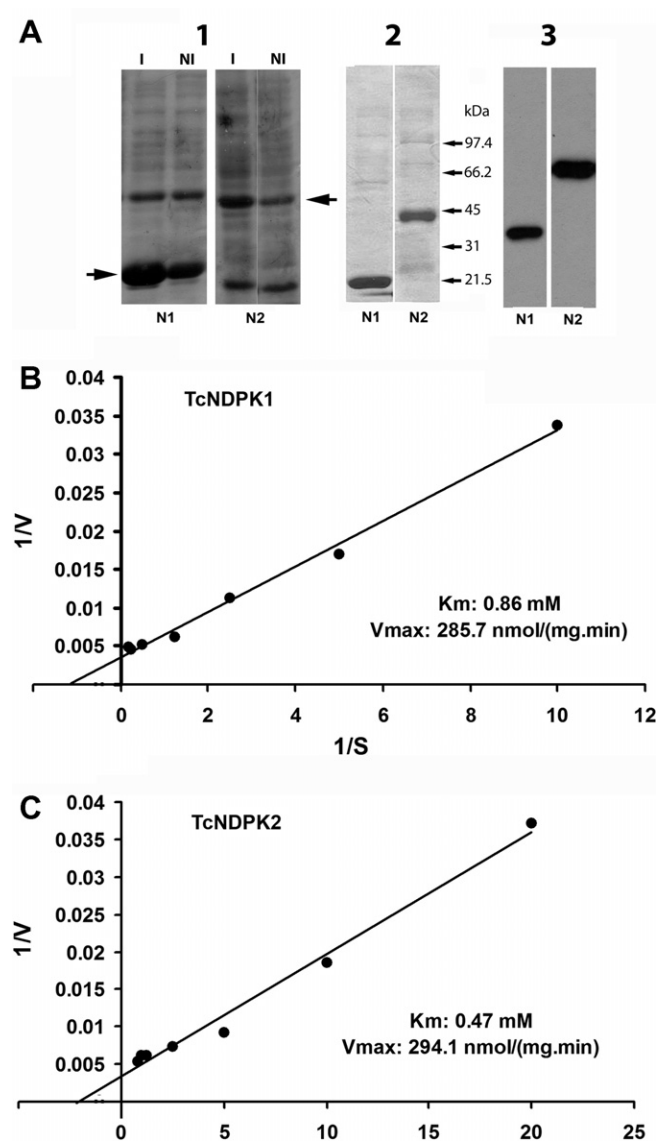


Fig. 2. Biochemical properties of TcNDPK1 and TcNDPK2. Recombinant TcNDPK1 (N1) and TcNDPK2 (N2) were overexpressed in *E. coli* (A1); affinity purified (A2), and analyzed by Western blot using anti-6x-his antibodies (A3). Initial rates of NDPK activity (V_0) measured as a function of dTDP concentration. Apparent Michaelis–Menten constants (K_m) values were calculated using Lineweaver–Burk plots for TcNDPK1 (B) and TcNDPK2 (C).

dTDP. Kinetics parameters for both enzyme isoforms were obtained. Michaelis–Menten constants (K_m) for dTDP of 0.86 mM and 0.47 mM were calculated using Lineweaver–Burk plot for TcNDPK1 and TcNDPK2, respectively (Fig. 2B and C). TcNDPK1 showed no inhibition by substrate at concentrations up to 4 mM. Interestingly, TcNDPK2 was strongly inhibited at high dTDP concentrations suggesting the presence of a second, inhibitory and low-affinity, substrate binding site which could be act as a regulatory mechanism in vivo (Fig. 3A).

3.3. Subcellular localization of NDPK activity

To preliminary determine the subcellular localization of the NDPK activity, digitonin extractions experiments were carried out. NDPK activity was detected in different cellular fractions of the replicative, non-infective, *T. cruzi* epimastigote stage. The pattern of extraction of NDPK activity was compared with those

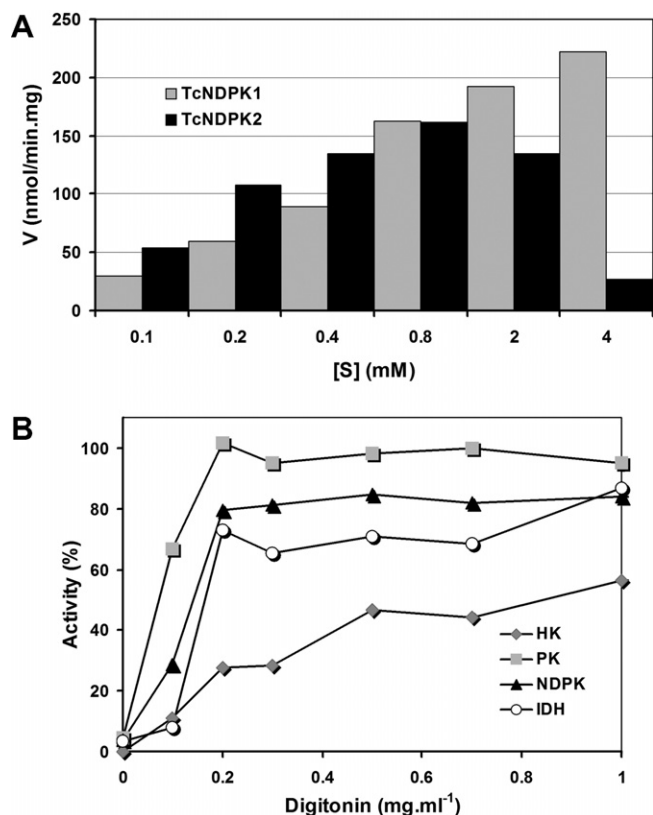


Fig. 3. Substrate regulation and digitonin extraction of NDPKs activities. TcNDPK1 and TcNDPK2 initial velocities were calculated as a function of substrate concentration in the range 0.1–4 mM (A). Digitonin extractions were carried out as described under Section 2 using *T. cruzi* epimastigotes samples. The measured activities represent the release of the indicated enzyme markers of intracellular compartments (HK, hexokinase; PK, pyruvate kinase; IDH, NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase) and the nucleoside diphosphate kinase activity (NDPK) by selective permeation with digitonin in the range 0–1 mg ml⁻¹ (B).

measured for cytosolic, mitochondrial and glycosomal enzyme markers (pyruvate kinase, NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase and hexokinase, respectively). At 0.1 mg ml⁻¹ of digitonin, 67% of the pyruvate kinase activity was released, and 29% of the NDPK activity was detected. At a digitonin concentration of 0.2 mg ml⁻¹, when the pyruvate kinase activity was completely extracted and the IDH activity began to be released the NDPK activity increased up to 80%. It could suggest a cytosolic and also a mitochondrial localization of NDPK activity. However, no additional NDPK activity was detected at higher digitonin concentrations (Fig. 3B), even at concentration of 5 mg ml⁻¹ where the IDH and HK activities reached 100% (data not shown). This result suggests the existence of a main cytosolic NDPK activity, since most of the activity was extracted at low digitonin concentrations, in addition to other 20% of NDPK activity which probably remains associated to some organelle or subcellular structure up to 5 mg ml⁻¹ digitonin concentration (Fig. 3B). The mentioned activity detected at low digitonin concentration could be attributed to the NDPK previously described by Ulloa et al. (1995). Moreover, the enzyme purified by these authors has similar kinetic properties and molecular weight than TcNDPK1 (16 kDa). However, the presence of such other NDPKs in the soluble fraction could not be discarded.

To address this issue, TcNDPK1 and TcNDPK2 mouse polyclonal antisera were produced. Western blot analyses were performed using *T. cruzi* extracts from different stages. Similar levels of TcNDPK2 were observed in the three stages (Fig. 4, lower panel). On the other hand, TcNDPK1 was found only in trypomastigotes and amastigotes (Fig. 4, upper panel) but probably these antisera

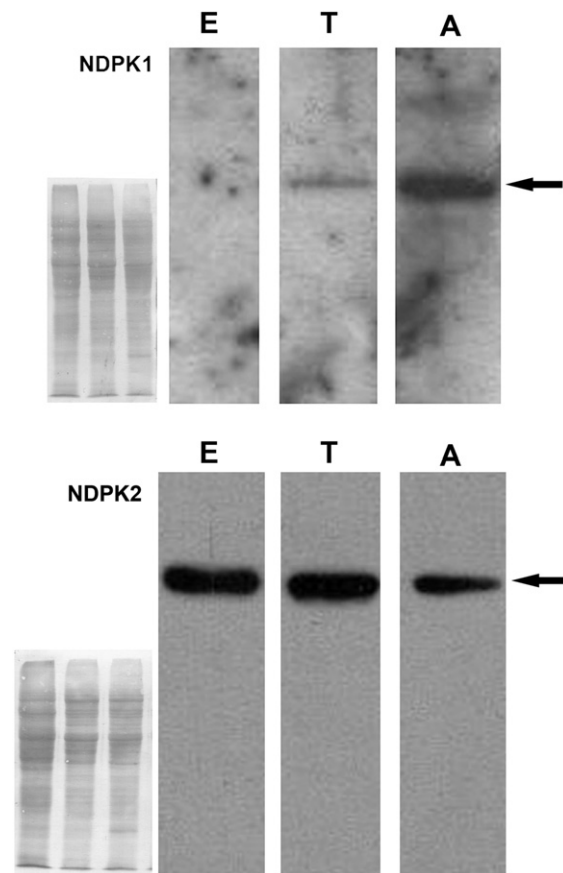


Fig. 4. Expression analysis of TcNDPK1 and TcNDPK2. Western blot analyses were performed using mouse polyclonal anti-TcNDPK1 and TcNDPK2 antibodies and *T. cruzi* extract samples from epimastigotes (E), trypomastigotes (T) and amastigotes (A). Total protein profiles stained using Coomassie brilliant blue are showed in the left side of each figure. Arrows indicates the position of TcNDPK1 and TcNDPK2.

could not be able to detect low levels of TcNDPK1. Due to the low antigenicity of this protein, seven independent mouse TcNDPK1 antisera were tested, but TcNDPK1 remained undetectable in epimastigotes.

NDPKs, during long time it have been considered house-keeping enzymes involved only in cellular energy homeostasis. However, additional functions in signaling pathways and in the interaction, and also modulation of the activity of other proteins were postulated during the last years (Kimura et al., 2003; Muimo et al., 2006).

Trypanosomatid organisms have an unusual large number of phosphotransferases enzymes involved in wide variety of cellular functions, including nucleotide recycling and interconversion, energy transport and balance. The large number of different NDPK isoforms is in agreement with those previously observed for other *T. cruzi* phosphotransferases, such as adenylate kinases and seems to be a common feature for these enzymes in trypanosomatids organisms.

Acknowledgments

We are deeply grateful to Dr. Carolina Carrillo and Prof. Rosa Melano. This study was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 5492), University of Buenos Aires (UBACyT X073), and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT-PICT REDES 2003-00300 and PICT 2005-33431). C.A.P. is member of the career of scientific investigator of CONICET (Argentina), M.R.M. is a research fellow

from Fundación YPF, G.E.C. is a research fellow from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica and L.A.B. is a research fellow from CONICET.

References

- Biggs, J., Hersperger, E., Steeg, P.S., Liotta, L.A., Shearn, A., 1990. A *Drosophila* gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell* 63, 933–940.
- Bominaar, A.A., Molijn, A.C., Pestel, M., Veron, M., Van Haastert, P.J., 1993. Activation of G-proteins by receptor-stimulated nucleoside diphosphate kinase in dictyostelium. *EMBO J.* 12, 2275–2279.
- Bouvier, L.A., Miranda, M.R., Canepa, G.E., Alves, M.J., Pereira, C.A., 2006. An expanded adenylate kinase gene family in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760, 913–921.
- Caceres, A.J., Portillo, R., Acosta, H., Rosales, D., Quinones, W., Avilan, L., Salazar, L., Dubourdieu, M., Michels, P.A., Concepcion, J.L., 2003. Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 251–262.
- Camargo, E.P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 12, 93–100.
- Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C., Franke de Cazzulo, B.M., 1989. On the regulatory properties of the pyruvate kinase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *FEMS Microbiol. Lett.* 50, 259–263.
- Denicola, A., Rubbo, H., Haden, L., Turrens, J.F., 2002. Extramitochondrial localization of NADH-fumarate reductase in trypanosomatids. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 133, 23–27.
- Hammond, D.J., Gutteridge, W.E., 1984. Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13, 243–261.
- Hunger-Glaser, I., Hemphill, A., Shalaby, T., Hänni, M., Seebeck, T., 2000. Nucleoside diphosphate kinase of *Trypanosoma brucei*. *Gene* 257, 251–257.
- Kantor, J.D., McCormick, B., Steeg, P.S., Zetter, B.R., 1993. Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res.* 53, 1971–1973.
- Kimura, N., Shimada, N., Ishijima, Y., Fukuda, M., Takagi, Y., Ishikawa, N., 2003. Nucleoside diphosphate kinases in mammalian signal transduction systems: recent development and perspective. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 41–47.
- King, S.M., 2006. Axonemal protofilament ribbons, DM10 domains, and the link to juvenile myoclonic epilepsy. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 245–253.
- Lacombe, M.L., Milon, L., Munier, A., Mehus, J.G., Lambeth, D.O., 2000. The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 247–258.
- Lascu, L., Gonin, P., 2000. The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 237–246.
- Levit, M.N., Abramczyk, B.M., Stock, J.B., Postel, E.H., 2002. Interactions between *Escherichia coli* nucleoside-diphosphate kinase and DNA. *J. Biol. Chem.* 277, 5163–5167.
- Lombardi, D., Lacombe, M.L., Paggi, M.G., 2000. nm23: unraveling its biological function in cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* 182, 144–1449.
- Lu, Q., Park, H., Egger, L.A., Inouye, M., 1996. Nucleoside-diphosphate kinase-mediated signal transduction via histidyl-aspartyl phosphorelay systems in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271, 32886–32893.
- MacDonald, N.J., De la Rosa, A., Benedict, M.A., Freije, J.M., Kruttsch, H., Steeg, P.S., 1993. A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J. Biol. Chem.* 268, 25780–25789.
- Marr, J.J., 1991. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. *J. Lab. Clin. Med.* 118, 111–119.
- Muimo, R., Crawford, R.M., Mehta, A., 2006. Nucleoside diphosphate kinase A as a controller of AMP-kinase in airway epithelia. *J. Bioenerg. Biomembr.* 38, 181–187.
- Parks, R.E.J., Agarwal, R.P., 1973. Nucleoside diphosphokinases. *Enzymes* 8, 307–334.
- Postel, E.H., Berberich, S.J., Flint, S.J., Ferrone, C.A., 1993. Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* 261, 478–480.
- Postel, E.H., Berberich, S.J., Rooney, J.W., Kaetzel, D.M., 2000. Human NM23/ nucleoside diphosphate kinase regulates gene expression through DNA binding to nuclease-hypersensitive transcriptional elements. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 277–284.
- Postel, E.H., 1999. Cleavage of DNA by human NM23-H2/nucleoside diphosphate kinase involves formation of a covalent protein–DNA complex. *J. Biol. Chem.* 274, 22821–22829.
- Randazzo, P.A., Northup, J.K., Kahn, R.A., 1992. Regulatory GTP-binding proteins (ADP-ribosylation factor, Gt, and RAS) are not activated directly by nucleoside diphosphate kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 18182–18189.
- Rosengard, A.M., Kruttsch, H.C., Shearn, A., Biggs, J.R., Barker, E., Margulies, I.M., King, C.R., Liotta, L.A., Steeg, P.S., 1989. Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* 342, 177–180.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N., 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 183–215.
- Ulloa, R.M., Muschietti, J.P., Veron, M., Torres, H.N., Tellez-Iñón, M.T., 1995. Purification and characterization of a soluble nucleoside diphosphate kinase in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70, 119–129.
- Wagner, P.D., Vu, N.D., 2000. Phosphorylation of geranyl and farnesyl pyrophosphates by Nm23 proteins/nucleoside diphosphate kinases. *J. Biol. Chem.* 275, 35570–35576.
- Wagner, P.D., Steeg, P.S., Vu, N.D., 1997. Two-component kinase-like activity of nm23 correlates with its motility-suppressing activity. in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9000–9005.

Trypanosoma cruzi nucleoside diphosphate kinase 1 (TcNDPK1) has a broad nuclease activity

M. R. MIRANDA, G. E. CANEPA, L. A. BOUVIER and C. A. PEREIRA*

Laboratorio de Biología Molecular de *Trypanosoma cruzi* (LBMTc), Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Universidad de Buenos Aires and CONICET, Combatientes de Malvinas 3150, (1427) Buenos Aires, Argentina

(Received 8 July 2008; revised 1 September 2008; accepted 12 September 2008; first published online 4 November 2008)

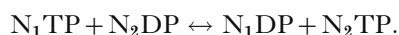
SUMMARY

Here, we present the characterization of a trypanosomatid nucleoside diphosphate kinase (TcNDPK1) exhibiting nuclease activity. This is the first identification of a NDPK with this property in trypanosomatid organisms. The recombinant TcNDPK1 protein cleaves not only linear DNA, but also supercoiled plasmid DNA. Additionally, TcNDPK1 is capable of degrading *Trypanosoma cruzi* genomic DNA. ATP or ADP did not affect the nuclease activity, while the absence of Mg^{2+} completely inhibits this activity. NDPK and nuclease activities were inhibited at the same temperature, suggesting the presence of related catalytic sites. Furthermore, phenogram analysis showed that TcNDPK1 is close to *Drosophila melanogaster* and human NDPKs. The unspecific nuclease activity could suggest a participation in cellular processes such as programmed cell death.

Key words: Trypanosomatidae, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, nucleoside diphosphate kinase, nuclease.

INTRODUCTION

The flagellated protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the aetiological agent of Chagas' disease, representing a serious health problem in the Americas, with 18 million people infected and 100 million people at risk (Barrett *et al.* 2003). A common feature amongst parasitic protozoan organisms is their ability to adapt their metabolism to endure a wide range of environmental conditions and selection pressures, including the availability and quality of carbon sources in the different mammalian and insect hosts (Tielens *et al.* 1998). One of the enzyme families related to cell energy management is the nucleoside diphosphate kinases (NDPKs). These are enzymes involved in energy metabolism transferring high-energy phosphates between nucleosides di- and triphosphates, thus maintaining the nucleoside balance in the cell (Parks and Agarwal, 1973), according to the following reaction:



NDPKs were considered house-keeping enzymes for a long time; however, a wide variety of additional functions have been described. In humans, 8 NDPK isoforms were identified; 5 of these proteins bear nuclease activity with different functions related to apoptosis and tumor suppression processes (Lacombe *et al.* 2000). This feature has also been

demonstrated for NDPKs from bacteria such as *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* (Levit *et al.* 2002; Saini *et al.* 2004). One of 3 plant NDPK isoforms also has this activity probably associated with programmed cell death (Hammargren *et al.* 2007). *Trypanosoma cruzi* has 2 bona fide NDPK isoforms named TcNDPK1 and TcNDPK2 (GeneBank Accession numbers XP_820714 and XP_821632, respectively), which were cloned and biochemically characterized (Miranda *et al.* 2008). While TcNDPK1 is similar to canonical NDPKs, TcNDPK2 presents an N-terminal extension similar to a DM10 domain (InterPro number: IPR006602) which is capable of targeting proteins to flagella (Miranda *et al.*, unpublished observations). In addition, 2 putative NDPKs were also predicted using the *T. cruzi* genome data (TcNDPK3 and TcNDPK4).

In this study, the first evidence of a protozoan NDPK harbouring nuclease activity is presented. We report that *T. cruzi* TcNDPK1 cleaves a linear and supercoiled plasmid substrate and also genomic DNA, with characteristics similar to other nucleases.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of recombinant TcNDPK1

TcNDPK1 was expressed in *E. coli* as described by Miranda *et al.* (2008). Briefly, TcNDPK1 sequence was obtained from GeneDB (<http://www.genedb.org/>) and TcruziDB (<http://tcruziidb.org/>). The fragment carrying the entire *T. cruzi* TcNDPK1 gene (GeneDB systematic ID Tc00.1047053508707.200)

* Corresponding author: IDIM, Combatientes de Malvinas 3150, (1427) Bs. As., Argentina. Tel: +5411 4514 8701. Fax: +5411 4523 894. E-mail: cpereira@mail.retina.ar

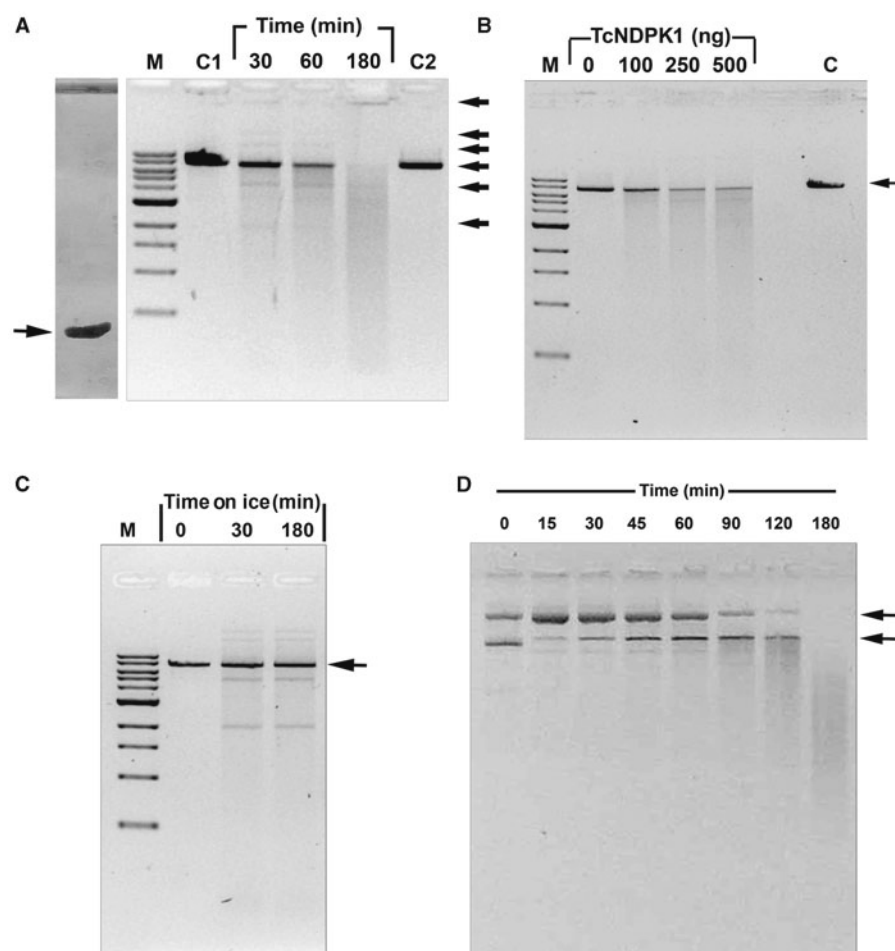


Fig. 1. Nuclease assays using different DNA substrates. (A) The first (left) lane showed an SDS-PAGE of the TcNDPK1 used for nuclease activity assays. A time-course of linear DNA degradation was assayed using 300 ng of 6.2 kb length plasmid and 500 ng TcNDPK1. Arrows indicate bands associated with the enzymatic degradation process. Controls without enzyme (C1) and using TcNDPK2 (C2) were included. (B) Increasing amounts of enzyme source (0–500 ng) with 300 ng of a linear DNA substrate (arrow) were tested including a control (C) without enzyme. (C) A standard nuclease activity (300 ng linear DNA and 500 ng enzyme) was performed during 180 min on ice. Arrow indicates the DNA substrate. (D) A time-course using 300 ng of circular supercoiled DNA as substrate and 500 ng of enzyme. Arrows indicate supercoiled and open-circle plasmid.

was obtained by PCR amplification and ligated to the pRSET-A expression vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). Over-expression of the recombinant protein was performed in the *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, Carlsbad, CA). The recombinant protein was purified by affinity chromatography using an Ni^{2+} -agarose resin (Qiagen, MD, USA). The purity of the enzyme was evaluated by reverse-phase HPLC in a Beckman System Gold equipped with a C18 column of 4.6 mm $\times$ 150 mm and a 20 μ l loop. A gradient elution composed by acetonitrile/water, 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid was employed as follows: 10 min 0/100, 15 min to reach 40/60, 10 min to reach 60/40 and 30 min to reach 100/0. The flux was 0.15 ml/min and detection was carried out at 280 nm. A peak eluting at a retention time of 37.6 min corresponding to TcNDPK1 represents more than 90% of the total proteins in the sample. The purity of TcNDPK1 was also evaluated by SDS-PAGE as explained in the Results section.

In vitro nuclease assays

Samples of 300 ng of plasmidic linear, supercoiled or genomic DNA substrates were incubated in 50 mM Tris (pH 7.0), 10 mM MgCl_2 with 500 ng of TcNDPK1 at 37 °C for 3 h, unless otherwise indicated. In other assays ATP or ADP (5 mM) was added to the reaction mixtures. The reaction products were resolved in agarose gels. All assays were performed at least in triplicate and data are representative of at least 3 independent experiments.

Bioinformatics

A group of nucleoside diphosphate kinase amino acid sequences available at GenBank were selected and aligned, clustered according to their amino acid identity using the ClustalW algorithm (Higgins and Sharp, 1988) and schematically represented using the Treeview program (Page, 1996).

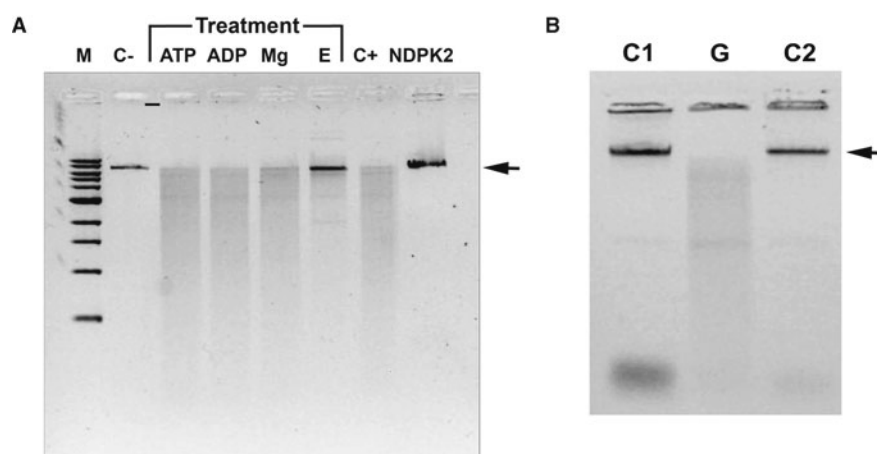


Fig. 2. Requirements of nuclease activity and assays using *T. cruzi* genomic DNA. (A) Standard nuclease assays (300 ng linear DNA and 500 ng enzyme) were performed under different conditions: reaction mixture with ATP or ADP, without Mg^{2+} (5 mM EDTA) and the control with Mg^{2+} . Additional controls were performed without enzyme (C-), using a standard reaction mixture (C+) or 500 ng of TcNDPK2. (B) Enzyme assays with *T. cruzi* genomic DNA (G) including controls performed without enzyme (C1) or 500 ng of TcNDPK2 (C2).

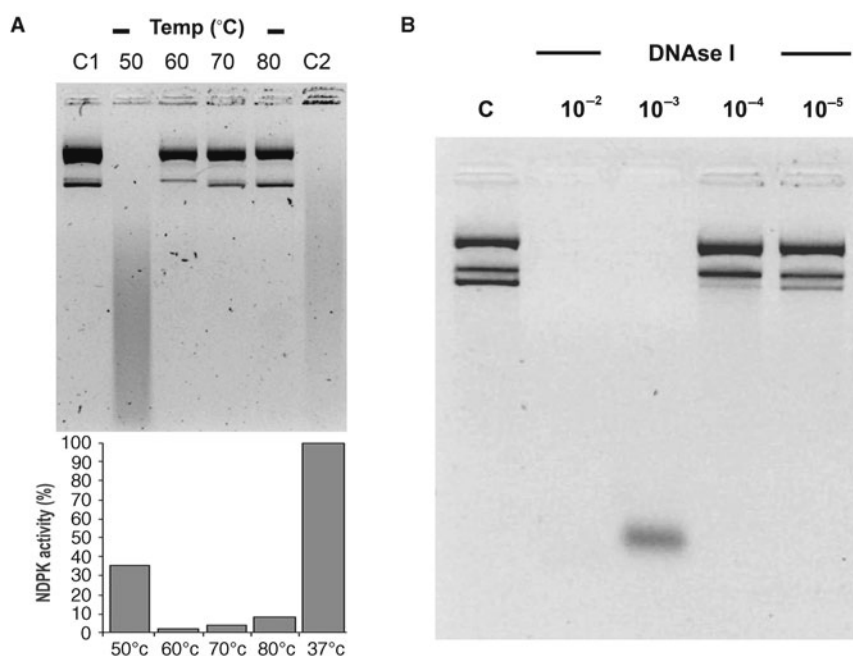


Fig. 3. Effects of temperature on TcNDPK1 activities and comparison with DNase I. Correlation between nuclease and NDPK activity was evaluated at different temperatures. (A) Upper panel: TcNDPK1 (500 ng) was pre-treated at different temperatures between 50 and 80 °C during 10 min and evaluated for nuclease activities using 300 ng of plasmid substrate. Controls without enzyme (C1) and standard assay at 37 °C (C2) were performed. Lower panel: NDPK activity, using 10 μ g of enzyme, at different temperatures was represented with a bar graphic. (B) Commercial DNase I (Invitrogen) was used at different amounts between 2×10^{-2} and 2×10^{-5} units in the same conditions as TcNDPK1 nuclease assay.

RESULTS

TcNDPK1 degrades linear and circular supercoiled DNA in a time, protein and temperature-dependent manner

The nuclease activity of TcNDPK1 was evaluated using an *in vitro* cleavage assay as described in the Materials and Methods section. The capability of TcNDPK1 to cleave and degrade linear DNA

was initially tested using a plasmid substrate. Different incubation times and enzyme quantities were tested. These assays showed that TcNDPK1 cleavage activity is proportional to incubation time and enzyme amounts up to 3 h and 500 ng of enzyme where DNA substrate was consumed (Fig. 1A and B). During the time-course of DNA degradation, different plasmid structures have been observed (arrows on Fig. 1A). Interestingly, some

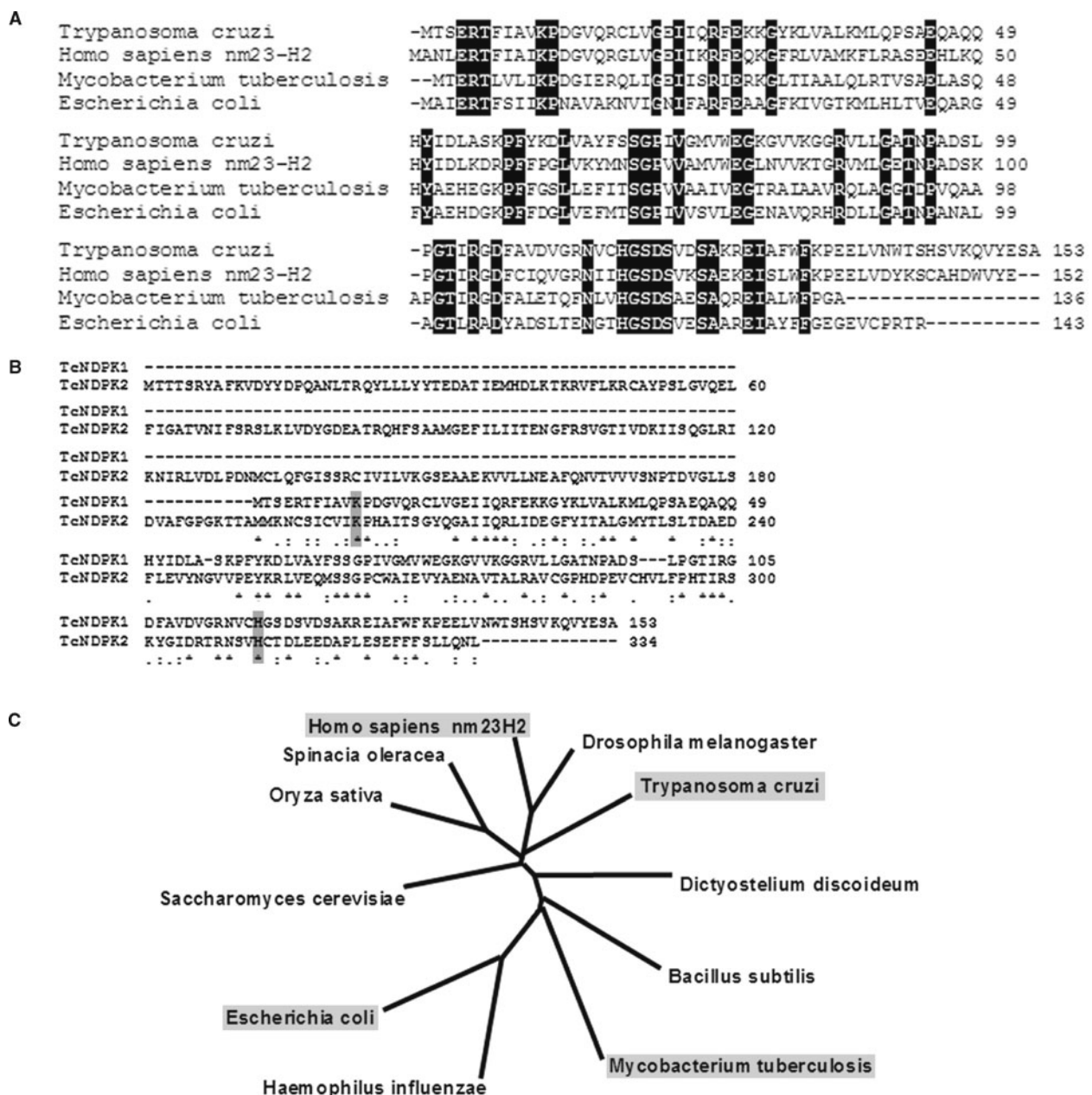


Fig. 4. Sequence alignment and phenogram of different NDPKs. (A) A global sequence alignment was performed using NDPKs harbouring nuclease activity. Arrows indicate the previously reported residues involved in nuclease (K) or kinase activities (H). (B) Global sequence alignment between TcNDPK1 and TcNDPK2 (without nuclease activity). Shaded residues are those reported to be involved in nuclease activity. (C) Selected NDPK seed sequences were used as references of this enzyme group. A phenogram was constructed based on the sequence identity. Shaded sequences represent enzymes with previously reported nuclease activity.

of these bands have lower gel mobility compared with the DNA substrate, suggesting the formation of an enzyme-DNA intermediary. Control assays were performed without enzyme (lane C1 in Fig. 1A), using TcNDPK2 instead of TcNDPK1 (lane C2 in Fig. 1A) or incubating nuclease reactions on ice (Fig. 1C). In all the mentioned control assays DNA substrates remained unaltered. As occurred with linear DNA, the entire substrate sample was completely degraded in about 180 min (Fig. 1D).

Nuclease activity is Mg^{2+} dependent but is not affected by ADP or ATP

In order to test if the nuclease activity is regulated by nucleosides di- or triphosphate nuclease assays were performed using TcNDPK1 and a reaction mixture supplemented with 5 mM ATP or ADP. As Fig. 2A shows, nucleotides are not required for TcNDPK1 nuclease activity, suggesting that kinase and nuclease are independent enzyme activities unlike other NDPKs. However, similar to other nucleases, the

absence of Mg^{2+} in the reaction mixture abolishes the enzymatic activity (Fig. 2A).

T. cruzi genomic DNA is also susceptible to TcNDPK1

To test if TcNDPK1 is able to degrade long DNA substrates, *T. cruzi* genomic DNA was used as substrate, including 2 negative controls without enzyme and using TcNDPK2. It is noteworthy that similar times were needed to completely degrade genomic or plasmidic DNA (Fig. 2B).

Nuclease and NDPK activities decrease proportionally by heat treatment

In order to test if separate protein environments are responsible for TcNDPK1 nuclease and kinase catalytic activity, a thermostability assay was performed. Purified TcNDPK1 samples were pre-incubated at different temperatures and assayed for nuclease and NDPK activities. Fig. 3A shows that both activities were completely inhibited at the same temperature, 60 °C, suggesting that the same or close localized residues/structures are involved in the catalytic site. TcNDPK1 activity was also compared to a commercial nuclease, DNase I (Invitrogen). Using different enzyme quantities between 2×10^{-2} and 2×10^{-5} units, DNase I-specific activity was estimated to $0.9 \text{ ng dsDNA} \times (\text{min. ng enzyme})^{-1}$ (Fig. 3B) while TcNDPK1 specific activity was $0.06 \text{ ng dsDNA} \times (\text{min. ng enzyme})^{-1}$. Both assays were performed under the same conditions and same DNA substrate amount.

TcNDPK1 is conserved between different species

Fig. 4A shows a global alignment between some of the reported NDPKs which have nuclease activity. Different peptides are completely conserved between evolutionarily distant species, the first arrow indicates the lysine involved in the nuclease activity while the second arrow shows the histidine residue participating in the phosphoryl transfer between NDPs and NTPs (Kumar *et al.* 2005). In order to identify sequence features associated with nuclease activity, a phenogram was constructed with different NDPKs, including those with demonstrated nuclease activity (Fig. 4C, grey shaded). TcNDPK1 appears to be close to the *Drosophila melanogaster* and human (Nm23-H2) equivalents. In addition, Fig. 4B shows a global alignment of TcNDPK1 and 2. Interestingly, despite TcNDPK2 lacking nuclease activity, the previously reported lysine involved in it (grey shaded) is completely conserved among both enzymes.

DISCUSSION

Nucleoside diphosphate kinases belong to a very well-characterized enzyme family; however, its

nuclease activity was reported only in a few organisms (Lacombe *et al.* 2000; Levit *et al.* 2002; Saini *et al.* 2004; Hammargren *et al.* 2007). In the specific case of TcNDPK1, this enzyme is capable of degrading different DNA substrates, independent of its length and structure with a specific activity 15-fold lower than a commercial high-activity nuclease, but 6-fold higher than the pea NDPK (Hammargren *et al.* 2007). *T. cruzi* genomic DNA is also susceptible to TcNDPK1 nuclease activity, which is indirect evidence that TcNDPK1 could be a component of programmed cell death machinery in trypanosomatid organisms (Debrabant and Nakhasi, 2003). It was reported that ATP activates the pea mitochondrial NDPK nuclease activity *in vitro* while ADP has an inhibitory effect (Hammargren *et al.* 2007); however, TcNDPK1 is not affected by the presence of such nucleotides. On the other hand, the nuclease activity is completely dependent on Mg^{2+} , as occurs with most other nucleases. In contrast with the previously identified lysine involved in nuclease activity in *Mycobacterium tuberculosis* and human NDPKs (Kumar *et al.* 2005; Postel *et al.* 2000), our sequence comparison between both *T. cruzi* NDPKs suggests that other amino acids or structures are critical for such activity. The human orthologue Nm23-H2, which also has nuclease properties, was associated with relevant diseases such as oncogenic processes as a human metastasis-suppressor (Backer *et al.* 1993). In addition to the nuclease function, Nm23-H2 also participates in the activation of potassium channels by histidine phosphorylation (Srivastava *et al.* 2006); however, the physiological function of TcNDPK1 requires further investigation.

We are deeply grateful to Rosario Medici for technical assistance. This study was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 5492), University of Buenos Aires (UBACyT X073), and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT-PICT REDES 2003-0300 and PICT 2005-33431). C.A.P. is a member of the career of scientific investigator of CONICET (Argentina), M.R.M. is a research fellow from Fundación YPF, G.E.C. and L.A.B. are research fellow from CONICET.

REFERENCES

- Backer, J. M., Mendola, C. E., Kovesdi, I., Fairhurst, J. L., O'Hara, B., Eddy R. L., Jr., Shows, T. B., Mathew, S., Murty, V. V. and Chaganti, R. S. (1993). Chromosomal localization and nucleoside diphosphate kinase activity of human metastasis-suppressor genes NM23-1 and NM23-2. *Oncogene* **8**, 497–502.
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasc, A. C., Cazzulo, J. J. and Krishna, S. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet* **362**, 1469–1480.
- Debrabant, A. and Nakhasi, H. (2003). Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism

- for survival of the fittest? *Kinetoplastid Biology and Disease* **2**, 1–7.
- Hammargren, J., Salinas, T., Maréchal-Drouard, L. and Knorpp, C.** (2007). The pea mitochondrial nucleoside diphosphate kinase cleaves DNA and RNA. *FEBS Letters* **581**, 3507–3511.
- Higgins, D. G. and Sharp, P. M.** (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**, 237–244.
- Kumar, P., Verma, A., Saini, A. K., Chopra, P., Chakraborti, P. K., Singh, Y. and Chowdhury, S.** (2005). Nucleoside diphosphate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* cleaves single strand DNA within the human c-myc promoter in an enzyme-catalyzed reaction. *Nucleic Acids Research* **33**, 2707–2714.
- Lacombe, M. L., Milon, L., Munier, A., Mehus, J. G. and Lambeth, D. O.** (2000). The human Nm23/ nucleoside diphosphate kinases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **32**, 247–258.
- Levit, M. N., Abramczyk, B. M., Stock, J. B. and Postel, E. H.** (2002). Interactions between *Escherichia coli* nucleoside-diphosphate kinase and DNA. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 5163–5167.
- Miranda, M. R., Canepa, G. E., Bouvier, L. A. and Pereira, C. A.** (2008). *Trypanosoma cruzi*: Multiple nucleoside diphosphate kinase isoforms in a single cell. *Experimental Parasitology* **120**, 103–107.
- Page, R. D.** (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357–358.
- Parks R. E. Jr., and Agarwal, R. P.** (1973). Nucleoside diphosphokinases, In *The Enzymes* (ed. Boyer, P. D.), pp. 307–334. Academic Press, New York, USA.
- Postel, E. H., Abramczyk, B. M., Levit, M. N. and Kyin, S.** (2000). Catalysis of DNA cleavage and nucleoside triphosphate synthesis by NM23-H2/NDP kinase share an active site that implies a DNA repair function. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 14194–14199.
- Saini, A. K., Maithal, K., Chand, P., Chowdhury, S., Vohra, R., Goyal, A., Dubey, G. P., Chopra, P., Chandra, R., Tyagi, A. K., Singh, Y. and Tandon, V.** (2004). Nuclear localization and in situ DNA damage by *Mycobacterium tuberculosis* nucleoside-diphosphate kinase. *Journal of Biological Chemistry* **29**, 50142–50149.
- Srivastava, S., Li, Z., Ko, K., Choudhury, P., Albaqumi, M., Johnson, A. K., Yan, Y., Backer, J. M., Unutmaz, D., Coetzee, W. A. and Skolnik, E. Y.** (2006). Histidine phosphorylation of the potassium channel KCa3.1 by nucleoside diphosphate kinase B is required for activation of KCa3.1 and CD4 T cells. *Molecular Cell* **24**, 665–675.
- Tielens, A. G. and Van Hellemond, J. J.** (1998). Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. *Parasitology Today* **14**, 265–272.



Mariana Miranda <mirandamariana@gmail.com>

Rv: PARASITOLOGY: Manuscript Accepted MS ID PAR-2009-0088.R2

2 messages

Claudio A. Pereira <claper2@yahoo.com.ar>

Thu, Apr 30, 2009 at 11:56 AM

To: Mariana Miranda <mirandamariana@gmail.com>, Gaspar Canepa <gasparcanepa@gmail.com>, Leon Bouvier <lbouvier@gmail.com>

--- El jue 30-abr-09, s.phillips@bio.gla.ac.uk <s.phillips@bio.gla.ac.uk> escribió:

De: s.phillips@bio.gla.ac.uk <s.phillips@bio.gla.ac.uk>

Asunto: PARASITOLOGY: Manuscript Accepted MS ID PAR-2009-0088.R2

Para: cpereira@mail.retina.ar

Fecha: jueves, 30 de abril de 2009, 4:16 am

30-Apr-2009

Dear Dr. Pereira

MS ID: PAR-2009-0088.R2

Title: Subcellular localization of Trypanosoma cruzi arginine kinase

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in PARASITOLOGY and will now be sent to Press.

It is now essential that:

1) You mail high-quality hard-copy originals of all figures, together with one copy of all figures, quoting the MS ID and Title, to:

Dr M.E.Painter/Davies
Middlested High Ditch Road
Fen Ditton
CAMBRIDGE CB5 8TE
UK

Photographs should be mounted on A4 card.

2) If applicable, you mail publishers' permissions to use previously published material from other sources to the above.

3) You send a signed TRANSFER OF COPYRIGHT TO CUP form to the above. This form can be obtained by clicking on 'Instructions and Forms' at the top right-hand corner of the system screens

4) I have waived colour charges.

Your MS cannot be processed until all the above have been received.

Yours sincerely,

Stephen Phillips

Prof. Stephen Phillips



Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* arginine kinase

Journal:	<i>Parasitology</i>
Manuscript ID:	PAR-2009-0088.R2
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	29-Apr-2009
Complete List of Authors:	Miranda, Mariana; Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari (UBA-CONICET), Sustancias Vasoactivas Bouvier, Leon; Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari (UBA-CONICET), Sustancias Vasoactivas Canepa, Gaspar; Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari (UBA-CONICET), Sustancias Vasoactivas Pereira, Claudio; Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari (UBA-CONICET), Sustancias Vasoactivas
Key Words:	Trypanosoma cruzi, Arginine kinase, Phosphotransferase, Phosphagen, Chagas' Disease

Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* arginine kinase

Mariana R. Miranda, León A. Bouvier, Gaspar E. Canepa and Claudio A.
Pereira*

Laboratorio de Biología Molecular de *Trypanosoma cruzi* (LBMTC), Instituto de
Investigaciones Médicas (IDIM), CONICET and Universidad de Buenos Aires,
Combatientes de Malvinas 3150, Buenos Aires, Argentina.

Running title: *T. cruzi* arginine kinase localization

***Corresponding author:** C. Pereira, IDIM, Combatientes de Malvinas 3150,
(1427) Bs. As., Argentina. Phone: 5411-4514-8701; FAX: 5411-4523-8904; E-
mail address: cpereira@mail.retina.ar

Summary

Phosphoarginine is a cell energy buffer molecule synthesized by the enzyme arginine kinase. In *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease, two different isoforms were identified by data mining, but only one is expressed during the parasite life cycle. The digitonin extraction pattern of arginine kinase differed from those obtained for reservosomes, glycosomes and mitochondrial markers, and similar to the cytosolic marker. Immunofluorescence analysis revealed that although arginine kinase is localized mainly in unknown punctuated structures and also in the cytosol, do not co-localize with none of the subcelular markers. This punctuated pattern has been previously observed in many cytosolic proteins of trypanosomatids. The knowledge of the subcellular localization of phosphagen kinases is a crucial issue to understand their physiological role in protozoan parasites.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; arginine kinase; phosphotransferase; phosphagen; Chagas' disease.

Introduction

ATP-buffering systems based on phosphagens (i.e. phosphocreatine and phosphoarginine) maintain the ATP homeostasis during high and fluctuating cell energy demands. Phosphoarginine is the main reserve of high-energy phosphate compounds in a wide variety of invertebrates, whereas in vertebrates only phosphocreatine was found. Arginine kinase (ATP:arginine phosphotransferase; EC 2.7.3.3) catalyze the reversible transphosphorylation between N-phospho-L-arginine and ATP (Ellington 2001). We have previously demonstrated the presence of an arginine kinase-mediated phosphagen system in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*, the etiological agents of Chagas' disease and human sleeping sickness, respectively (Pereira *et al.* 1999, 2000, 2002). Overexpression of *T. cruzi* arginine kinase improves the capability of transfectant parasites to grow and survive under nutritional and pH stress conditions (Pereira *et al.* 2003). These phenomena have been also observed when a heterologous arginine kinase was expressed in organisms lacking any kind of phosphagen kinase, such as yeast and bacteria (Canonaco *et al.* 2002, 2003). In addition, *T. cruzi* epimastigotes treated with hydrogen peroxide showed a time-dependent increase in arginine kinase expression suggesting the participation of this phosphagen system in oxidative stress responses (Miranda *et al.* 2006). The finding in these parasites of a phosphagen and its biosynthetic pathway, which are totally different from those in mammalian host tissues, points out that arginine kinase as a possible chemotherapy target (Pereira *et al.* 2000).

It was postulated that phosphagen kinases act together with other phosphotransferases such as adenylate kinases and nucleoside diphosphate

kinases forming an enzymatic “phosphotransfer network” that allow the communication between spatial separation of ATP consumption and production processes inside the cell (Dzeja and Terzic 2003). The number and localization of the different phosphotransferases in the intracellular space is a critical parameter for the network efficiency, consequently in this work we studied the presence of different arginine kinase isoforms and their subcellular localization by multiple approaches including digitonin extraction, immunofluorescence and bioinformatic prediction.

Materials and Methods

Parasite cultures and cell extracts.

Epimastigotes of the clone CL Brener, were cultured at 28 °C in 25 cm² plastic flasks, containing 5 mL of LIT medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, and 100 mg/l streptomycin (Camargo 1964). Cells were counted using a hemocytometric chamber, harvested by centrifugation at 1,500 xg for 10 min and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). Cell pellets were then resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.3, containing 10 µM of the protease inhibitor trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane (E64), and lysed by 5 cycles of freezing and thawing. Trypomastigotes and amastigotes samples were kindly provided by Dr. Maria Júlia Manso Alves (University of São Paulo, Brazil).

Western Blot analysis.

Arginine kinase antiserum was obtained from BALB/c mice immunized with *T. cruzi* recombinant arginine kinase. Hexokinase, NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase, cruzipain and mitochondrial aspartate amino transferase

antibodies were kindly provided by Dr. Juan Luis Concepción (Universidad de Los Andes, Venezuela), Dr. Juan José Cazzulo (Universidad Nacional de General San Martín, Argentina), and Dr. Cristina Nowicki (Universidad de Buenos Aires, Argentina), respectively. Samples from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes were resolved by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were electrotransferred from polyacrylamide gels to PVDF membranes (Pierce). The transferred membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat milk suspension for 60 min. *T. cruzi* arginine kinase, hexokinase, NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase, cruzipain and aspartate amino transferase antibodies were added and incubated for 12 h at a dilution of 1:2000, 1:2000, 1:5000, 1:5000 and 1:2500 respectively. Antiserum detection was carried out by incubating with a 1:5000 dilution of anti-mouse or anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (Vector Laboratories). The latter was developed with Supersignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

Digitonin extractions.

The extraction protocol was performed as previously described (Bouvier *et al.* 2006). Briefly, 5.2×10^9 epimastigote cells from a 200-mL culture were washed twice and resuspended in 4 mL of 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, containing 0.25 M sucrose and 10 μ M E64. Aliquots of 950 μ l containing 6.5×10^8 parasites were mixed with 50 μ l of the same buffer containing increasing amounts of digitonin (0 - 5 mg.mL⁻¹). After 2.5 min of incubation at room temperature, tubes were centrifuged at 16,100 $\times$ g for 2 min. Supernatants were kept frozen for enzyme assays. Pellets were resuspended in the same buffer, lysed by 5 cycles of freezing and thawing and kept frozen for further assays.

Enzyme assays.

Arginine kinase activity was calculated measuring the ADP formation using an enzyme-coupled assay that produce pyruvate by PK and lactate by LDH, the consequent oxidation of NADH is quantified by absorbance at 340 nm (Pereira *et al.* 2003). Briefly, a 25 μ L aliquot of protein fraction was added to the reaction mixture (100 mM Tris-HCl buffer pH 8.2, 1.5 mM phosphoenolpyruvate, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM DTT, 0.3 mM NADH, 10 mM L-arginine, 5 units per mL pyruvate kinase and 5 units per mL lactate dehydrogenase) in a cuvette to give a final volume of 0.5 mL. After 5 min at 35 °C the reaction was started by the addition of a small volume of ATP to a final concentration of 1.5 mM. Pyruvate kinase and hexokinase activities were determined using a lactic dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase coupled assay, respectively (Cazzulo *et al.* 1989; Caceres *et al.* 2003). NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase activity was determined as previously described (Denicola *et al.* 2002).

Immunofluorescence.

Indirect immunofluorescence was performed with freshly grown trypanosomes washed twice in PBS. After letting the cells settle for 30 min at room temperature onto poly-L-lysine coated coverslips, they were fixed at room temperature for 15 min with 3% formaldehyde in PBS, followed by 10 min with 0.1% Triton X100 in PBS. After blocking with 20% horse serum in PBS for 1 h. *T. cruzi* arginine kinase, hexokinase, cruzipain and NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase antibodies were added and incubated for 1 h at a dilution of 1:50, 1:200, 1:200 and 1:500, respectively. Texas Red or FITC conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgGs, were used as secondary antibodies. DAPI at a concentration of 1.5 μ g/mL was used to visualize the DNA. For mitochondrial staining, cells were previously incubated for 30 min in complete LIT medium

containing 500 nM MitoTracker (Red CMXRos, Molecular Probes), washed and incubated for 30 min in fresh complete LIT medium before fixation. Cells were observed in an Olympus BX60 fluorescence microscope. Images were recorded with an Olympus DP71 camera and processed using the Olympus DP software.

Bioinformatics.

Sequences from the “Tritryps” genome projects were obtained at GeneDB (<http://www.genedb.org/>) and TcruziDB (<http://tcruzidb.org/>). Assembly and analysis of the DNA sequence data, including prediction of open reading frames, were carried out using the software package Vector NTI v. 10.3.0 (Invitrogen) and the online version of BLAST at the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Results

Arginine kinase isoforms prediction in trypanosomatids. In order to determine the number of arginine kinase isoforms and the predicted subcellular localization, a database screening was performed using GeneDB followed by bioinformatics sequence analysis. The results showed that all analyzed species of the genus *Trypanosoma* present putative arginine kinase genes, including *T. brucei* (3 isoforms), *T. cruzi* (2 isoforms), *T. vivax* (2 isoform) and *T. congolense* (2 isoforms). All of them have a “short” cytosolic isoform (AK1), which has been previously characterized in *T. cruzi* (357 aa) and *T. brucei* (356 aa) (Pereira *et al.* 2000, 2002). *T. cruzi* presents an identical but truncated, AK1 variant (237 aa) which was also found at the GeneDB (Tc00.1047053482369.29), such isoform was analyzed below. On the other hand, *T. brucei* has two additional isoforms, one with a glycosomal localization signal (PTS-1, -SNL) called AK2

(370 aa) and a large AK3 isoform with unusual N- and C- terminal extensions (404 aa, upper inset Figure 1). *T. congolense* and *T. vivax* present a similar arginine kinase genomic organization but, due to the low coverage of their genome projects, the existence of an AK3 isoforms has not been confirmed. The overall amino acid sequence identity between *Trypanosoma* spp. arginine kinases was very high, 64% (88% positives). Moreover, synteny analysis revealed a strong conservation of genomic organization around the arginine kinase locus in trypanosomatids (Figure 1). In *T. brucei*, the best characterized genome from the “Trityp” project (Berriman *et al.* 2005) presents the following gene order: protein phosphatase 2A regulatory subunit gene (PP2A, Tb09.160.4540), hypothetical conserved protein gene 1 (HCP1, Tb09.160.4550), two arginine kinase genes (AK3 and AK2), hypothetical conserved protein gene 2 (HCP2, Tb09.160.4580), AK1 gene and ABC transporter gene (ABCT, Tb09.160.4600). A similar gene order was found in *T. vivax* and *T. congolense*, however *T. cruzi* lost AK3, AK2 and HCP2 genes. Interestingly, *Leishmania* spp. lost only AK genes, which is consistent with previous biochemical data (Pereira *et al. unpublished observations*).

Arginine kinase isoforms expression in different stages of the Trypanosoma cruzi life cycle. In order to test the expression of the putative truncated arginine kinase isoform, Western Blot analyses were performed using samples obtained from different *T. cruzi* stages and a polyclonal anti-AK antibody. As Figure 2 shows a 40 kDa arginine kinase was detected in epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes samples, however no evidences of the truncated 20 kDa isoform were found.

Determination of arginine kinase subcellular localization by digitonin extraction. To determine the subcellular localization of *T. cruzi* arginine kinase, digitonin extraction experiments were carried out (Figure 3A). The pattern of extraction of arginine kinase activity was compared with the following enzyme markers: hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK) and NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH). HK and PK are enzymes involved in glucose metabolism in *T. cruzi* HK localizes inside the glycosomes and PK in the cytosol (Caceres *et al.* 2003; Cazzulo 1994). IDH participates in the citric acid cycle in the mitochondrial matrix (Denicola *et al.* 2002). At a digitonin concentration of 0.1 mg.mL⁻¹, where 67% of the cytosolic marker (PK) has been extracted, about 16% of the arginine kinase activity was measured. In addition, at digitonin concentrations of 0.2 mg.mL⁻¹ and 0.5 mg.mL⁻¹, where the mitochondrial (IDH) and glycosomal (HK) markers were respectively released, all the arginine kinase activity was detected. About 16% of arginine kinase is soluble and the remaining 84% is extracted with the mitochondrial marker, suggesting the possibility of AK association with this organelle. Digitonin extraction samples were also analyzed by Western Blot, HK, NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase (GDH), which in *T. cruzi* is located exclusively in the cytosol, cruzipain (CZ), the major cysteine proteinase of *T. cruzi* epimastigotes, located in reservosomes (Barderi *et al.* 1998; de Souza *et al.* 2000) and the mitochondrial aspartate amino transferase (AAT, Marciano *et al.* 2008) were used as enzyme markers. The results obtained are in agreement with the biochemical enzyme measurements of the different digitonin samples (Figures 3A and 3B). A similar digitonin extraction pattern was only observed between arginine kinase and the cytosolic marker (GDH).

Determination of arginine kinase subcellular localization by immunofluorescence. Digitonin extraction analysis suggests that arginine kinase activity is localized mainly in mitochondria in addition to cytosolic small proportion. However, Western Blot analysis revealed no association with this organelle. In order to understand this observation, arginine kinase localization was also analyzed by immunofluorescence. A predominant punctuated pattern has been observed and a minor proportion in the cytosol (details in Figure 4 column A). The obtained pattern does not match with those observed by the cytosolic marker (NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase, Figure 4, GDH) or by the glycosomal marker (hexokinase, Figure 4, HK) and the reservosome marker (cruzipain, Figure 4, CZ). Furthermore, no co-localization was observed between arginine kinase and the mitochondrial reticulum when epimastigotes were stained with MitoTracker. In summary, arginine kinase does not localize in any of the tested organelle and the identity of the observed punctuated pattern requires further investigation.

Discussion

Energy communication and balance are essential processes in cellular homeostasis. Trypanosomatids organisms have an unusual large number of phosphotransferases involved in nucleotide recycling and interconversion. In *T. cruzi* six adenylate kinases probably with different subcellular localization were recently described and also four different nucleoside diphosphate kinases were identified by our group and the *T. cruzi* genome project (Bouvier *et al.* 2006; Miranda *et al.* 2008). In the specific case of arginine kinase, the evolutionary processes that determined the presence of three different isoforms

in other trypanosomes different of *T. cruzi* and the complete absence of those genes in *Leishmania* remain to be elucidated. In mammalian cells the energy exchange between organella (i.e. mitochondria and nucleus) is sustained by spatial repositioning of organella and the existence of an integrated enzymatic phosphotransfer network constituted by guanidino kinases (creatine kinase), adenylate kinases and nucleoside diphosphate kinases (Dzeja *et al.* 2002). An efficient phosphotransfer network requires the correct subcellular localization of each enzyme. Previous works from our group reported that *T. cruzi* arginine kinase remains mainly in soluble fractions obtained by freezing and thawing followed by centrifugation (Pereira *et al.* 2000). In this work arginine kinase subcellular localization was studied by different approaches, in silico prediction, digitonin extraction and immunofluorescence. In contrast to the genomic data, the existence of a unique 40 kDa enzyme isoform was confirmed by Western Blot analysis. These results could be attributable to mistakes during the preliminary contig assembly or the automatic gene annotation process. *T. cruzi* arginine kinase was localized mainly in unidentified structures, with similar shape and quantity to glycosomes (Figure 4, HK), but with different localization and membrane properties. A similar digitonin extraction pattern and a partial co-localization were observed between arginine kinase and cytosolic markers. Punctuated patterns have been observed in trypanosomatids using different microscopic techniques for several cytosolic proteins. For example, the cytosolic isoforms of malate dehydrogenase from *Leishmania* and *T. brucei*, the farnesyl diphosphate synthase from *T. cruzi* and *T. brucei*, and also an actin-like protein called TcActin, present a similar pattern like arginine kinase (Aranda *et al.* 2006; Leroux *et al.* 2006; Ferella *et al.* 2008; De Melo *et al.* 2008). Recent

1
2
3 studies from our laboratory showed that the localization of arginine kinase could
4
5 be observed as a diffuse or a punctuate pattern (*unpublished observation*). It
6
7 could be hypothesized that different patterns are a consequence of regulatory
8
9 mechanisms acting upon the varying intra- extracellular conditions.
10
11
12
13
14

15 **Acknowledgments**

16
17 We are deeply grateful to Juan Jose Cazzulo, Wilfredo Quiñones, Juan Luis
18
19 Concepción, Cristina Nowicki, Carlos Labriola, Ivan Schumacher, Carolina
20
21 Carrillo, Pablo Gargantini, Wanderley de Souza, Milagros Camara and Esteban
22
23 Erben. This study was supported by Consejo Nacional de Investigaciones
24
25 Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 5492), and Agencia Nacional de
26
27 Promoción Científica y Tecnológica (FONCyT PICT 33431 and FONCYT-PICT
28
29 REDES 2003-00300). C.A.P. is member of the career of scientific investigator of
30
31 CONICET (Argentina), M.R.M. is a research fellow from Fundación YPF and
32
33 L.A.B. and G.E.C are research fellows from CONICET.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

Aranda, A., Maugeri, D., Uttaro, A.D., Oppendoes, F., Cazzulo, J.J., and Nowicki, C. (2006). The malate dehydrogenase isoforms from *Trypanosoma brucei*: subcellular localization and differential expression in bloodstream and procyclic forms. *International Journal of Parasitology* **36**, 295-307.

Barderis, P., Campetella, O., Frasc, A.C., Santome, J.A., Hellman, U., Pettersson, U., and Cazzulo, J.J. (1998). The NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: sequence, genomic organization and expression. *Biochemical Journal* **330**, 951-958.

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A.,

1
2
3 Tivey, A.R., Van, Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B.,
4
5 White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D.,
6
7 Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F.,
8
9 Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville S.E. and El-
10
11 Sayed, N.M. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma*
12
13 *brucei*. *Science* **309**, 416-422.
14
15
16
17

18
19
20 Bouvier, L.A., Miranda, M.R., Canepa, G.E., Alves, M.J. and Pereira, C.A.
21
22 (2006). An expanded adenylate kinase gene family in the protozoan parasite
23
24 *Trypanosoma cruzi*. *Biochimica et biophysica acta* **1760**, 913-921.
25
26
27

28
29 Caceres, A.J., Portillo, R., Acosta, H., Rosales, D., Quinones, W., Avilan,
30
31 L., Salazar, L., Dubourdieu, M., Michels, P.A. and Concepcion, J.L. (2003).
32
33 Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma*
34
35 *cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* **126**, 251–262.
36
37
38

39
40
41 Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I.
42
43 Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de*
44
45 *Medicina Tropical de São Paulo* **12**, 93-100.
46
47
48

49
50
51 Canonaco, F., Schlattner, U., Pruett, P.S., Wallimann, T. And Sauer, U.
52
53 (2002). Functional expression of phosphagen kinase systems confers
54
55 resistance to transient stresses in *Saccharomyces cerevisiae* by buffering the
56
57 ATP pool. *The Journal of biological chemistry* **277**, 31303-31309.
58
59
60

Canonaco, F., Schlattner, U., Wallimann, T. and Sauer, U. (2003). Functional expression of arginine kinase improves recovery from pH stress of *Escherichia coli*. *Biotechnology letters* **25**, 1013-1017.

Cazzulo, J.J. (1994). Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **26**, 157-165.

Cazzulo, J.J., Cazzulo Franke, M.C. and Franke de Cazzulo, B.M. (1989). On the regulatory properties of the pyruvate kinase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *FEMS microbiology letters* **50**, 259–263.

De Melo, L.D., Sant'Anna, C., Reis, S.A., Lourenço, D., De Souza, W., Lopes, U.G. and Cunha-e-Silva, N.L. (2008). Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. *Parasitology* **135**, 955-965.

de Souza W., Carreiro, I.P., Miranda, K. and Silva, N.L. (2000). Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **72(3)**, 421-432.

Denicola, A., Rubbo, H., Haden, L. and Turrens, J.F. (2002). Extramitochondrial localization of NADH-fumarate reductase in trypanosomatids. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **133**, 23–27.

Dzeja, P.P., Bortolon, R., Perez-Terzic, C., Holmuhamedov, E.L. and Terzic, A. (2002). Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10156-10161.

Dzeja, P.P. and Terzic, A. (2003). Phosphotransfer networks and cellular energetics. *The Journal of experimental biology* **206**, 2039-2047.

Ellington, W.R. (2001). Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annual review of physiology* **63**, 289-325.

Ferella, M., Li, Z.H., Andersson, B. and Docampo, R. (2008). Farnesyl diphosphate synthase localizes to the cytoplasm of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei*. *Experimental parasitology* **119**, 308-312.

Leroux, A., Fleming-Canepa, X., Aranda, A., Maugeri, D., Cazzulo, J.J., Sánchez, M.A. and Nowicki, C. (2006). Functional characterization and subcellular localization of the three malate dehydrogenase isozymes in *Leishmania* spp. *Molecular and biochemical parasitology* **149**, 74-85.

Marciano, D., Llorente, C., Maugeri, D., Fuentea, C., Oppendoes, F., Cazzulo, J.J. and Cristina Nowicki. (2008). Biochemical characterization of stage-specific isoforms of aspartate aminotransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* **161**, 12–20.

Miranda, M.R., Canepa, G.E., Bouvier, L.A. and Pereira, C.A. (2006).
Trypanosoma cruzi: Oxidative stress induces arginine kinase expression.
Experimental parasitology **114**, 341-344.

Miranda, M.R., Canepa, G.E., Bouvier, L.A. and Pereira, C.A. (2008).
Trypanosoma cruzi: multiple nucleoside diphosphate kinase isoforms in a single
cell. *Experimental parasitology* **120**, 103-107.

Pereira, C.A., Alonso, G., Ivaldi S., Bouvier L., Torres H. and Flawiá M.
(2003). Screening of Substrate Analogs as Potential Enzyme Inhibitors for the
Arginine Kinase of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of eukaryotic microbiology*
50, 132-134.

**Pereira, C.A., Alonso, G.D., Ivaldi, S., Silber, A.M., Alves, M.J., Torres, H.N.
and Flawia, M.M.** (2003). Arginine kinase overexpression improves
Trypanosoma cruzi survival capability. *FEBS letters* **554**, 201-205.

Pereira, C.A., Alonso, G.D., Paveto, M.C., Flawia, M.M. and Torres, H.N.
(1999). L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma
cruzi*. *The Journal of eukaryotic microbiology* **46**, 566-570.

**Pereira, C.A., Alonso, G.D., Paveto, M.C., Iribarren, A., Cabanas, M.L.,
Torres, H.N. and Flawia, M.M.** (2000). *Trypanosoma cruzi* arginine kinase
characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites.
The Journal of biological chemistry **275**, 1495-1501.

Pereira, C.A., Alonso, G.D., Torres, H.N. and Flawia, M.M. (2002). Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. *The Journal of eukaryotic microbiology* **49**, 82-85.

Figure legends

Figure 1. *Genetic architecture of arginine kinase loci in trypanosomatids.*

Genes flanking arginine kinase loci from different trypanosomatids were predicted by database screening at the GeneDB (<http://www.genedb.org/>) and gene prediction using a BLAST based approach. Gene A: protein phosphatase 2A regulatory subunit (PP2A), B: hypothetical conserved protein 1 (HCP1), C: hypothetical conserved protein 2 (HCP2), and D: ABC transporter gene (ABCT). Dotted lines indicate intergenic regions out of scale, and question marks indicate unknown genome regions. Upper inset: A schematic representation of *T. brucei* arginine kinase isoforms (AK1, AK2 and AK3), NtE: N- terminal extension, CtE: C- terminal extension and PTS1: peroxisomal (glycosomal) targeting signal 1.

Figure 2. *Arginine kinase expression in different stages of the *T. cruzi* life cycle.*

Western blot analyses were performed using a mouse polyclonal anti-*T. cruzi* arginine kinase antibody and samples from *T. cruzi* epimastigotes (E), trypomastigotes (T), amastigotes (A) and a *T. cruzi* 6x his-tagged recombinant arginine kinase (45 kDa) as positive control (R). Samples were obtained from about 10^7 parasites. The Ponceau S stained membrane was also included (right inset).

Figure 3. *Arginine kinase activity and Western Blot analysis of digitonin extracted samples.* A. The experiment was carried out as described under Materials and Methods using *T. cruzi* epimastigotes samples. The measured activities represent the release of the indicated enzyme markers of intracellular compartments (HK, hexokinase; PK, pyruvate kinase; IDH, NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase) and the arginine kinase activity (AK) by selective permeation with digitonin in the range 0-1 mg.mL⁻¹. B. Western blot analyses were performed using mouse polyclonal anti-*T. cruzi* arginine kinase (AK), NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase (GDH), hexokinase (H), cruzipain (CZ) and mitochondrial aspartate amino transferase (AAT) antibodies. Samples were equal amounts of supernatants and pellets from a digitonin extraction in the range 0-5 mg.mL⁻¹.

Figure 4: *Immunofluorescence of T. cruzi arginine kinase.* *T. cruzi* epimastigotes were attached to multiwell slides, fixed, permeabilized and reacted to arginine kinase antibody (column A) and specific subcellular markers (column B): hexokinase antibody (HK), cruzipain antibody (CZ), MitoTracker staining (MT) and NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase antibody (GDH). Arginine kinase preimmune serum was also included (PI). All the slides were also stained with DAPI (column C). Merged images are shown in column D.

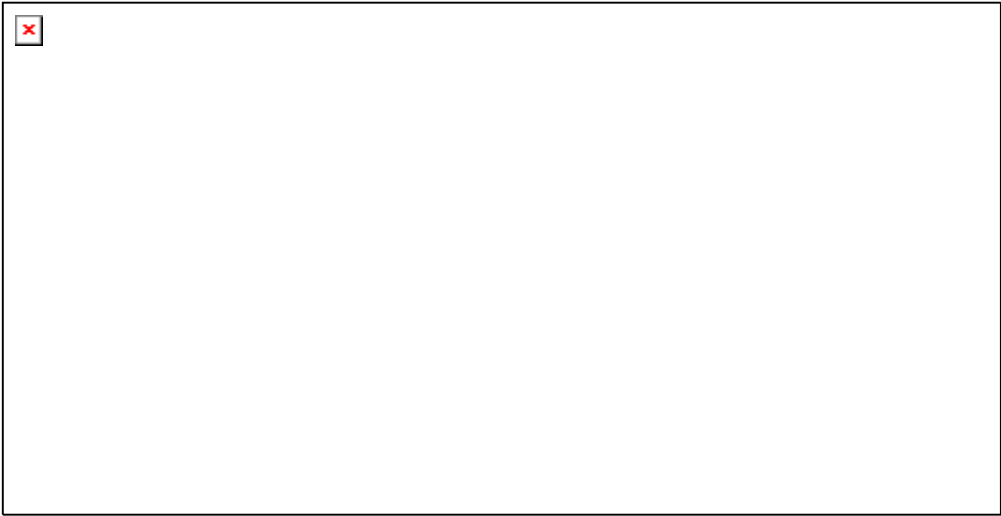


Figure 1. Genetic architecture of arginine kinase loci in trypanosomatids. Genes flanking arginine kinase loci from different trypanosomatids were predicted by database screening at the GeneDB (<http://www.genedb.org/>) and gene prediction using a BLAST based approach. Gene A: protein phosphatase 2A regulatory subunit (PP2A), B: hypothetical conserved protein 1 (HCP1), C: hypothetical conserved protein 2 (HCP2), and D: ABC transporter gene (ABCT). Dotted lines indicate intergenic regions out of scale, and question marks indicate unknown genome regions. Upper inset: A schematic representation of *T. brucei* arginine kinase isoforms (AK1, AK2 and AK3), NtE: N-terminal extension, CtE: N-terminal extension and PTS1: peroxisomal (glycosomal) targeting signal

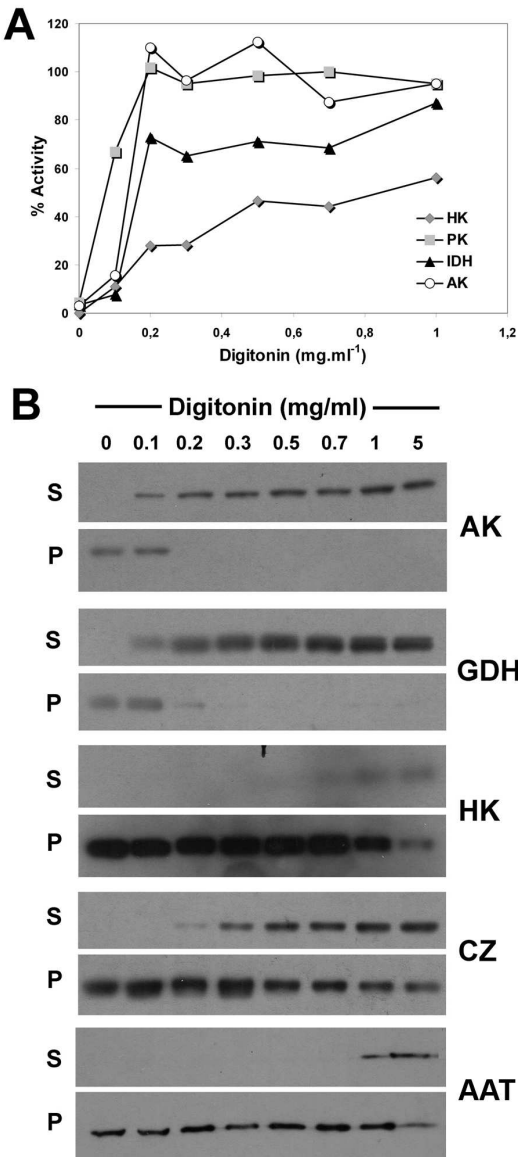
1.

119x61mm (300 x 300 DPI)

Review



Figure 2. Arginine kinase expression in different stages of the *T. cruzi* life cycle. Western blot analyses were performed using a mouse polyclonal anti-*T. cruzi* arginine kinase antibody and samples from *T. cruzi* epimastigotes (E), trypomastigotes (T), amastigotes (A) and a 6x his-tagged recombinant arginine kinase (45 kDa) as positive control (R). Samples were obtained from about 107 parasites. The Ponceau S stained membrane was also included (right inset).
119x55mm (300 x 300 DPI)



Arginine kinase activity and Western Blot analysis of digitonin extracted samples. A. The experiment was carried out as described under Materials and Methods using *T. cruzi* epimastigotes samples. The measured activities represent the release of the indicated enzyme markers of intracellular compartments (HK, hexokinase; PK, pyruvate kinase; IDH, NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase) and the arginine kinase activity (AK) by selective permeation with digitonin in the range 0-1 mg.mL⁻¹. B. Western blot analyses were performed using mouse polyclonal anti-*T. cruzi* arginine kinase (AK), NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase (GDH), hexokinase (H), cruzipain (CZ) and mitochondrial aspartate amino transferase (AAT) antibodies. Samples were equal amounts of supernatants and pellets from a digitonin extraction in the range 0-5 mg.mL⁻¹.
80x175mm (300 x 300 DPI)

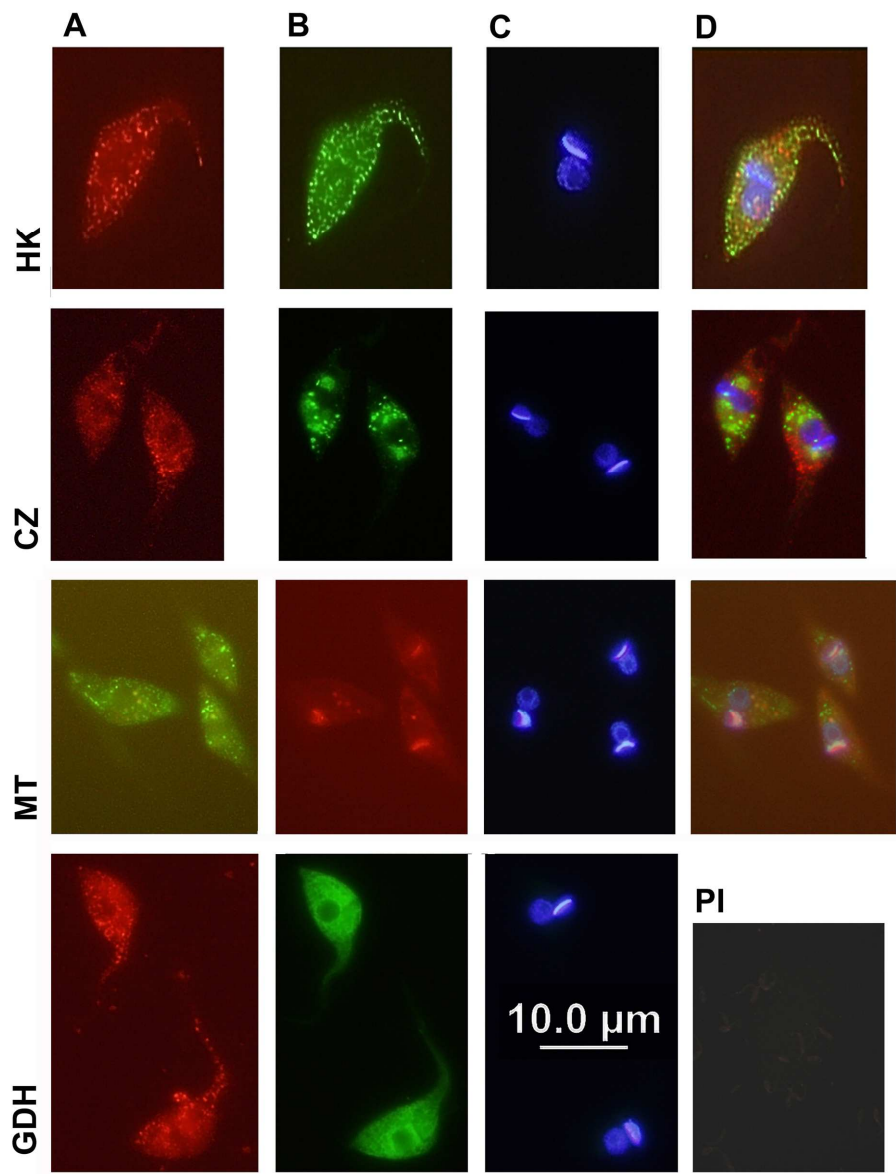


Figure 4: Immunofluorescence of *T. cruzi* arginine kinase. *T. cruzi* epimastigotes were attached to multiwell slides, fixed, permeabilized and reacted to arginine kinase antibody (column A) and specific subcellular markers (column B): hexokinase antibody (HK), cruzipain antibody (CZ), MitoTracker staining (MT) and NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase antibody (GDH). Arginine kinase preimmune serum was also included (PI). All the slides were also stained with DAPI (column C). Merged images are shown in column D.
80x105mm (600 x 600 DPI)