

ε 6/10

UNIVERSIDAD DE GRANADA
25 JUL. 2002
COMISION DE DOCTORADO

Universidad de Granada

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"

C.S.I.C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
25 JUL. 2002
COMISION DE DOCTORADO

**CARACTERIZACIÓN DE DOS CASEÍNA QUINASAS 1 DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 613583165
Nº Copia 15599413

CARMENZA SPADAFORA MEJÍA

Tesis Doctoral

2002

UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA Y
BIOMEDICINA "LÓPEZ-NEYRA", C.S.I.C.

CARACTERIZACIÓN DE DOS CASEÍNA QUINASAS 1 DE *Trypanosoma cruzi*

Directores de Tesis:



Santiago Castanys Cuello



Francisco Gamarro Conde



Memoria presentada por la Lic. Carmenza Spadafora Mejía para optar al grado de Doctor en Bioquímica

por la

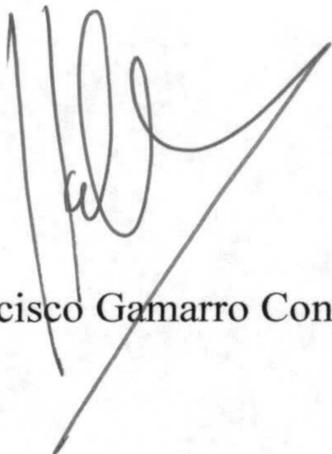
Universidad de Granada

Octubre de 2002

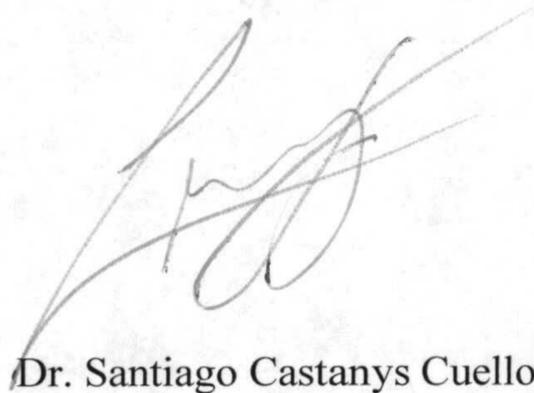
D. FRANCISCO GAMARRO CONDE Y D. SANTIAGO CASTANYS CUELLO,
Científicos titulares del Consejo Superior de Investigaciones Científicas del Instituto de
Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", de Granada,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado "**Caracterización de dos Caseína Quinasas 1 de *Trypanosoma cruzi***" ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (C.S.I.C.) de Granada por CARMENZA SPADAFORA MEJÍA, Licenciada en Ciencias por la Universidad de Eastern Michigan, para optar al grado de Doctor en Bioquímica.



Dr. Francisco Gamarro Conde



Dr. Santiago Castanys Cuello

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

A. La enfermedad de Chagas

A1. Desarrollo y sintomatología

A2. Quimioterapia

B. *Trypanosoma cruzi*: Generalidades

C. Biología molecular de *T. cruzi*

C1. Almacenamiento de la información genética

C2. Procesamiento de la información genética

C2a. Transcripción policistrónica

C2b. Adición del mini-exón

C2c. Poliadenilación

C2d. Regulación de la expresión génica

C2e. Corrección del ADN mitocondrial: "ARN editing"

D. Fosforilación de proteínas

E. La familia de proteínas CK1

E1. Sustratos

E2. Función

E3. Estructura

E3a. Estructura general de las quinasas

E3b. Estructura de las CK1

E3b1. Comparación con otras quinasas

E3c. Sitio de unión a ATP

E3d. Inhibición de las quinasas

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

B. Objetivos específicos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales

A1. Reactivos generales y medios de cultivo

A2. Tampones y soluciones

A2a. Soluciones para electroforesis

A2a1. De ácidos nucleicos

A2a1a. Electroforesis convencional

ADN

ARN

A2a1b. Electroforesis de campo pulsado

- A2a2. De proteínas
 - A2b. Soluciones para extracción de ADN genómico
 - A2c. Soluciones de transferencia de ADN (Southern blots)
 - A2d. Soluciones de transferencia de ARN (Northern blots)
 - A2e. Soluciones de transferencia de proteínas (Western blots)
 - A2e1. Protocolo convencional
 - A2e2. Protocolo Immobilon-P
 - A2f. Hibridación con sondas radioactivas
 - A2f1. Sondas de doble hebra
 - A2f2. Sondas de oligonucleótidos
 - A2g. Sondas utilizadas
 - A2h. Soluciones de deshibridación
 - A2h1. ADN
 - A2h2. ARN
 - A2i. Soluciones de purificación de la proteína recombinante
 - A2j. Soluciones para ensayos enzimáticos
 - A2k. Otras soluciones de uso común
 - A3. Vectores plasmídicos
 - A3a. Vectores de clonaje
 - A3b. Vectores de expresión
 - A3c. Vectores de transfección
 - A4. Líneas celulares
 - A4a. Cepas bacterianas
 - A4b. Cepas de *T. cruzi*
 - A4c. Células
 - A5. Oligonucleótidos sintéticos
 - A6. Genoteca empleada
- B. Métodos**
- B1. Cultivos de *Trypanosoma cruzi* "in vitro"
 - B1a. Cultivo de epimastigotes "in vitro" y clonación
 - B1b. Obtención de tripomastigotes y amastigotes
 - B1c. Criopreservación y descongelación de parásitos
 - B1d. Recuento de los parásitos
 - B1e. Determinación de la inhibición del crecimiento y de la dosis inhibitoria (IC50)
 - B2. Sincronización de cultivos de epimastigotes
 - B2a. Análisis de la sincronización por tinción con PI y citometría de flujo
 - B3. Cultivo y manipulación de bacterias
 - B3a. Cultivo de bacterias

- B3b. Preparación de células competentes
- B3c. Transformación de células competentes
- B4. Rastreo de genoteca de cDNA de la cepa Y de *T. cruzi* en λ ZAP
 - B4a. Infección de bacterias y obtención de placas de lisis.
 - B4b. Transferencia de fagos a filtros de nitrocelulosa
 - B4c. Preparación de bacteriófagos a gran escala
- B5. Aislamiento de ADN
 - B5a. Aislamiento de ADN genómico de parásitos
 - B5b. Excisión "in vivo"
 - B5c. Aislamiento de ADN plasmídico
 - B5c1. Roche High Pure Plasmid Isolation
 - B5c2. Wizard maxiprep
 - B5d. Aislamiento de ARN de parásitos
- B6. Cuantificación de ácidos nucleicos
- B7. Tratamiento enzimático del ADN
 - B7a. Digestión del ADN con enzimas de restricción
 - B7b. Reacción de ligamiento
 - B7c. Tratamiento con fosfatasa alcalina
 - B7d. Marcaje radioactivo del ADN
 - B7d1. Marcaje con dCTPs
 - B7d2. Marcaje con timidina
 - B7d3. Marcaje de oligonucleótidos
 - B7e. Reacción de la transcriptasa reversa
 - B7f. Reacción en cadena de la polimerasa
- B8. Secuenciación del ADN
- B9. Electroforesis de ácidos nucleicos
 - B9a. Electroforesis de ADN en geles de agarosa
 - B9b. Electroforesis en campo pulsado
 - B9b1. Preparación de los bloques de agarosa para CHEF
 - B9b2. CHEF electroforesis
 - B9c. Electroforesis de ARN en geles de agarosa-formaldehído
- B10. Aislamiento de ADN en geles de agarosa: "Gene Clean"
- B11. Transferencia de ADN a membranas de nylon: "Southern blot"
- B12. Transferencia de ARN a membranas de nylon: "Northern blot"
- B13. Hibridación de ácidos nucleicos con sondas radioactivas
- B14. Transfección de *T. cruzi*
- B15. Electroforesis de proteínas: "SDS-PAGE"

- B15a. Obtención de proteínas totales de parásitos
- B15b. Cuantificación de proteínas
- B15c. Electroforesis
- B16. Transferencia de proteínas a membranas de nylon (Western blot) e inmunodetección
- B17. Purificación de proteínas recombinantes
 - B17a. Obtención de proteínas solubles de bacterias transformadas
 - B17b. Preparación de las columnas de afinidad
 - B17c. Purificación en columna de la proteína de fusión
- B18. Ensayos cinéticos
 - B18a. Actividad CK1 en extractos de parásitos
 - B18b. Actividad CK1 en proteína recombinante
 - B18b1. Determinación de la K_m para β -caseína
 - B18b2. Determinación de la K_m para el péptido sustrato
 - B18b3. Determinación de la K_m para ATP
 - B18b4. Determinación de la inhibición con heparina
 - B18b5. Determinación de la inhibición con hymenialdisine, NG-95 y NG-97
- B19. Estudios de la fluorescencia de los transfectantes con colas GFP
 - B19a. Determinación de la fluorescencia por citometría de flujo.
 - B19b. Microscopía
 - B19b1. Preparación de placas de poly-L-lisina
 - B19b2. Fijación de los parásitos
 - B19b3. Microscopía de fluorescencia y confocal
- B20. Análisis informático

IV. RESULTADOS

- A. Aislamiento de los genes CK1 de *T. cruzi*
 - A1. Diseño de la sonda conservada, aislamiento y secuenciación de dos isoformas CK1 de *T. cruzi*
- B. Análisis de la expresión y actividad diferencial de las isoformas TcCK1.1 y TcCK1.2
- C. Análisis de la actividad CK1 durante la replicación de *T. cruzi*
- D. Localización celular de las isoformas CK1 de *T. cruzi*
- E. Análisis de la expresión de las isoformas TcCK1.1 y TcCK1.2 y actividad CK1 en el ciclo celular
- F. Proteína recombinante TcCK1.1
 - F1. Análisis de la expresión de la proteína recombinante TcCK1.1
 - F2. Análisis de parámetros cinéticos de la proteína TcCK1.1
- G. Transfectantes CK1 y CK1/GFP de *T. cruzi*
 - G1. Sobreexpresión de CK1 de los transfectantes
 - G1a. Expresión ARN de los genes CK1 transfectados
 - G1b. Análisis de la sobreexpresión de proteínas CK1 en los transfectantes

- G1c. Análisis de la sobreexpresión de actividad CK1 en los transfectantes**
- G2. Estudio de la sensibilidad a inhibidores**
- G4. Microscopía de transfectantes TeCK1.1 y TeCK1.2 con GFP**

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

A. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

A1. Desarrollo y sintomatología

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una parasitosis localizada en el continente americano, causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* y transmitida por diversas especies de insectos de la familia *Reduviidae* (Chagas 1909).

Actualmente constituye un importante problema de salud pública para la población americana donde alrededor de 90 millones de habitantes de las zonas rurales de la población (25% de la población total) están expuestos al riesgo de contraer la enfermedad, y se estima en aproximadamente 18 millones el número de personas que padecen la enfermedad (WHO 1997).

En humanos, la enfermedad de Chagas presenta dos fases de evolución clínica. Una primera fase aguda que comprende entre los 2 y los 6 primeros meses de infección y se caracteriza por una sintomatología de intensidad y duración variables y por parasitemias de mayor magnitud que en la fase crónica. En la mayoría de los casos esta fase pasa desapercibida, con síntomas leves o inexistentes, mientras que en otros se producen síntomas que van desde un síndrome febril, la aparición de lesiones locales en el sitio de entrada del parásito que reciben el nombre de chagoma cuando es en la piel o "signo de Romanha" cuando es a través de la membrana ocular, o la muerte del paciente en un 2% de los casos.

Estos síntomas desaparecen a los pocos meses y la enfermedad evoluciona hacia una fase crónica con parasitemia baja y asintomática. La enfermedad puede evolucionar hacia una fase crónica, generalmente a los 5-15 años después de la infección. En el 30-40% de los casos se desarrollan síndromes chagásicos (miocardiopatía, megacolon, megaesófago), mientras el resto de los casos desarrolla la forma indeterminada o asintomática. En el caso de aparecer lesiones cardíacas, éstas pueden ser de moderadas a graves, conduciendo a la muerte del enfermo.

A2. QUIMIOTERAPIA

En la actualidad no existe un tratamiento efectivo disponible para combatir la enfermedad de Chagas. El éxito alcanzado por países como Uruguay y Chile en detener la transmisión del parásito (TDR 1994) se debe principalmente al control del insecto mediante insecticidas y por el control de los bancos de sangre, donde el uso

de violeta de genciana ha demostrado ser efectivo en la eliminación de los parásitos de las reservas de sangre (Docampo and Moreno 1990).

El actual tratamiento de la enfermedad se basa en dos fármacos nitroheterocíclicos, el nitrofurano nifurtimox y el 2-nitroimidazol benznidazol. El nifurtimox en condiciones aerobias es rápidamente reducido, y reacciona con el oxígeno para formar radical superóxido (Docampo and Moreno 1990), altamente tóxico por sí mismo y por los subproductos que genera al reaccionar. Se piensa que la actividad tripanocida del nifurtimox se debe a esta producción de superóxido. El benznidazol no estimula la producción de superóxido ni de peróxido de hidrógeno a las concentraciones que inhibe el crecimiento de *T. cruzi* (Moreno, Docampo et al. 1982), y su mecanismo de acción parece ser a través de la unión covalente a macromoléculas (de Castro 1993).

Ambos fármacos tienen una actividad significativa durante la fase aguda de la enfermedad, pero fallan en el tratamiento de la fase crónica. Por tanto, para la mayor parte de los casos no existe un tratamiento eficaz. Por otra parte estos fármacos son altamente tóxicos y producen importantes efectos colaterales (Gorla 1988), (Gorla 1989). Se ha descrito además que la susceptibilidad a ambos fármacos varía según la cepa utilizada (Brenner, Costa et al. 1976); Andrade y col., 1985), así como también la existencia de resistencia natural a ambos fármacos (Filardi and Brenner 1987).

Por ello, el estudio de *T. cruzi* está enfocado en las enzimas que sean esenciales para su metabolismo y en la expresión de ciertos genes; todo en un esfuerzo conjunto para determinar diferencias presentes entre el hospedero y el parásito, las que podrían ser explotadas para el diseño racional de drogas.

B. *Trypanosoma cruzi*: GENERALIDADES

T. cruzi es un protozooario perteneciente a la clase *Zoomastigophora*, Orden *Kinetoplastidae*, Familia *Trypanosomatidae*, Género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*. El Orden *Kinetoplastidae* está definido por la presencia de una mitocondria única que se denomina kinetoplasto. A este orden pertenecen organismos de vida libre y organismos parásitos, mientras que los tripanosomátidos, es decir, aquellos organismos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, son parásitos exclusivamente.

El ciclo de vida de este parásito transcurre entre dos huéspedes, uno invertebrado, el insecto vector, y uno vertebrado, entre los que se han descrito más de 100 especies de mamíferos pertenecientes a diferentes órdenes.

Durante su ciclo de vida *T. cruzi* presenta tres formas principales o estadios, relacionadas con los distintos entornos (Figura A1). Las formas epimastigotas, replicativas, se caracterizan por tener el kinetoplasto

contiguo al núcleo, en su parte anterior, y un flagelo que emerge de la zona media de la célula. Las formas tripomastigotas, no replicativas, presentan una forma alargada con el kinetoplasto en la zona posterior, y un flagelo que si bien emerge de la parte posterior de la célula, permanece unido a ésta por la membrana ondulante en su trayecto desde la extremidad posterior a la anterior, adonde queda libre. Las formas amastigotas, intracelulares y replicativas, son redondeadas, sin flagelo, y con el kinetoplasto cercano al núcleo.

Cuando el insecto vector ingiere sangre del vertebrado (Figura A2), deposita sus heces contaminadas con tripomastigotas metacíclicos que pueden ingresar al torrente sanguíneo a través de un punto de discontinuidad, como por ejemplo la propia herida causada por la picadura. Los parásitos alcanzan el torrente sanguíneo, desde donde pueden invadir varios tipos celulares, principalmente células del sistema fagocítico mononuclear, células musculares y células nerviosas. Una vez dentro de la célula, las formas tripomastigotas se transforman en amastigotas y comienzan a replicarse dentro de la célula hasta hacerla estallar. Unas 12 horas antes de liberarse de la célula, los parásitos comienzan a sufrir una transformación hacia tripomastigotas, que es la forma como circulan por la sangre. Cuando la sangre del huésped vertebrado es ingerida por el insecto vector, los tripanosomas pasan al intestino del insecto, donde se transforman en epimastigotas. Las formas epimastigotas se adhieren a las paredes del intestino medio del insecto, donde se multiplican activamente, y posteriormente migran hacia la ampolla rectal donde se transforman en tripomastigotas metacíclicos. Estos tripomastigotas se eliminarán por las heces, comenzando un nuevo ciclo (Pinto Dias 1991).

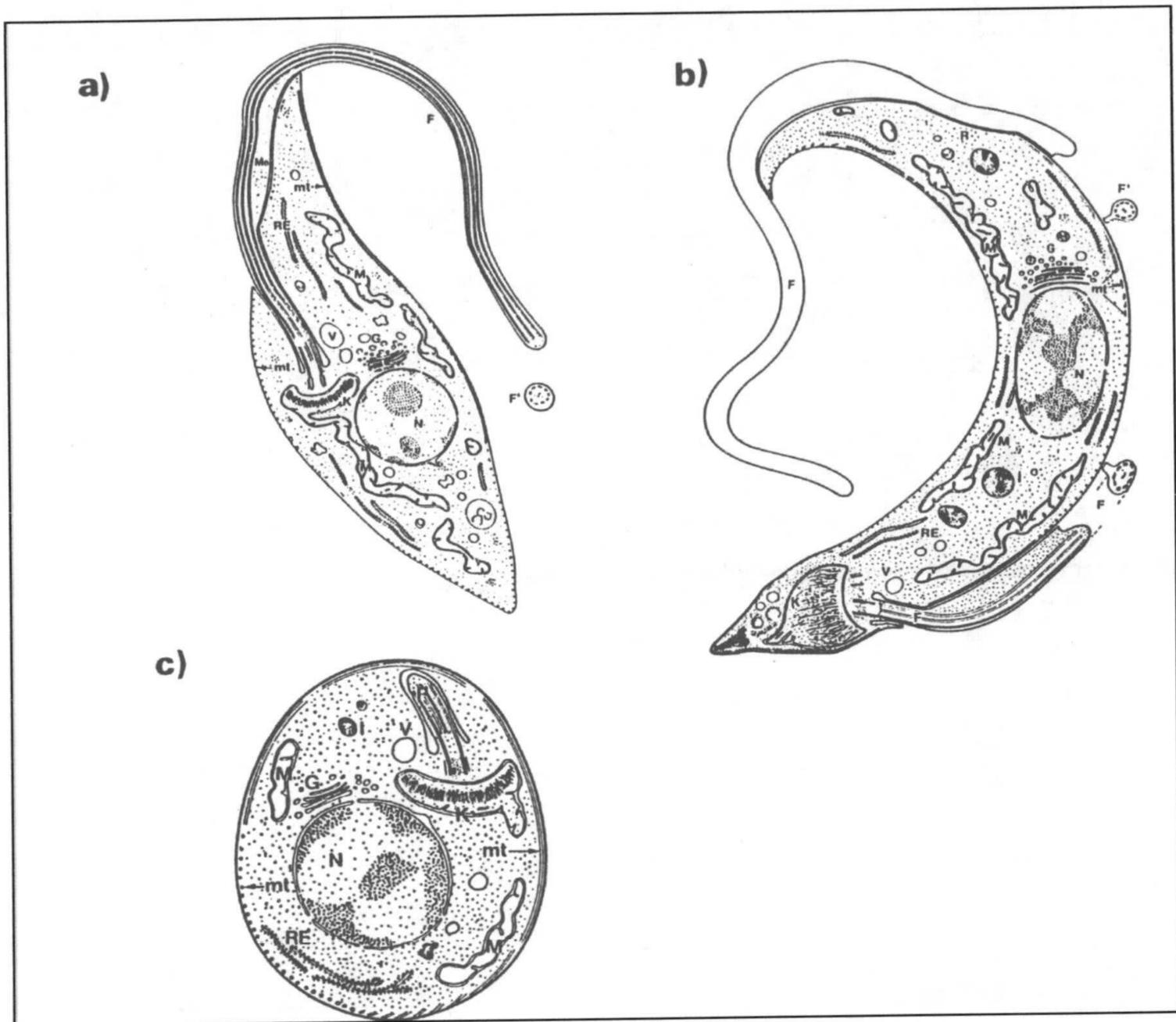


Figura A1. Esquema de la ultraestructura de *Trypanosoma cruzi* a) Formas epimastigotas, b) formas tripomastigotas y c) formas amastigotas. **F**, flagelo; **G**, aparato de Golgi; **N**, núcleo; **RE**, retículo endoplásmico; **K**, kinetoplasto; **M**, prolongaciones del kinetoplasto con doble membrana y crestas mitocondriales.

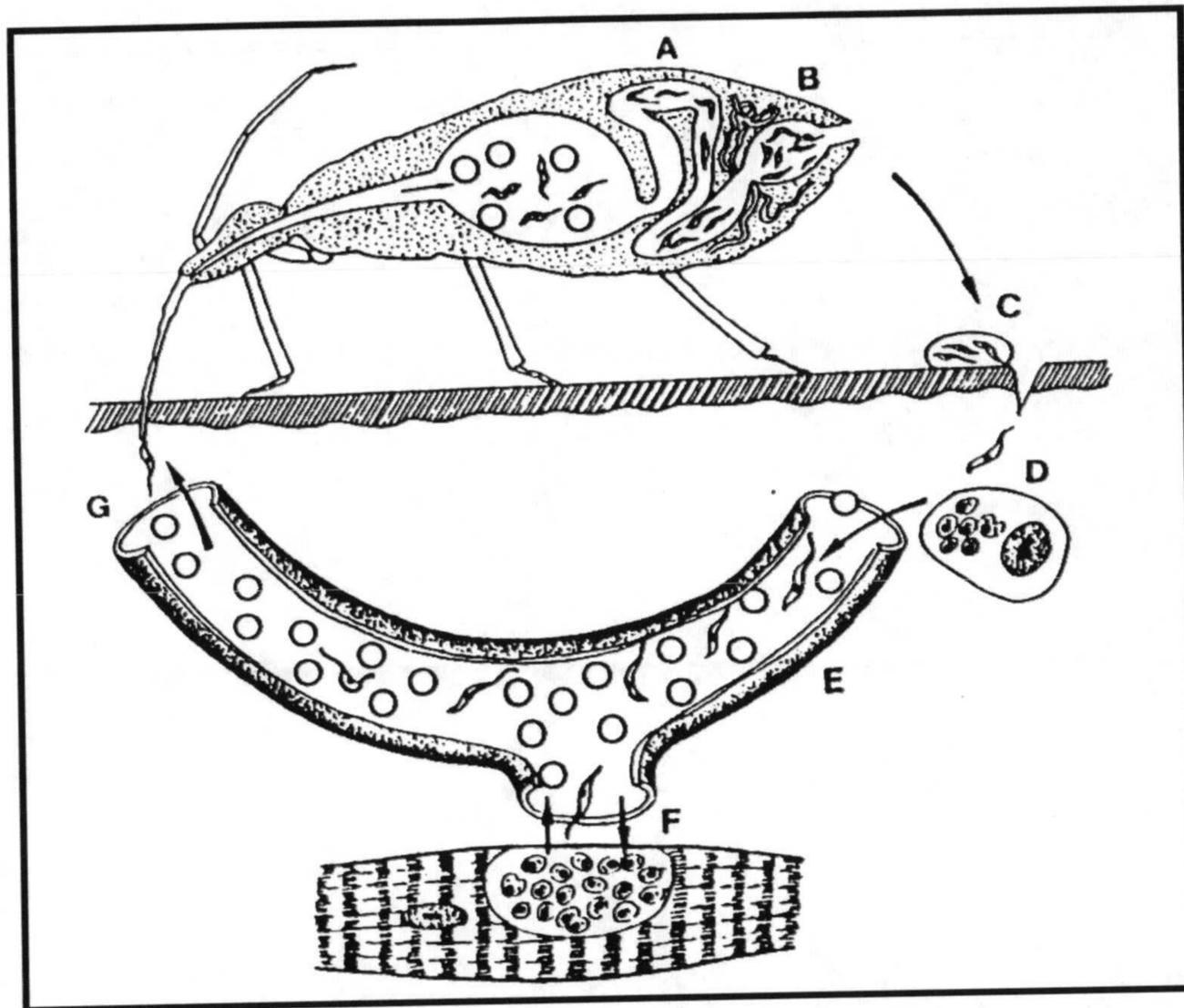


Figura A2. Ciclo vital de *Trypanosoma cruzi*. Los tripanosomas en el estadio epimastigota se replican en el intestino del insecto (A); en la ampolla rectal (B) se transforman en tripomastigotas metacíclicas, que son eliminados por las heces (C); al penetrar en el huésped vertebrado los parásitos invaden células del sistema fagocítico mononuclear cutáneo (D) donde, bajo la forma de amastigotas comienzan a multiplicarse. Al estallar la célula pasan a la sangre como tripomastigotas (E), diseminándose por el organismo e invadiendo músculos y otros tejidos (F). El ciclo se cierra cuando la sangre del paciente es ingerida por el insecto (G), y las formas circulantes llegan al intestino del insecto y se transforman en epimastigotas.

C. Biología molecular de *T. cruzi*

C1. Almacenamiento de la información genética en *Trypanosoma cruzi*.

En la mayoría de los eucariotas, la información genética se puede dividir de acuerdo a su ubicación en nuclear y mitocondrial, lo que implica la presencia de dos genomas. El ADN de los tripanosomátidos se organiza también en nuclear y mitocondrial, pero este último a su vez se subdivide en maxicírculos y minicírculos, de funciones distintas, como veremos más adelante.

El tamaño del genoma de *T. cruzi* ha sido estimado entre 100 y 200 Mb dependiendo del clon estudiado (Henriksson, Solari et al. 1996). Dentro de su genoma, el 51% corresponde a secuencias medianamente repetidas, el 23% a secuencias de copia única y el resto a secuencias altamente repetidas (Castro, Craig et al. 1981). Los genes medianamente repetidos suelen presentar una organización en tándem, pudiendo estar esta unidad de repetición presente en uno o varios cromosomas.

Debido a que la cromatina de *T. cruzi* no se condensa de forma visible durante la mitosis, no se ha podido determinar el número exacto de cromosomas de la especie. La técnica de electroforesis en campo pulsado ha permitido un acercamiento a la organización cromosómica del parásito. Una de las características más notables es el polimorfismo en el tamaño y número de cromosomas entre los distintos clones (Aymerich and Goldenberg 1989); (Henriksson, Aslund et al. 1990), siendo el número de cromosomas superior a 40, con un tamaño de entre 0,45 y 4 Mb (Henriksson, Solari et al. 1996).

La ploidía de *T. cruzi* permanece aún sin aclarar. Los estudios utilizando sondas específicas sugieren diploidía (Henriksson, Aslund et al. 1990), aunque también existen estudios relacionados con el contenido de ADN de parásitos provenientes de un mismo clon, que sugieren aneuploidía (McDaniel and Dvorak 1993).

El ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* constituye el 16-30% del ADN total, y está compuesto por dos tipos de ADN circular, denominados minicírculos y maxicírculos, concatenados entre sí formando una red altamente compleja fácilmente observable al microscopio electrónico (Chen, Rauch et al. 1995).

Los maxicírculos tienen un tamaño de aproximadamente 40 kb, encontrándose en un número de 20 a 50 por kinetoplasto. Contienen los genes codificantes para las proteínas y ARN ribosomales mitocondriales y constituyen el equivalente al ADN mitocondrial de los eucariotas (Simpson 1987). Los minicírculos tienen un tamaño de 1,4 kb encontrándose en un número de alrededor de 30000 por parásito. Estos minicírculos contienen las secuencias codificantes para los ARN guías necesarios para la corrección de los transcritos mitocondriales (Pollard, Rohrer et al. 1990); (Sturm and Simpson 1990); (Stuart 1991); (Simpson and Kretzer 1997).

C2. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION GENÉTICA EN *Trypanosoma cruzi*

C2a. Transcripción policistrónica.

Una de las características de los tripanosomátidos es que los genes no presentan intrones. Por otra parte, estos genes se encuentran organizados en densos grupos a nivel del ADN separados por cortas regiones intergénicas. Estos grupos de genes se transcriben como precursores policistrónicos (Fig. A3) que pueden tener hasta 60 kb (Johnson, Kooter et al. 1987). La transcripción de más de un gen junto con sus regiones intergénicas

se observó por primera vez en el caso del gen 1F8 de *T. cruzi* (Gonzalez, Lerner et al. 1985), observándose posteriormente en otros genes de tripanosomátidos. Esta molécula precursora sufre un proceso de maduración consistente en la adición en el extremo 5' de una secuencia denominada mini-exón y la poliadenilación del extremo 3' (Fig. A3).

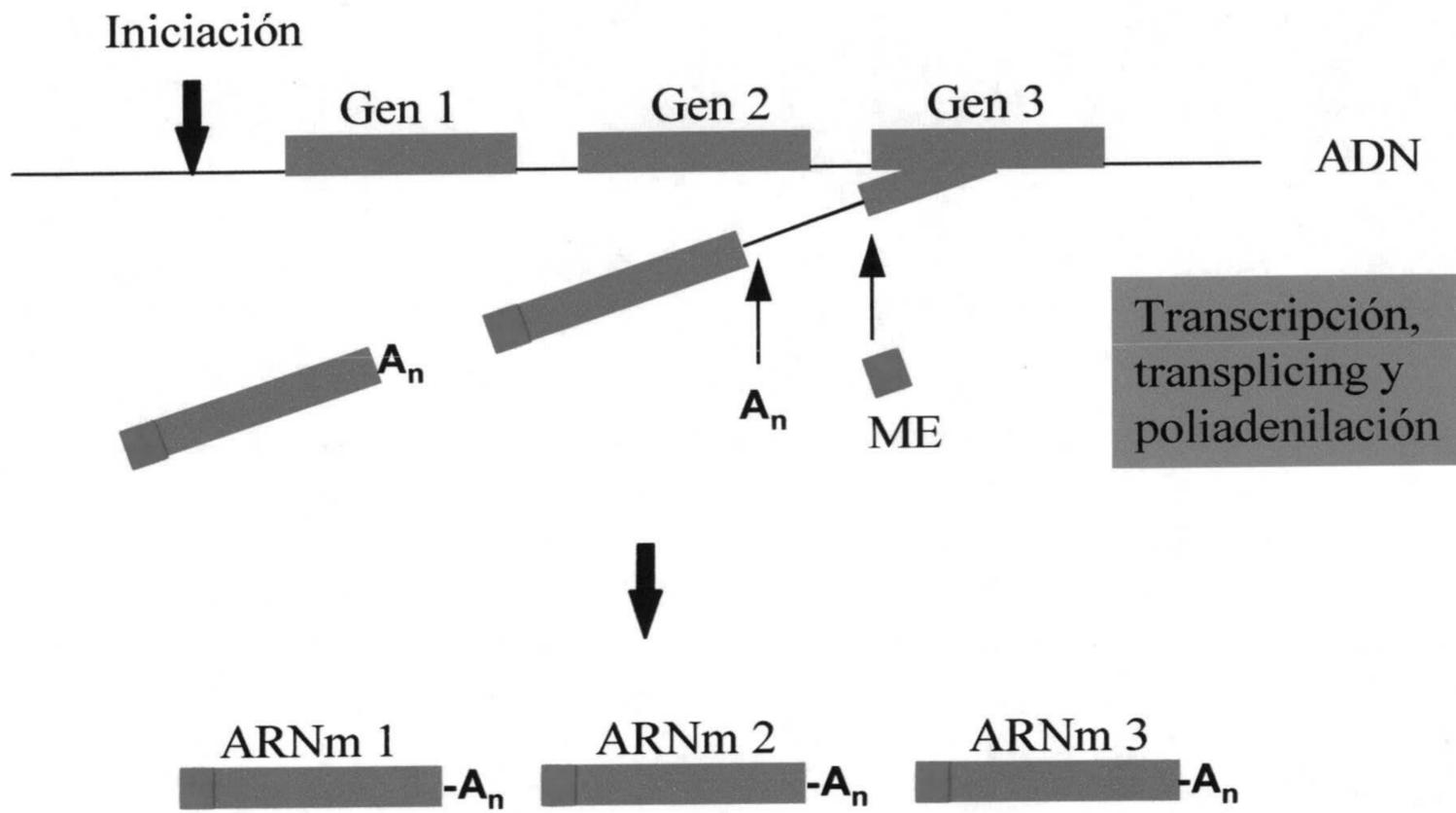


Figura A3. Mecanismo de maduración de ARNm en tripanosomátidos. El pre-ARNm policistrónico es procesado a medida que avanza la transcripción, por adición del miniexón en su extremo 5', y de la cola poli en su extremo 3'.

C2b. Adición del mini-exón.

Todos los ARN mensajeros caracterizados hasta el momento en tripanosomátidos presentan en su extremo 5' una secuencia conocida como mini-exón o "spliced leader" (ME) que en el caso de *T. cruzi* consta de 39 nucleótidos (De Lange 1983). El proceso mediante el cual los mensajeros adquieren este mini-exón se conoce como "trans-splicing", ya que es una reacción intermolecular de procesamiento del ARN por la cual exones de dos moléculas distintas de ARN se unen para formar un ARN maduro. Una de las secuencias, la secuencia líder, de 39 nt, deriva de una molécula mayor, de entre 85 y 140 nucleótidos dependiendo de la especie (Ullu 1996), y se va a unir al ARN mensajero inmaduro por acción de una ligasa de ARN, en un mecanismo similar al del cis-splicing de eucariotas superiores (Figura A4). Este fenómeno ocurre co-transcripcionalmente (Ullu, Matthews et al. 1993) y es necesario para la correcta traducción de los mensajeros; ensayos realizados utilizando oligonucleótidos complementarios a esta secuencia inhiben la traducción de los

mensajeros en *T. brucei*, sugiriendo que todos ellos presentan este mini-exón en su extremo 5' (Cornelissen, Verspieren et al. 1986); (Walder, Eder et al. 1986).

Previamente al proceso de "trans-splicing", el mini-exón adquiere en su extremo 5' una estructura de CAP o caperuza siendo su adición necesaria para el procesamiento del mini-exón (Ullu and Tschudi 1991). En tripanosomátidos la estructura CAP consiste en una 7-metilguanosa más los primeros cuatro nucleótidos modificados por la adición de grupos 2'O-metilo, por lo que se la denomina CAP 4 (Bangs, Crain et al. 1992), a diferencia de eucariotas superiores donde no son más de dos. Su función sería proporcionar estabilidad a los transcritos.

En *T. brucei* el gen que codifica para el mini-exón se encuentra organizado en una unidad de 1,35 kb con aproximadamente 200 copias del gen (De Lange 1983). Este gen produce un transcrito de 140 bases denominado "medARN" que contiene en su extremo 5' la secuencia del mini-exón con la estructura CAP 4. Este "medARN" es quien actúa como donante de la secuencia del mini-exón (Fig. A4) en el proceso de "trans-splicing" (Sather and Agabian 1985).

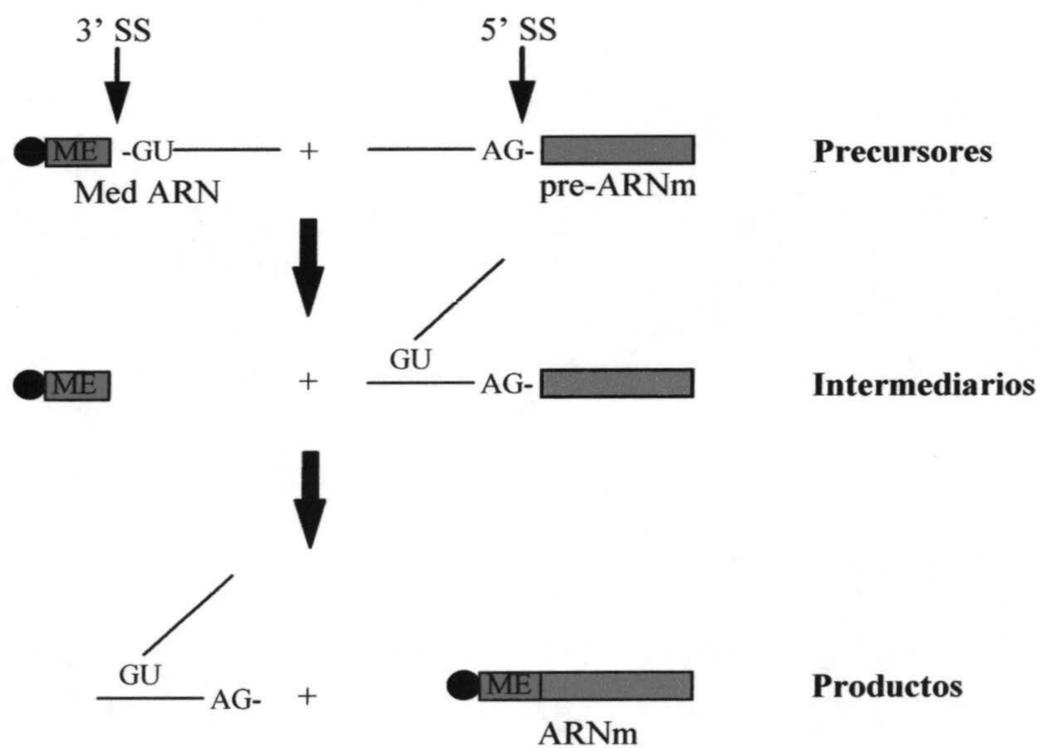


Figura A4. Representación esquemática de los pasos del proceso de transplicing. Los exones se representan como rectángulos y los intrones como líneas. Se indican los dinucleótidos conservados GU y AG. . ME, miniexón; medARN, ARN precursor del miniexón; SS, sitios de splicing. El círculo negro representa la estructura CAP 4.

La adición del mini-exón se produce en un dinucleótido AG localizado corriente arriba del codón de iniciación y a distancias variables (Agabian 1990), y puede estar precedido por un tracto de polipirimidinas. La

maquinaria que participa en el procesamiento de los precursores recibe el nombre de ayustosoma o "spliceosome". Si bien no está completamente caracterizada, se supone que es similar a la descrita en eucariotas superiores donde participan un complejo de proteínas y ARN nucleares de pequeño tamaño.

C2c. Poliadenilación.

La poliadenilación de los ARN mensajeros es un proceso por el cual se añade al extremo 3' de los transcritos una cola constituida por un número variable de adenosinas que se denomina comúnmente como "cola poli A". En tripanosomátidos, el proceso de poliadenilación es similar al de eucariotas superiores e implica la participación de una endonucleasa específica que corta el premensajero en su extremo 3'. Posteriormente, la enzima poli A polimerasa añade los nucleótidos de adenosina utilizando como sustrato el ATP. La adición de esta cola poli A tendría una función reguladora de la expresión génica en tripanosomátidos al determinar la estabilidad de los mensajeros y por lo tanto sus niveles en la célula (Hug, Carruthers et al. 1993).

En eucariotas superiores se ha descrito una secuencia conservada AAUAAA que actúa como señal de poliadenilación (Wahler 1992). En tripanosomátidos no se han encontrado secuencias que puedan estar relacionadas con una señal de poliadenilación. Varios trabajos han demostrado que el proceso de adición del mini-exón y la poliadenilación están acoplados, produciéndose primero la adición del miniexón, y sería la señal del aceptor del mini-exón la que determinaría la poliadenilación del extremo 3' del gen situado corriente arriba (Ullu, Matthews et al. 1993); (LeBowitz, Smith et al. 1993); (Hug, Hotz et al. 1994)

C2d. Regulación de la expresión génica.

La biosíntesis de grandes moléculas de ARN precursoras de ARNm conlleva la pregunta de cómo regulan la expresión los tripanosomátidos. Existen varias evidencias para afirmar que, a diferencia de la mayor parte de los eucariotas, donde el principal punto de regulación es a nivel de la iniciación de la transcripción, en los tripanosomátidos la regulación es co- o post-transcripcional. Una vez sintetizado un ARN policistrónico, los genes para los que codifica pueden ser expresados: (1) con similares niveles, como las calmodulinas o tubulinas (Sather and Agabian 1985); (Tschudi and Ullu 1988), (2) a muy diferentes niveles, como los genes de la glicoproteína variable de superficie VSG (Shea and Van der Ploeg 1988); (Pays, Coquelet et al. 1989), o (3) a niveles que varían enormemente dependiendo del estadio de desarrollo del parásito, como en el caso de la aldolasa (Vijasharaty 1990). Consecuentemente, el determinante primario de la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos es a nivel de las reacciones de procesamiento que ocurren en las regiones intergénicas del pre ARNm. Esto es una diferencia sustancial con la mayoría de los eucariotas, donde el determinante primario de la regulación es a nivel de la iniciación de la transcripción (Maniatis, Goodbourn et al. 1987).

Por otra parte se ha descrito que los genes de *T. cruzi* se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a su uso de codones (Alvarez, Robello et al. 1994). La mayor parte de los genes presentan un uso de codones similar al de *Leishmania* y *Crithidia*, que se caracterizan por un alto contenido en G+C en la tercera posición. Sin embargo, existe un grupo de genes que en la tercera posición presentan un alto contenido en A+T, y estos genes son de baja expresión. Se ha propuesto que esta correlación entre uso de codones y niveles de expresión pueda ser debido a una diferencia de abundancia en los ARNt, y por lo tanto, que este fuera un mecanismo de regulación de los niveles de expresión génica (Alvarez, Robello et al. 1994).

C2e. Corrección del ADN mitocondrial: "RNA editing".

El proceso de corrección de los mensajeros mitocondriales o "RNA editing" es característico de los tripanosomátidos y constituye un sistema de regulación de la expresión de los genes mitocondriales. El proceso consiste en la adición o deleción de uridinas a los transcritos mitocondriales primarios que producen la aparición o el ajuste de los marcos de lectura de los genes mitocondriales (Hadjuk 1993). El proceso de corrección se realiza a través de los llamados ARN guías codificados en los minicírculos. Estos ARN guías se aparean al sitio correspondiente en el transcrito primario, seguido de la formación de un enlace fosfodiéster entre la cola poli U y puntos de apareamiento incorrecto ("mismatch") en la zona complementaria, lográndose de esta manera la complementariedad entre los ARN guías y el premensajero (Simpson and Kretzer 1997).

D. Fosforilación de Proteínas

La fosforilación es la modificación postraducciona l más importante que emplean las células para regular la actividad biológica de sus proteínas. Esta modificación es realizada por las enzimas llamadas proteínas quinasas. Entre los diversos mecanismos de regulación en que participan las proteínas quinasas se encuentran, entre otros, la transducción de señales inducidas por agentes mitogénicos, la transformación oncogénica y el control de la expresión génica, todos ellos íntimamente relacionados con diferenciación y otros procesos fundamentales. La importancia de la fosforilación de proteínas en estos procesos ha impulsado el interés en la identificación y caracterización de las quinasas responsables de la regulación de la proliferación y diferenciación celular.

Las proteínas quinasas conforman la mayor familia de proteínas identificada hasta el momento y consta de más de 400 miembros (Hanks and Quinn, 1991. Hanks and Hunter, 1995). Según el residuo aminoacídico modificado en la reacción de fosforilación, las proteínas quinasas se dividen en serina/treonina quinasas, tirosina quinasas y enzimas que fosforilan ambos tipos de residuos (serina/treonina y tirosina); son las quinasas de especificidad dual. Las serinas/treonina quinasas corresponden al mayor grupo de quinasas identificadas y

muchas de ellas se han relacionado con la transducción de las señales que suceden a los estímulos mitogénicos, conformando cascadas de fosforilación que transducen estas señales al interior de la célula. La fosforilación en residuos de tirosina se observa en un número menor de proteínas que la fosforilación en serinas o treoninas y se relaciona directamente con estímulos mitogénicos, ya que la gran mayoría de estas quinasas se encuentran en el dominio citosólico de los receptores para factores de crecimiento. Las quinasas de especificidad dual corresponden a un reducido grupo dentro de esta familia y se relacionan con importantes puntos de regulación dentro de las cascadas de fosforilación que regulan el ciclo celular. Se debe mencionar la existencia de un grupo de proteínas quinasas llamadas histidinas quinasas, que catalizan la transferencia de grupos fosforilo sobre residuos de ácido aspártico (derivan su nombre de una autofosforilación en histidina durante una etapa intermedia de la catálisis). Estas quinasas están involucradas en sistemas reguladores de bacterias (Hanks and Hunter 1995).

Para que la fosforilación/desfosforilación llevada a cabo por las enzimas sirvan como regulación biológica, éstas necesitan a su vez ser controladas. Muchas quinasas son reguladas por efectores específicos o segundos mensajeros. Así, hay quinasas dependientes de cAMP, de calcio, de cGMP, etc. Otras quinasas son reguladas aparentemente no a través de efectores específicos sino de “efectos dirigidos por los sustratos”, en los que un metabolito dado o un ión metálico se combinan con el sustrato de la quinasa convirtiéndolo en un “mejor” o “peor” sustrato para la quinasa. La fosforilación de un sitio también influye para hacer de otro sitio adyacente un mejor sustrato para una quinasa dada. Las serina/treonina quinasas se han agrupado en subfamilias, varias de ellas según el tipo de segundo mensajero que las regulan, por ejemplo, las dependientes de nucleótidos cíclicos, las dependientes de calcio y fosfolípidos o las dependientes de calcio y calmodulina. Dentro de las serina/treonina quinasas existen algunas que no presentan este tipo de regulación; a este grupo de quinasas independientes de segundos mensajeros pertenecen las proteínas quinasas CK1 y CK2.

CK1 y CK2 (caseína quinasas CKI y CKII) presentan como característica común la capacidad de fosforilar residuos rodeados de aminoácidos ácidos (Tuazon and Traugh 1991) (Issinger 1993). Derivan su nombre del uso tradicional de caseína como sustrato para ensayos *in vitro* y del orden de elución en una columna de DEAE-celulosa.

E. La familia de proteínas CK1

Sobre la base de la estructura primaria de los dominios catalíticos de las proteínas quinasas identificadas, éstas se han ordenado en diferentes grupos dentro de un árbol filogenético (Hanks and Quinn 1991) (Hanks and Hunter 1995). Se ha observado que CK1 y CK2 no pertenecen a la misma familia: CK1 estaría más relacionada con otras quinasas como glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y las quinasas activadas por mitógenos (MAPK). CK1, en cambio, conforma

una subfamilia que ocupa una región única en el árbol filogenético de las quinasas, debido a que existe más de un 50% de identidad entre sus miembros y menos de un 25% de identidad con cualquier otra quinasa conocida.

CK1 es una proteína ubicua, presente en membrana, núcleo, citoplasma, citoesqueleto, y vesículas de las células eucariotas. La caseína quinasa 1 ha sido aislada generalmente como una proteína monomérica con variabilidad en cuanto a su tamaño molecular que va desde 26 hasta 60 kDa debido a la presencia de numerosas isoformas de la familia CK1 codificadas por diferentes genes que también difieren en tamaño. En células mamíferas se han aislado siete isoformas (α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ , and ϵ) (Graves, Haas et al. 1993), (Fish, Cegielska et al. 1995), (Rowles 1991), (Zhai, Graves et al. 1995) y diferentes variantes de procesamiento (“alternative splicing”) (Green and Bennett 1998) En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado cuatro genes, *hrr25*, *YCK1*, *YCK2* y *YCK3* que codifican para proteínas con masas moleculares entre 55 y 62 kDa (Hoekstra, Liskay et al. 1991), (Wang, Vancura et al. 1992), (Wang, Hoekstra et al. 1996). En *Schizosaccharomyces pombe*, cinco genes diferentes han sido caracterizados *hhp1*⁺, *hh2p1*⁺, *cki1*⁺, *cki2*⁺ y *cki3*⁺ (Kearney, Ebert et al. 1994), (Wang, Vancura et al. 1994), (Kitamura and Yamashita 1998) . Uno de estos genes, HRR25, ha sido descrito como un CK1 involucrado en reparación de ADN y control del ciclo celular, ya que mutaciones en este locus inducen una sensibilidad aumentada ante agentes dañinos al ADN. En protozoos parásitos se ha detectado un gen de CK1 en *Plasmodium falciparum* que codificaría para un polipéptido de 37 kDa (Barik, Taylor et al. 1997) y en *Leishmania* se ha detectado una actividad ectoquinasa “CK1-like”, pero todavía no se ha identificado el gen que la produce (Sacerdoti-Sierra and Jaffe 1997)

Dado el alto grado de conservación entre las isoformas de eucariotas superiores e inferiores, es muy probable que los hallazgos sobre la actividad y función de la CK1 se aplicarán a otros miembros de esta subfamilia de quinasas, y que los eucariotas inferiores pueden ayudar a dilucidar el cada vez más interesante papel de CK1 en mamíferos. Las diferencias de las isoformas CK1 de estos dos grupos son, sin embargo, la clave para la búsqueda de posibles tratamientos para las enfermedades que los eucariotas inferiores, como los parásitos, causan.

E1. Sustratos

La proteína CK1, conocida en sus orígenes como glicógeno sintasa quinasa, y posteriormente como caseína quinasa 1, es una familia de quinasas Ser/Thr multipotenciales presentes en todas las células eucariotas. Las CK1 se caracterizan bioquímicamente por fosforilar sustratos específicos *in vitro*, tales como caseína, fosvitina, el péptido sintético D4 y el péptido sustrato específico, CK-1 (Hathaway, Tuazon et al. 1983), (Marin, Meggio et al. 1994). Su especificidad por sustratos está determinada tanto por los grupos ácidos o fosforilo ubicados a 3 ó 4 residuos aminoterminales del residuo diana (Flotow, Graves et al. 1990; Flotow and Roach 1991) y además, por la estructura terciaria del sustrato (Cegielska, Moarefi et al. 1994).

Los sustratos de CK1 están definidos por la secuencia de consenso S/T-X-X-S/T ó S^(P)/T^(P)-X-X-S/T, donde S^(P) o T^(P) indican una serina o treonina fosforilada, X representa a cualquier aminoácido, S/T una serina o una treonina y S/T la serina o treonina susceptible de ser fosforilada por la CK1. Además, fosforila sustratos precedidos por ácido aspártico (D) o glutámico (E) en la posición -3 (D/E-X-X-S/T) (Pulgar, Tapia et al. 1996; Santos, Logarinho et al. 1996), (Flotow and Roach 1991)

Su habilidad para fosforilar una extensa variedad de proteínas celulares le ha valido la clasificación entre las enzimas pleitrópicas o multifuncionales:

espectrina (Tao 1980), neurofilamentos (Fu, Green et al. 1999), miosina (Singh TJ 1982), la proteína de adhesión neural, N-CAM (Mackie, Sorkin et al. 1989), anquirina (Lu, Soong et al. 1985), dineína flagelar (Yang and Sale 2000), troponina T (Singh TJ 1982), la proteína 4.1 (Wei and Tao 1991), actina (Karino, Okano et al. 1999), tubulina (Singh, Akatsuka et al. 1984), la banda 3 (Soong, Lu et al. 1987), la proteína Tau (Singh, Grundke-Iqbal et al. 1995), la proteína-2 asociada a microtúbululos (MAP-2) (Singh, Akatsuka et al. 1984), Kell, una proteína de membrana de los eritrocitos humanos (Carbonnet, Hattab et al. 1998), el receptor muscarínico m-3 (Tobin, Totty et al. 1997), el receptor de insulina (Tuazon, Pang et al. 1985), el receptor de progesterona (Chauchereau, Savouret et al. 1992), DARPP-32 (una fosfoproteína regulada por cAMP y dopamina) (Desdouits, Cohen et al. 1995), calmodulina (Tuazon and Traugh 1991), la fosforilasa quinasa (Singh TJ 1982), receptores β -adrenérgicos (Tobin, Totty et al. 1997), p75 del TNF- α ("Tumor Necrosis Factor") o factor de necrosis tumoral (Beyaert, Vanhaesebroeck et al. 1995), el ligando transmembrana mTNF (Watts, Hunt et al. 1999), el receptor de feromona factor alfa (Ste2p) de *Saccharomyces cerevisiae* (Hicke, Zanolari et al. 1998) el receptor IGF-2 y el inhibidor-2 de fosfatasa (Tuazon and Traugh 1991), sintetisas aminoacil-ARNt (Pendergast and Traugh 1985), factores de iniciación eIF-3, 4B, 4F, 2B y 4E (Tuazon, Merrick et al. 1989) / (Wang, Paulin et al. 2001) and (Haas and Hagedorn 1991), proteínas 60S del ribosoma (Kudlicki, Grankowski et al. 1978), lectina L-29 (Huflejt, Turck et al. 1993), glicógeno sintasa (Ahmad, Camici et al. 1984), prolactina (Oetting, Tuazon et al. 1986), fibrinógeno (Sonka, Kubler et al. 1989), carboxilasa acetil CoA (Tipper, Bacon et al. 1983), partículas de las proteínas mensajeras de los ribonucleótidos (Rittschof D 1982), el antígeno T grande de SV40 (Umphress, Tuazon et al. 1992), elemento responsivo modulador de AMPc (CREM) (de Groot, den Hertog et al. 1993), p53 (Knippschild, Milne et al. 1997), ARN polimerasas I y II (Duceman BW 1981) and RNPm (Dahmus 1981), la glicoproteína viral gpI (Grose, Jackson et al. 1989), la proteína de membrana de levadura, H⁺-ATPasa (Estrada, Agostinis et al. 1996), vesículas del citosol incluyendo pequeñas vesículas sinápticas y proteínas asociadas, particularmente la SV2 (Faundez and Kelly 2000) and (Gross, Hoffman et al. 1995), fosfatidilinositide 4,5 bisfosfato quinasa (Ptds(4)P 5-quinasa) (Vancurova, Choi et al. 1999), PKC (Vila, Walker et al. 1989), proteína de transcripción 14-3-3 (Dubois, Rommel et al. 1997), el inhibidor del factor de transcripción κ B, I κ B α (Cegielska, Gietzen et al. 1998), el factor de transcripción de levadura Swi6 (Sidorova, Mikesell et al. 1995), la kinasa dependiente de ciclina, cdk5 (Sharma, Sharma et al. 1999), la proteína del

complemento, C3 (Ekdahl and Nilsson 1999), el transportador ABC de levadura, Pdr5p (Decottignies, Owsianik et al. 1999), las proteínas reguladoras del ritmo circadiano PER (PERIOD) mPER1, mPER2 y mPER3 (Camacho, Cilio et al. 2001). and (Akashi, Tsuchiya et al. 2002).), BMAL1 y cryptochromes (CRY) (Eide, Vielhaber et al. 2002), el receptor acoplado a la proteína G (“G-coupled receptor”), Gq/11 (Budd, McDonald et al. 2000), las unidades beta3A y beta3B del complejo adaptador AP-3 (Faundez and Kelly 2000), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), beta-PDGFR (Bioukar, Marricco et al. 1999), fibrinógeno (Itarte, Plana et al. 1983), la proteína precursora de la beta-amiloide (betaAPP) (Walter, Schindzielorz et al. 2000), dineína flagelar (Yang and Sale 2000) la proteína de la ruta mitocondrial de la apoptosis, bid (Desagher, Osen-Sand et al. 2001), CEACAM3, un receptor celular que promueve la fagocitosis de microorganismos (Streichert, Ebrahimnejad et al. 2001), el factor de transcripción Ets-1 (Cegielska, Gietzen et al. 1998), el activador transcripcional *Cubitus interruptus* (Ci-155) (Price and Kalderon 2002), la poli(A)-polimerasa (Stetler and Jacob 1985), el domino A del factor de transcripción NF-AT4 (Marin, Burzio et al. 2002), el inhibidor-1 de la proteína fosfatasa-2 (Marin, Meggio et al. 1994), calsequestrina (Salvatori, Furlan et al. 1994), el dominio C-terminal de BACE (beta-site APP cleaving enzyme) (Pastorino, Ikin et al. 2002), el fragmento C-terminal (CTF) de la Presenilina-2 (Walter, Grunberg et al. 1998), la tirosina kinasa p40 (Vila, Payne et al. 1990), la acetiltransferasa citosólica de spermidina/spermina (SSAT) (Bordin, Vargiu et al. 2002), la proteína de unión a beta-galactosida, galectin-3 (Yoshii, Fukumori et al. 2002), la uracilo permeasa de levadura (Marchal, Haguenaer-Tsapis et al. 2000), el regulador de la liberación de neurotransmisores, syntaxin 1-A (Dubois, Kerai et al. 2002), la célula de fibra de la lente, conexina49 (Cheng and Louis 1999), la proteína de la ruta Wng de *Drosophila*, Armadillo (Arm) (Yanagawa, Matsuda et al. 2002), la molécula de adhesión beta-catenina (Liu, Li et al. 2002)

Sólo en pocos casos se ha demostrado la correlación entre la fosforilación y los respectivos cambios funcionales del sustrato. Ejemplos de evidencias sobre su función son los siguientes: La fosforilación de CK1 inhibe la glicógeno sintetasa (Flotow and Roach 1991) y la aminoacil t-ARN sintetasa (Pendergast and Traugh 1985); activa la fosforilasa quinasa (Singh, Akatsuka et al. 1984) y la poli(A) polimerasa (Stetler and Jacob 1985); optimiza la unión del elemento modulador de respuesta cAMP-CREM al ADN (de Groot, den Hertog et al. 1993); y controla el inicio de la replicación de ADN viral de SV40 (Simian Virus 40) (Cegielska and Virshup 1993; Cegielska, Moarefi et al. 1994). Basándose en estos estudios se ha postulado que jugaría un rol importante en el metabolismo celular del ADN (Gross, Simerly et al. 1997).

E2. Función

La familia CK1 se ha dividido en dos grandes grupos, de acuerdo al análisis funcional y de complementación de mutaciones en levadura, las cuales estarían involucradas en la reparación del ADN y en el metabolismo de éste. La mutación de estos genes, HRR25 y YCK3 en *S. cerevisiae* y Hhp1⁺ y Hhp2⁺ en *S.*

pombe producen una hipersensibilidad a agentes dañinos para el ADN, como son rayos X y metasulfonato (DeMaggio, Lindberg et al. 1992), (Dhillon and Hoekstra 1994), (Ho, Mason et al. 1997). Además, HRR25 es requerida para el crecimiento normal y la segregación nuclear (DeMaggio, Lindberg et al. 1992).

Los genes mamíferos que codifican para CK1 δ y CK1 ϵ complementan la delección de HRR25 en levadura, sugiriendo un rol semejante en la reparación del ADN (Hoekstra, Liskay et al. 1991), (Graves, Haas et al. 1993), (Fish, Cegielska et al. 1995), (Kusuda, Hidari et al. 1996).

Un segundo grupo en *S. cerevisiae* codifica para isoformas unidas a membrana. Los productos de YCK1 y YCK2 poseen funciones esenciales en el crecimiento, morfogénesis y división; la pérdida a la vez de ambas funciones es letal (Robinson, Menold et al. 1993). La delección de estos genes son complementados con los genes mamíferos codificantes para CK1 γ (Zhai, Graves et al. 1995). Otras dos isoformas asociadas a membrana, CKI1 y CKI2, son requeridas para el crecimiento vegetativo en levadura (Robinson, Hubbard et al. 1992), (Wang, Vancura et al. 1992).

Otros estudios han propuesto los siguientes roles para diferentes isoformas: *cki1*⁺ y *cki2*⁺ de *S. pombe*, enzimas citoplasmáticas, contribuirían a la regulación de la morfología celular (Wang, Vancura et al. 1994). La CK1 α humana exhibe una localización subcelular dependiente del ciclo celular, incluyendo una asociación con estructuras vesiculares citosólicas durante la interfase, y en el núcleo, en el huso mitótico durante la mitosis. Esta localización subcelular sugiere que CK1 α , como HRR25, juega un rol en la segregación de los cromosomas durante la mitosis y podría ser regulada en el ciclo celular tanto en humanos como en levadura (Brockman, Gross et al. 1992). La CK1 α de *Drosophila melanogaster*, se expresa sólo en hembras adultas y en la embriogénesis temprana; es citoplasmática, sin embargo, luego de la irradiación gamma se relocaliza en el núcleo interfásico. Esto sugiere que la CK1 α estaría asociada a los mecanismos de reparación del ADN durante la embriogénesis temprana (Santos, Logarinho et al. 1996). Sin embargo, CK1 α no rescata el fenotipo de lento crecimiento de las levaduras con delección en HRR25, por lo tanto, poseerían funciones diferentes (Fish, Cegielska et al. 1995).

En otros estudios de CK1 en levadura (Dukowski, Szyszka et al. 1993) se localizaron dos tipos de CK1 de 27 y 45 kDa. La enzima de 45 kDa está presente en el citoplasma celular tanto en las fases de crecimiento logarítmico y estacionario, mientras que la CK1 de 27 kDa se encuentra presente en el núcleo de las células en fase de crecimiento logarítmico, y en el citoplasma en la fase de crecimiento estacionario. Esto indicaría que la CK1 de 27 kDa podría jugar un rol en el control de la división celular mediante el desplazamiento desde el núcleo al citoplasma.

Se ha descrito también que la isoforma CK1 α de oocitos de ratón, de 37 kDa, posee una localización subcelular ciclo dependiente. En el arresto meiótico la enzima se ubica en la membrana plasmática, mientras que en las células en división se encuentra en el núcleo. Así, la CK1 α ejercería una función reguladora y esencial para el inicio y progresión del ciclo celular, a través de cascadas de señales de transducción vía factores nucleares, y en procesos de transcripción y procesamiento de ARN (Hoekstra, Liskay et al. 1991), (Gross, Simerly et al. 1997). Su asociación al huso mitótico, que sugiere un rol potencial en división celular, junto con los resultados descritos arriba hacen relacionar a la CK1 α con la regulación de la progresión del ciclo celular y en el desarrollo temprano en mamíferos (Gross, Simerly et al. 1997).

De acuerdo a los estudios genéticos realizados en levadura, se han formulado las siguientes observaciones generales en relación a la funcionalidad celular de la caseína quinasa 1: las isoformas estarían involucradas en las cascadas de regulación de etapas claves del ciclo celular incluyendo G₀/G₁ y S, daño al ADN y mitosis. Además, la localización subcelular de las isoformas sería crítica en la determinación de sus funciones. Dado el alto grado de conservación entre las isoformas de levadura y eucariotas superiores, estas mismas conclusiones se darían para todos los miembros de la familia CK1 (Gross, Simerly et al. 1997).

En cuanto a los estudios de CK1 en parásitos, aún no está claro si esta enzima podría jugar un rol específico en protozoos parásitos. En el protozoo *Paramecium* se ha identificado bioquímicamente la familia CK1 como una familia de segundos mensajeros donde la enzima jugaría un rol en la regulación de la motilidad ciliar en este protozoo (Walczak, Anderson et al. 1993). Uno de los primeros indicios de actividad quinasa "CK1-like" en parásitos protozoarios fue detectada en glóbulos rojos murinos infectados con *Plasmodium berghei* donde la actividad de la enzima parecía relacionarse con el desarrollo de los parásitos (Wiser, Eaton et al. 1983). Estudios posteriores han detectado que la CK1 fosforila la fosfoproteína 4.1 asociada a la membrana plasmática de eritrocitos infectados con estados trofozoitos-esquizontes de *P. falciparum*, lo cual explicaría un posible mecanismo por el cual este parásito intracelular alteraría las propiedades mecánicas de la membrana plasmática del hospedero, regulando el crecimiento del parásito y la sobrevivencia de éste *in vivo* (Chishti, Maalouf et al. 1994). El gen de CK1 de *P. falciparum* exhibe una expresión estado-específica, además de observarse diferencias en la actividad enzimática a través de los diferentes estados de desarrollo del parásito (Barik, Taylor et al. 1997). Estudios en *T. congolense* y *T. brucei* aportan claros indicios sobre la actividad de un número de quinasas del tipo serina/treonina y patrones de proteínas tirosina-fosforiladas presentes a través del ciclo de desarrollo de este parásito (Parsons, Valentine et al. 1993; Parsons M 1994). Esto sugiere que los cambios en las actividades de fosforilación proteica serían relevantes para el proceso de desarrollo de los trypanosomas africanos (Parsons M 1994). Así pues, las proteínas quinasas CK1 estarían reguladas diferencialmente según los estadios de desarrollo de los parásitos y participarían en la transducción de señales celulares (Barik, Taylor et al. 1997). Podrían jugar un rol pivotal y/o clave en la regulación de la proliferación y diferenciación en parásitos tripanosomátidos. Por lo tanto, el estudio a nivel molecular de la CK1 de *T. cruzi* es fundamental para el

conocimiento y comprensión de los mecanismos bioquímicos críticos para la completación del ciclo de vida del parásito; lo cual permitirá establecer las bases moleculares para el desarrollo de estrategias de control quimioterapéutico en la enfermedad de Chagas.

E3. Estructura

E3a. Estructura general de las quinasas

Todas las proteína quinasas contienen un dominio catalítico estructuralmente conservado, el cual fue dilucidado primero para la quinasas dependientes de AMP cíclico (cyclic AMP-dependent kinase o PKA) (Knighton, Zheng et al. 1991) Varias estructuras cristalinas de proteína quinasas han sido reportadas desde entonces (con más de 170 entradas en el banco de datos de proteínas (PDB) que incluye estructuras de dominios catalíticos y regulatorios) y la organización del dominio catalítico se encuentra ahora bien establecido (Hanks and Hunter 1995). Ésta se compone de dos dominios principales (N- y C- terminales) (Figura 3a) que están a su vez subdivididos en 11 subdominios (codificados a color en la Figura 3b1).

Los dos dominios están conectados a través de un polipéptido (región de unión o "linker"), el cual actúa como una bisagra sobre la cual los dos dominios pueden rotar con respecto al otro cuando se produce la unión del ATP y/o del sustrato. Todas las proteína quinasas contienen un residuo aspártico (D166 en PKA) que ha sido implicado en el mecanismo catalítico: este residuo está localizado en el dominio C-terminal en un "loop" denominado el "loop" catalítico.

Muchas proteína quinasas, pero no todas, requieren ser fosforiladas en uno o más de sus residuos serina, treonina o tirosina localizados en un segmento que va desde el motivo DFG (en el dominio VII) al motivo APE (en el dominio VIII), ambos conservados. Este segmento se conoce como el "loop" de activación o "T-loop" (Johnson LN, Noble ME, and Owen DJ. 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85: 149-58.). La fosforilación de estos residuos en el segmento de activación causa cambios conformacionales en la proteína que llevan a la posición correcta de los residuos catalíticos y de unión a sustrato, junto con una relajación del bloqueo estérico, que permite que el sustrato acceda al sitio catalítico. Las proteína quinasas que no son reguladas por fosforilación tienen otros mecanismos para la localización de sus segmentos de activación sin requerir modificaciones post-translacionales (Johnson and Lewis 2001.). A pesar de que la fosforilación del T-loop es una de las formas en que las kinasas son reguladas, otros mecanismos de control reconocidos hasta el día de hoy incluyen: 1) control ejercido por suunidades adicionales o dominios que pudiesen funcionar en respuesta a segundos mensajeros (p.e. kinasas dependiente de cAMP, PKA, o de Ca²⁺-calmodulina, CadMK, 2) control ejercido por suunidades adicionales cuyos niveles de expresión varien

dependiendo del estado funcional de la célula (p.e. kinasas dependientes de ciclina, CDKs), 3) control ejercido por subunidades adicionales que señalen la quinasa hacia diferentes moléculas o localizaciones subcelulares (p.e. los dominios homólogos 2 y 3 Src, SH2 y SH3, de las kinasas SRC) y 4) control ejercido por dominios adicionales que inhiben la actividad quinasa por medio de procesos autoregulatorios (p.e. la quinasa de la cadena liviana de miosina, MLCK, o también las kinasas Src).

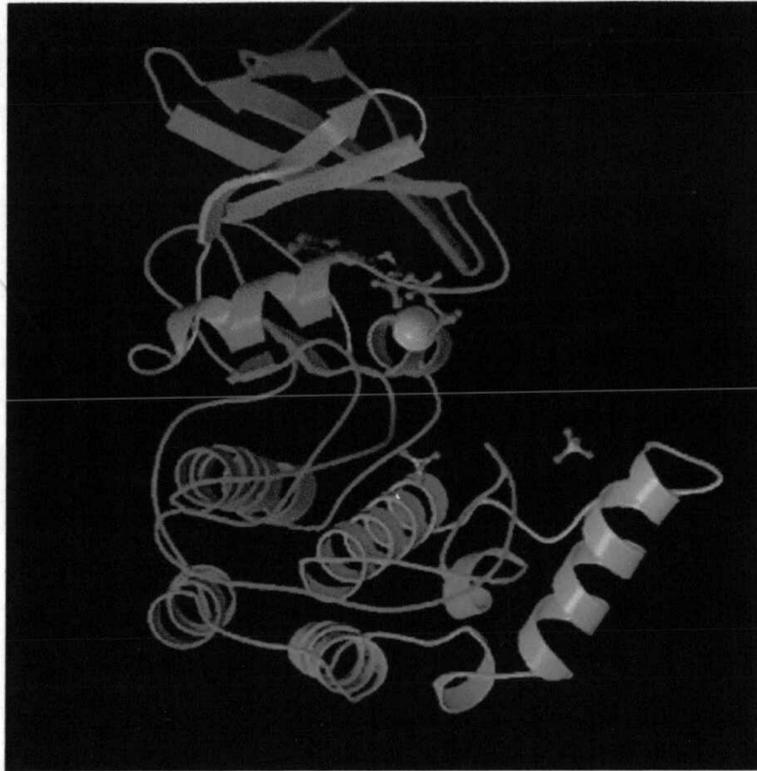


Figura 3a. La estructura cristalina de CK1 de *S. pombe* (Xu et al, 1997) nos permite apreciar los dos principales lóbulos que conforman la estructura tridimensional de esta enzima: un lóbulo dominado por láminas betas (“beta-loop”) y otro dominado por estructuras hélices (“alpha-loop”). En el bolsillo formado por ambos lóbulos se encuentra el sitio de inserción del ATP.

E3b. Estructura de las CK1

E3b1. Comparación con otras kinasas

La conformación de CK1 adherida a nucleótido se parece a las conformaciones “cerradas” de cAPK y Cdk2 cuando están unidos a ligandos (Madhusudan, Trafny et al. 1994) (De Bondt, Rosenblatt et al. 1993). En general, muchos de los elementos de estructura secundaria están arreglados de manera similar en las tres enzimas. Quitando las deleciones e inserciones de estas enzimas en regiones conectoras (linker), ciertos átomos de CK1 pueden ser superpuestos a los de cAPK con mínimas diferencias. Las regiones mejor superpuestas son las que cubren las láminas $\beta 1$ - $\beta 9$, y las hélices αA - αE (Xu, Carmel et al. 1995) (Figura 3b1).

Todos los miembros de la familia CK1 poseen un dominio catalítico de cerca de 300 aminoácidos que, residuo a residuo, comparten más de 50% de identidad de secuencia con los demás miembros. En cambio, la alineación con otras proteína quinasas muestran a lo sumo un 20% de identidad de secuencia (Rowles 1991)

		<---β1--->	<---β2--->	<---β3--->		
CK1δ	MELR	VGNRYRLGRKIGSGSFGDIYLGTDIAAGEEVAIKLECV			GTK	45
Cki1	MSGONNVV+VH·KV·R+E*·*·*V·FE·NLLNNOO·*·*F+PR				RSD	48
cAPK	35/QNTAQLDQFDRIKTLGTGSGFGRVMLVKHKESGNHYAMKILDKQKVVK					81
	:	I	:	II		
		[---αA---]	<---β4--->	<---β5--->	[αB	
CK1δ	HPQ	LHIESKIYKMMQGGVGIP TIRWC GAEGDYNVMVMELL			GPSLED	91
Cki1	A·	+RD*YRT+·LLA·CT·+NVYF+O·LH+·L·ID++			+++++	94
cAPK	LKQIEHTLNEKRILQAVN	FPFLVKLEFSFKDNSNLYMVM EYVAGGEMFS				130
	:	III	IV	V		
		---]	[-----αC-----]	<>β6	<---β7	
CK1δ	LPNFCSRKFSLKTVLLADQ MISRIEYIHSKNFIHRDVKPDNFLMG				LG	139
Cki1	+LDL+G+·*·V+++AMA*K*·LA·VOS·*E·SLVY**I**·*+*+I·RPNS					144
cAPK	HLRRIG	RFSEPHARFYAAQIVLTFEYLHSLDLIYRDLKPENLLIDQ				176
	:	Via	:	Vib		
		<---β8	<---β9	#	[αD-]	
CK1δ	KKGNLVYIIDFGLAKKYRDARTHQH IPYRENK NLTGTARYASINTHLGIE					189
Cki1	·NA·MI·VV**MV*F++PV+K·+++·*K+·*S*·*·*M+·*+*+R+					194
cAPK	QGYIQVTDGFGFAKRVKG				RTWTLCGTPEYLAPEIILSKG	214
	:	VII	:	VIII		
		[-----αE-----]	#	#[---αF-----]	[αG	
CK1δ	QSRRDDLES LGYVLMYFNLGSLPWQGLKAATKRQKYERISEKKMSTPIEV					239
Cki1	++++*+A·*H·F++LR·++++*+·*NK·*·*·*G·*+O·*·LRE					244
cAPK	YNKAVDWWALGVLIYEMAAGYPPFFA				DQPIQIYEKIVSGKVERF	256
	:	IX	:	X		
] [-----αH-----]		[-----αI-----]		
CK1δ	LCKGYPSEFATYLNFCRSLRFD				DKPDYSYLRQLFRNLFHRQGF SY	284
Cki1	+·A·F+E·YK+MHYA·N+A+				AT+·+D·OG+·SKVLE·LNTTE	289
cAPK	P SHFSSDLKDLLRNLLQVDLTKRFGNLKDG VNDIKNHKWFATTDWIAI/					305
	:	XI	:			
CK1δ	DYVFDWNMLKFGASRAADDAERERRDREERLRH/					317
Cki1	+EN·++·L·NN·KGWQSLKSQNAETENQRSSKP/					322

Figura 3b1. Las secuencias de dos proteína quinasas CK1 son alineadas y comparadas con la cAPK. Cki1 es el homólogo CK1 de *S. pombe*, cristalizada (Xu, Carmel et al. 1995), mientras que CK1δ es la forma truncada de la isoforma δ de rata,

también cristalizada. En rojo (*), residuos conservados en la cAPK (kinasa dependiente de AMP cíclico) y en todas las CK1. En rosa (+), residuos conservados en todas las CK1. En verde (●), residuos adicionales conservados entre CK1δ y cki1. Los números a la derecha corresponden a los aminoácidos a partir de la metionina de inicio. Los elementos de la estructura secundaria de CK1 se muestran encima de la secuencia. Se identifican también los dominios conservados I-XII (Hanks and Hunter 1995)

E3c. Sitio de unión a ATP

La molécula de ATP se une en una depresión situada entre los dos principales dominios y se ancla a la enzima a través de enlaces de hidrógeno entre su anillo de adenina y residuos de la región linker, y entre el anillo de ribosa y residuos localizados al principio del dominio C-terminal. El grupo trifosfato es coordinado por dos iones de metal que se encuentran ligado por residuos de Asp y/o Asn localizados en el motivo DFG y en el loop catalítico. Además, las interacciones polares que se dan entre varios residuos del loop rico en glicina, el motivo DFG conservado y el loop catalítico ayudan a estabilizar aún más los fosfatos y el estado de transición que se genera durante la reacción de fosfotransferencia. Contrastando con el bien caracterizado sitio de unión a ATP, las regiones de unión a sustrato de las quinasas son depresiones llanas de la superficie cuyas estructuras son pobremente entendidas y que no han sido utilizadas como dianas de unión a inhibidores. El reconocimiento del sustrato y la alta afinidad de unión se basan parcialmente en los residuos locales, pero en muchos casos ha parecido que cortas secuencias peptídicas no explotan completamente la capacidad de unión ofrecida por las proteínas quinasas. Esto sugiere que las quinasas puedan usar elementos de reconocimiento distantes que probablemente sean importantes para la eficiencia fosforilativa.

E3d. Inhibición de las quinasas

A pesar de que el núcleo catalítico de las proteínas quinasas ha sido evolutivamente conservado (Hanks and Hunter 1995), el mecanismo por el cual cada quinasa es inhibida puede variar considerablemente. Fisiológicamente, por lo menos tres mecanismos de inhibición han sido identificados: un mecanismo de pseudo-sustrato, un mecanismo de mimética de adenina y un mecanismo que incluye el cerrar la enzima en una conformación inactiva mediante el uso de superficies que no están en el sitio activo (Taylor and Radzio-Andzelm 1997). Químicamente hablando, el campo de inhibición de las proteínas quinasas ha estado altamente activo en los últimos 10 años, y hasta la fecha varios principios activos que han sido identificados como inhibidores de quinasas. Dada la naturaleza diferente de los sitios de unión a nucleótido y a sustrato mencionados arriba, mucho del esfuerzo en síntesis de dichos compuestos ha sido dedicado al sitio de unión a ATP, y la gran mayoría de los inhibidores reportados son mimetizadores del ATP (Bridges 2001), (Toledo, Lydon et al. 1999), Dumas J. 2001. Protein kinase inhibitors: emerging pharmacophores 1997-2000. *Exp Opin Ther Patents* 11: 405-29.). En contraste, el sitio de unión a la proteína sustrato no ha sido extensivamente explotado a la hora de del diseño de inhibidores a pesar de que los compuestos que bloqueen

la función enzimática por competición con el sustrato tendrían una ventaja sobre aquellos que mimetizan al ATP, por diferentes razones, incluyendo el hecho de que la alta concentración intracelular de ATP podría reducir la eficacia de la mimetización del ATP, y que los inhibidores competitivos del sustratos seguramente serían más específicos y selectivos.

Los esfuerzos específicos resultantes del diseño de inhibidores basado en las estructuras de las quinasas, a pesar de ser referidos comúnmente como diseño racional basado en estructura, nunca son únicamente el producto de esta metodología, sino más bien una combinación de cristalografía, modelaje, rastreo y esfuerzos de la medicina química. Como tales, quizás sería más apropiado definirlos como diseños asistidos por la estructura. Varios de estos inhibidores, la mayoría dirigidos contra el sitio de unión a ATP, se encuentran actualmente en varios fases de su desarrollo como droga. Las numerosas estructuras en complejo con ATP o con pequeñas moléculas inhibitoras unidas a diferentes proteína quinasas han provisto una clara descripción del bolsillo de unión a ATP y de las similitudes y diferencias que existen dentro de esta region de unión. Ahora resulta claro que hay regiones dentro de dicho bolsillo que no son ocupadas por la molécula de ATP, y que estas regiones muestran diversidades estructurales entre los miembros de la familia de proteína quinasas (Toledo, Lydon et al. 1999). Dada la naturaleza conservada del núcleo activo de las quinasas ellas se presentan como excelentes candidatas para los modelajes basados en homólogos, en los cuales la secuencia de la parte conservada de una nueva quinasa puede ser modelada en un patrón tridimensional. Y mientras más estructuras son determinadas, la fiabilidad del modelaje y las posibilidades de usar este método para el diseño de inhibidores mejorará aún más. Un ejemplo patente de esta metodología es el considerable avance logrado en la búsqueda de inhibidores de las CDKs, involucradas en ciclo celular y dianas potenciales de drogas anti-cancer. Basados en la estructura cristalina de CDK2, (Furet, Zimmermann et al. 2000)/ (Furet, Meyer et al. 2001) construyeron un modelo 3D del bolsillo de unión a ATP de la CDK1 unido a un conocido inhibidor de las CDKs, olomoucine. Este modelo fue posteriormente utilizado para diseñar modificaciones en la molécula que resultaron en el diseño de compuestos varios órdenes de magnitud más potentes que la olomoucina en su poder inhibitorio de la CDK1.

Como conclusión, existen varios ejemplos en la literatura reciente de diseños de drogas basados en estructura, los cuales se apoyan en tener cierto conocimiento de la estructura 3D para diseñar y/u optimizar inhibidores específicos. La mayoría de los estudios usan modelos homólogos, los cuales solamente pueden aproximarse a las estructuras dianas pero que están cada vez volviéndose más y más fiables a medida que el número de estructuras cristalinas de quinasas son resueltas. De esta forma, el modelaje 3D de la CK1 de *Trypanosoma cruzi* contribuye a extender las posibilidades del diseño racional de potenciales inhibidores de dicha quinasa, en espera de futuras posibilidades en esta dirección, ya que está claramente ilustrado el poder del diseño basado en estructura en el descubrimiento de nuevas moléculas inhibitoras de estas enzimas.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL: Las caseína quinasas 1 constituyen una de las familias más antiguas y conservadas de las proteínas quinasas. Las CK1 se han identificado como proteínas pleiotrópicas capaces de realizar funciones tan diversas como participación en señalización, regulación de metabolismo y regulación de la transcripción. Sus funciones en algunas levaduras han resultado ser vitales. Hasta ahora en parásitos se ha estudiado un homólogo en *Plasmodium falciparum* y más recientemente se ha purificado parcialmente una CK1 en *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, no se han aislado ni caracterizado el o los genes responsables de su actividad en este último parásito. Nos planteamos identificar, clonar y analizar molecularmente el gen o genes de la familia Caseína quinasa 1 de *T. cruzi* para posteriormente estudiar la función de la enzima por medio de análisis en extractos parasitarios y en transfectantes CK1.

Nuestro estudio pretende esclarecer el papel de la enzima en el organismo protozoo y de esta manera contribuir al conocimiento y comprensión de los procesos celulares, en el ámbito molecular, del parásito *T. cruzi*; con ello coadyuvaremos en el desarrollo de una quimioterapia racional para la enfermedad de Chagas.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar parcialmente el gen o genes de la CK1, utilizando ADN genómico de *T. cruzi*.
2. Aislar, clonar y secuenciar el o los genes de la CK1 de *T. cruzi*.
3. Determinar las diferencias y similitudes del gen CK1 de *T. cruzi* en relación a la secuencia génica descrita en otros organismos
4. Caracterizar molecularmente el o los genes CK1 de *T. cruzi*
5. Clonar el gen o genes de la CK1 de *T. cruzi* en vectores de expresión heteróloga.
6. Obtener proteína recombinante CK1 de *T. cruzi* y analizar parcialmente sus propiedades bioquímicas.
7. Analizar la actividad CK1 en extractos de parásitos con respecto a su funcionalidad y localización.
8. Clonar el o los genes CK1 de *T. cruzi* en vectores de expresión homóloga y conseguir transfectantes que sobreexpresen CK1.
9. Probar el efecto de inhibidores de la CK1 en los transfectantes CK1 de *T. cruzi*.
10. Analizar la localización subcelular de el o los genes CK1 de *T. cruzi* por microscopía de fluorescencia.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales

A1. Reactivos generales y medios de cultivo

Los reactivos químicos utilizados fueron de las siguientes casas comerciales: Sigma, Panreac, Riedel de Haën, Bio-Rad, Probus, Serva, Boehringer Mannheim, Merck, Difco y Schirck Laboratories.

Se utilizaron enzimas de restricción suministradas por Boehringer Mannheim, Promega y Amersham; Fosfatasa alcalina, Taq polimerasa y lisozima de Boehringer Mannheim; T4 ADN ligasa de Promega; proteinasa K, ARNsa y ADNsa de Sigma. AMV retrotranscriptasa de Pharmacia. Los desoxinucleótidos utilizados fueron de Boehringer Mannheim.

Los desoxinucleótidos marcados radioactivamente, desoxicitidina-5'-trifosfato [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (3000 Ci/mmol) fueron suministrados por Dupont. Para purificar las sondas radioactivas se utilizó Sephadex G-50 (Pharmacia). El [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (5000 Ci/mmol) y la [^3H]timidina (25 Ci/mmol) fueron suministrados por Amersham/pharmacia.

Para la electroforesis en geles de agarosa se empleó agarosa Sea-Kem de FMC. Los bloques de ADN para electroforesis en campo pulsado (CHEF) se prepararon con agarosa de bajo punto de fusión de Bio-Rad. Los marcadores de tamaño de ADN utilizados fueron ADN del fago lambda y ØX174 cortados con *Hind*III y *Hae*III, respectivamente, de Promega. El marcador de tamaño de ARN fue el ARN ladder también de Promega. Los filtros de nitrocelulosa y las membranas de nylon Hybond-N[®] para transferencia de ácidos nucleicos fueron de Amersham Corp.

Para las purificaciones de proteínas recombinantes se utilizaron columnas de resina de Ni²⁺-ácido nitrilotetra-acético (Ni²⁺-NTA), de Quiagen.

Para hacer los geles de SDS-PAGE, se utilizó SDS, acrilamida, bisacrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida), TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina), y persulfato amónico de Bio-Rad. Los marcadores de tamaño de proteínas utilizados fueron los standards de Bio-Rad. Las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon-P para Western-blot fueron de Millipore. La transferencia se realizó en un aparato Semi-Phor TE70 (Hoefer Sci. Inst.).

Para los ensayos enzimáticos se utilizó el péptido sustrato específico de CK1 de Sigma. [Este consiste de la secuencia aminoacídica RRKDLHDDQQDQAMSITA.

Otros compuestos utilizados fueron:

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato Boehringer Mannheim/Roche.

BSA: Albumina de suero bovino. Boehringer Mannheim/Roche.

DAPI: 4',6-Diamidina-2'-phenylindole dihydrochloride

DMSO: Dimetilsulfóxido. Sigma Chemical Co.

DTT: Ditioneitol. Sigma Chemical Co.

Gdn-HCl: Hidrocloruro de guanidina. Sigma Chemical Co.

Imidazol: Sigma Chemical Co.

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalacto-piranosido Boehringer Mannheim/Roche.

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol de Sigma. Se prepara un stock a 5 mg/ml en PBS y se filtra. Se almacena a 4°C hasta un máximo de 2 semanas.

NBT: Cloruro de azul de nitrotetrazolio de Boehringer Mannheim/Roche.

N-lauril-sarcosina: Sigma Chemical Co.

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro, de Sigma Chemical Co. Se disuelve en metanol a una concentración de 100 μ g/ml.

Otras antiproteasas: Antipaina (se prepara a 2 mg/ml en agua), Aprotinina (se prepara a 10 mg/ml en agua) y Leupeptina (preparado a 2 mg/ml en agua), Sigma Chemical Co. Pepstatina A (preparado a 1 mg/ml con isopropanol), Boehringer Mannheim/Roche.]

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -galactopiranosido de Boehringer Mannheim/Roche.

Se utilizaron los kits: Random Primed de Boehringer Mannheim, High Pure Plasmid Isolation kit de Boehringer Mannheim/Roche, Wizard Maxipreps de Promega, GeneClean de Qiagen y ECL de Amersham farmacia.

Ampicilina: Sigma Chemical Co. Se disuelve en agua.

Tetraciclina: Se disuelve en etanol. Sigma Chemical Co.

Geneticina (G418): Gibco. Se disuelve en el medio en el que se va a utilizar

En los casos en los que el fármaco no se disuelve en DMSO o etanol, la esterilización se llevó a cabo por filtración a través de membranas con tamaño de poro de 0,2 μ m.

β -caseína: Sigma Chemical Co. Se prepara a 50 mg/ml con Hepes 50 mM, pH 7,8.

Himendialdisina, NG-95 y NG-97 (Inhibidores de CK1): Provistos por Dr. Laurent Meijer y Dr.

Nathanael Gray (CNRS, Roscoff y San Diego, CA)

Heparina: Sigma Chemical Corp. Se prepara a 0.15 μ g/ μ l en agua.

Anticuerpo secundario conjugado a Hrp: Dakko

Ditioneitol (DTT): Sigma Chemical Co.

Los reactivos para los medios de cultivo fueron de las siguientes casas comerciales y preparados de las siguientes formas:

LIT (Liver Infusion Tryptose): NaCl 4 g, KCl 0.4 g, Na₂HPO₄ · 7H₂O 15 g, glucosa 2 g, infusión de hígado 3 g (Difco), triptosa (Difco or Oxoid) 5 g, hemina* (Sigma) 2%, agua hasta 1 litro pH 7,2; el RPMI 1640, el HANK's y el SBF, de la casa Gibco, Middlesex, U.K. El sistema de filtración de 0,2 μ M para esterilizar fue de VacuCap™, Gelman Science. Los frascos de cultivo fueron de la casa Falcon. El isotón® II fue de Coulter. Los reactivos para el LB y otros medios bacterianos fueron de Difco.

* La hemina puede ser disuelta en trietanol-amina o hidróxido de sodio, para obtener soluciones de 50 mg/ml. parte de células centrifugadas.

** Se puede añadir suero de ternera, de buey y fetal bovino. Pueden surgir problemas con ciertos lotes, así que se recomienda siempre chequear con anterioridad. Suele haber menos problemas con el suero de ternera y con el fetal, pero estos son más caros.

RPMI 1640 + 20% SBF: RPMI 1640, 16,64 g; CO_3HNa , 3,2 g; gentamicina, 80 mg; agua bidestilada para alcanzar 1.600 ml. Añadir 400 ml de SBF.

Medio NZY líquido: NZ amina 10 g, NaCl 5 g, casaminoácidos 1 g, extracto de levadura 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g y agua destilada hasta 1 litro, pH 7,5.

Medio NZY agar: medio NZY líquido más bacto agar al 1,5 %.

Medio NZY top agarosa: medio NZY líquido más agarosa al 0,7%.

LB líquido: bactotripton (Difco) 1%, NaCl (Merck) 1% y extracto de levadura (Difco) 0,5% en agua bidestilada pH 7,5 y esterilización por autoclavado.

LB agar: añadir Bacto Agar (Difco) al 1,5% a la solución anterior y distribuir en placas de Petri.

A2. Tampones y soluciones

A2a. Soluciones para electroforesis.

A2a1. De ácidos nucleicos

A2a1a. Electroforesis convencional

Tampón de carga para 6x: azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

ADN:

TAE 10x: Tris-HCl 0,4 M pH 7,2, EDTA 50 mM pH 8,0. El pH se ajusta a 7,2 con ácido acético glacial.

ARN:

Tampón MNE 10x : MOPS 0,2 M, acetato sódico 0,05 M, EDTA 10 mM, pH 7,0.

Agua tratada con DEPC: Pirocarbonato de dietilo al 0.1% en agua bidestilada tratada durante una noche antes de autoclavar.

Tampón de corrida: MNE IX en agua de DEPC.

A2a1b. Electroforesis de campo pulsado

Tampón para bloques: EDTA 0,5 M pH 9,0, n-lauril-sarcosina 1%, proteinasa K 1 mg/ml.

TBE 10x: Tris-HCl 89 mM pH 8,3, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM.

Tampón de lavado: EDTA 0,2 M pH 8,0.

A2a2. De proteínas

Tampón de lisis ("Urea Cracking Buffer"): Na₂HPO₄ 10 mM, β-mercaptoetanol 1%, SDS 1%, urea 6 M, pH 7.

Tampón de muestras: 2x (Tris-HCl 0,135 M pH 6,8, SDS 6%, glicerol 20% y β-mercaptoetanol 10%).

Tampón de corrida: Tris-HCl 0,15 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%, pH 8,3.

Acrilamida-Bisacrilamida: acrilamida 0,3 g/ml, bisacrilamida 8 mg/ml. Filtrado.

Tampón separador: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4 %. Se ajusta el pH a 8,8 con HCl y se filtra.

Tampón concentrador: Tris-HCl 0,5 M, SDS 0,4 %. Se ajusta el pH a 6,8 con HCl y se filtra.

Persulfato de amonio: 100 mg/ml. Filtrado.

A2b. Soluciones para extracción de ADN genómico

Cloroformo isoamílico: cloroformo más alcohol isoamílico en proporción 24:1.

Fenol: saturado y equilibrado con Tris 0,1 M pH 8,0 más hidroxiquinoleína al 0,1%.

Fenol Sevag: fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1.

A2c. Soluciones de transferencia de ADN (Southern blots)

Solución Depurinizante: HCl 0,25 M.

Solución Desnaturalizante: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M.

Solución Neutralizante: Tris-HCl 0,7 M pH 7,2; NaCl 1,5 M.

Tampón 20x SSC: NaCl 3 M; citrato sódico 0,3 M pH 7,2

A2d. Soluciones de transferencia de ARN (Northern blots)

Además del tampón 20X SSC:

Solución Desnaturalizante: NaOH 50 mM

Solución Neutralizante: Tris-HCl 0,1 M pH 7,5

A2e. Soluciones de transferencia de proteínas (Western blots)

Rojo de Ponceau (Sigma): Diluido 1:10 en agua destilada.

Solución de lavado: BSA 0,1%, Tween-20 0,1%, en TBS 1X (TBS: Tampón Tris salino: NaCl 0,14 M; KCl 2,6 mM; Tris base 25 mM).

A2e1. Protocolo convencional

Solución de transferencia: Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,15 M, metanol 20%, pH 8,1- 8,4.

Solución de bloqueo: PBS 1x, 5% de leche desnatada y una punta de espátula de azida sódica (PBS:

Tampón fosfato salino: NaCl 0,14 M; KCl 2,6 mM; KH_2PO_4 2 mM; Na_2HPO_4 , pH 7,4).

Tampón fosfatasa: Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1M, MgCl_2 5 mM.

Solución de revelado: 10 ml de tampón fosfatasa, 50 μl de azul de nitrocloruro tetrazolium (NBT, 100 mg/ml), 37,5 μl 5-bromo-4-cloro 3-indolil fosfato (BCIP, 50 mg/ml).

Tampón de parada: Tris-HCl 1 M pH 7,5, NaCl 4 M, EDTA 20 mM.

A2e2. Protocolo Immobilon-P

Tampón Ánodo I: 0.3 M Tris, 10% metanol, pH 10.4

Tampón Ánodo II: 25 mM Tris, 10% metanol, pH 10.4

Tampón cátodo: 25 mM Tris base, 40 mM glicina, 10% metanol, pH 9.4

A2f. Hibridación con sondas radioactivas.

ADNss: Disolver ADN de esperma de salmón en agua a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. Calentar a 100 °C durante 10 min. Fragmentar pasándolo varias veces por una aguja, alicuotear y almacenar a -20°C.

A2f1. Sondas de doble hebra

Denhardt's 50x: BSA (seroalbúmina bovina) 1%, ficoll 1%, polivinilpirrolidona 1%. Filtrar en papel Whatman 0,4 μm .

Solución de hibridación: formamida desionizada 50%, Denhart's 5x, SSC 5x, EDTA 5 mM, ADNss 200 $\mu\text{g/ml}$ desnaturalizado.

Solución de lavado I: 2X SSC + 0.5% SDS

Solución de lavado 2: 2X SSC + 0.1% SDS.

Solución de lavado 3 y 4: 0.1X SSC + 0.5% SDS

Solución de lavado 5: 0.1X SSC

A2f2. Sondas de oligonucleótidos

Solución de hibridación: 0.1 M Tris, pH 8; 0.1% SDS; 6X SSC; ADNss 200 µg/ml desnaturalizado.

Solución de lavado: 0.1 M Tris, pH 8; 0.1% SDS; 6X SSC

A2g. Sondas utilizadas

β-tubulina de Trypanosoma cruzi. cedida por el Dr. Antonio González (C.S.I.C., Granada), clonada en PUC-13. El fragmento de 500 pb se extrae mediante digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*.

18S de *Leishmania infantum.* Obtenida en nuestro laboratorio mediante PCR, utilizando oligonucleótidos frente a la secuencia del gen que codifica para el ARNr 18S previamente descrita (Looker y col., 1988). Clonada en pGEM-T. Por digestión con *PstI* y *NcoI* se obtiene un fragmento de 1.800 pb.

CK1 conservada. Sonda de 603 pb obtenida por PCR usando los oligonucleótidos *CK1 conservada sense* y *antisense*.

Sonda1.1: Sonda específica que reconoce sólo la isoforma CK1 de baja copia, *TcCK1.1*, en *T. cruzi*. El fragmento de 250 pb se obtiene mediante PCR con los oligonucleótidos 1.1PCRSonda5' y 1.1PCRSonda3'.

Sonda1.2: Sonda específica que reconoce la isoforma *T. cruzi* CK1 repetida en tándem. El fragmento de 350 pb se obtiene mediante PCR con los oligonucleótidos 1212-3 y 1212-4.

A2h. Soluciones de deshibridación

A2h1. ADN

Solución 1: 0.4 M NaOH

Solución 2: 0.1 M SSC; 0.2 M Tris, pH 8; 0.1% SDS

A2h2. ARN

Solución de deshibridación: 0.1X SSC; 1% SDS; 40 mM Tris-HCl, pH 7.8; 50% formamida.

Solución de lavado: 0.1X SSC; 1% SDS; 40 mM Tris-HCl, pH 7.8

A2i. Soluciones de purificación de la proteína recombinante

Buffer de lisis: 50 mM Hepes, pH 7,8; 1 mM PMSF; 0.7 µg/ml pepstatina A y 5 µg/ml de leupeptina, aprotinina, y antipaína

Solución lisozima: Lo mismo que el tampón descrito antes pero adicionando lisozima 1 mg/ml.

Solución de equilibrado: 50 mM Hepes pH 7,8; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; y 10% glicerol.

Solución de lavado: 50 mM HEPES pH 7,8; 0.7 M NaCl; 10% glicerol; 40 mM imidazol; 2 mM β-2-mercaptoetanol y 0,05% Triton X-100.

Solución de elución: 50 mM HEPES, pH 7,8; 300 mM NaCl; y 10% glicerol.

A2j. Soluciones para ensayos enzimáticos.

HEPES: Se prepara a 50 mM, pH 7.8, en agua.

DTT: Se prepara a 37.5 mM.

ATP: se prepara a 500 µM.

MgCl₂: se prepara a 60 mM.

A2k. Otras soluciones de uso común

Tampón de dilución de fagos SM: NaCl 0,1 M; Tris-HCl 50 mM pH 7,4; MgSO₄ 10 mM.

Tampón TBE 10x : Tris-HCl 89 mM pH 8,3; ácido bórico 89 Mm; EDTA 2 mM.

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM.

Tampón HBS: HEPES 21 mM; NaCl 137 mM; KCl 5 mM; NaH₂PO₄ 7 mM; glucosa 6 mM, pH 7,4.

A3. Vectores plasmídicos

A3a. Vectores de clonaje

pBluescript KS II +/- (Stratagene): Vector utilizado para el subclonado y secuenciación de fragmentos de ADN.

pGEM-T (Promega): Vector diseñado para el subclonado y secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR.

A3b. Vectores de expresión

pQE-30 (Pharmacia): Vector utilizado para la expresión de polipéptidos como proteínas fusionadas a 6 histidinas en el extremo amino terminal.

pET-28a (Novagen): Vector utilizado para la expresión de polipéptidos como proteínas fusionadas a una cola escindible de 6 histidinas en el extremo amino terminal.

pET-22b(+) (Novagen): Vector utilizado para la expresión de polipéptidos como proteínas fusionadas a un péptido líder en el extremo N-terminal que posibilita su exportación al periplasma, y 6 histidinas en el extremo C-terminal.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

25 JUL. 2002

COMISION DE DOCTORADO

A3c. Vectores de transfección

pRIBOTEX: Vector derivado de pTEX (Kelly y col., 1992) en el cual la región *gapdh* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) de *T. cruzi* corriente arriba ha sido reemplazada por una región de ADN que incluye un *tsp* (sitio de origen de transcripción) para el rARN. Aparte de estos cambios, el vector pRIBOTEX mantiene el sitio *neo* (que confiere resistencia a la geneticina (G418) flanqueado por las regiones intergénicas del tándem formado por las dos copias del gen *gapdh* y la secuencia corriente abajo del mismo gen (Martínez-Calvillo, et al. (1997))

A4. Líneas celulares

A4a. Cepas bacterianas

Todas las cepas empleadas han sido de la especie *Escherichia coli*.

SOLR: Para la excisión in vivo del vector LamdaZap con el bacteriófago R418. Genotipo $e14^-(mcrA)$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 171, *sbcC*, *recB*, *recJ*, *umuC::Tn5(kan^r)*, *uvrC*, *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1*, λ^R [F' *proAB*, *lacI^qZAM15*+ Su⁻ (nonsuppressing)].

DH5 α : Para la transformación y propagación de los insertos clonados en los plásmidos pBluescript KS II y pGEM-T. Genotipo F' ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR* *recA* 1 *end A1* *hsdR* 17 (*r_k⁻*, *M_k⁺*) *supE44* λ *thi-1* *gyrA96* *rel A1* (GibcoBRL).

XL1-Blue (Bullock y col.,1987): Para la transformación y propagación de los insertos clonados en los plásmidos pBluescript KS II, pGEM-T y pQE-30. Genotipo: *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi-1*, *supE44*, *hsdR17*, *relA1*, *lac⁻*, [F' *proAB⁺*, *lacI^q*, *lac* Δ M15, Tn10(*tet^r*)].

M15[pREP4] (Qiagen): Para la expresión de proteínas clonadas en el vector pQE30. Genotipo: *NaI^s* *Str^s* *rif^s*, *lac⁻* *ara⁻* *gal⁻* *mtl⁻* F' *recA⁺* *uvr⁺*.

BL21(DE3) (Novagen): Para la expresión de proteínas clonadas en el vector pET-22b(+). Genotipo: *F ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) dcm gal I* (DE3).

C41(DE3): Derivado de BL21 (DE3). Contiene λ (DE3) codificando la T7 ARN polimerasa integrada en su genoma. La mutación de esta cepa no ha sido identificada pero parece mejorar la inducción del vector pET-22b⁺ (Miroux and Walker 1996).

A4b. Cepas de *T. cruzi*

La caracterización de las cepas de *T. cruzi* se ha basado en los siguientes datos: morfología, estructura antigénica, desarrollo en animales de laboratorio, desarrollo en los vectores, desarrollo en los tejidos, análisis de isoenzimas y otros análisis bioquímicos. Además de la clasificación por zimodemas (ver introducción), una clasificación general las divide en dos grupos: *T. cruzi I* (de ciclo salvaje) y *T. cruzi II* (de ciclo humano/doméstico).

CL-Brener: *T. cruzi II*. Clon derivado de la cepa CL (Brener 1963) de *T. cruzi*, aislado de *Triatoma infestans* en Rio Grande do Sul, Brazil, cuando Zigman Brener y MES Pereira lo obtuvieron de la sangre de ratones infectados con la cepa CL parental. En 1994, cuando se lanzó el Proyecto Genoma de *T. cruzi*, este clon fue escogido como el clon/cepa representativo de *T. cruzi*. Se estima que su contenido de ADN es de 35 Mb, distribuidas sobre un estimado de 35 pares de cromosomas "homólogos". Probablemente la mayoría o todos sus cromosomas son diploides, pero difieren en tamaño. El clon CL-Brener presenta todas las características importantes de *T. cruzi*: a) aislado de un vector estrictamente domiciliario, b) se diferencia en medio líquido, c) es capaz de infectar monocapas celulares, d) es parasitario preferente de las células del corazón y musculares, e) en ratones, presenta curvas de parasitemia y mortalidad definidas, f) muestra una clara fase aguda en humanos infectados accidentalmente, y g) es altamente sensible a las drogas utilizadas clínicamente contra el mal de Chagas. Pertenece al grupo I de zimodemas. Su velocidad de duplicación es baja por lo que en este proyecto se ha utilizado como indicador de actividad de proteínas implicadas en replicación.

Y: *T. cruzi II*. Aislada en humanos en fase aguda en São Paulo, Brazil. (Silva 1953). Con una velocidad de duplicación alta, su uso es complementario al de la cepa CL-Brener para el caso arriba explicado.

A4c. Línea celular

Células Vero: Células fibroblastoides de riñón de *Cercopithecus aethiops* (mono verde africano, número ATCC: Referencia CRL-1586).

A5. Oligonucleótidos sintéticos

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>Uso</i>
CK1 conservada sense	sense: CT(G,C)CT(G,C)GG(C,G)CC(G,C)TC(G,C)CT(G,C)GA	Obtención por PCR Sonda CK1
CK1 conservada antisense	antisense: TT(G,C)AG(C,G)CCCTGCCA(G,C)GG(G,C) AG	Obtención por PCR Sonda CK1
1112-1 antisense	gcattttgtggaagttgcagc	Secuenciación
1112-2 antisense	cgcttcggtcaggcattttg	Obtención de cDNA
1112-6 antisense	GCGTCTCTAGCGATGAAGAC	Verificación de la secuencia con oligo interno
1112-7 antisense	ATGCGCGCAATCATCTGCTC	Verificación del extremo 5' de la secuencia
CK1.1pET22-5 sense	<u>ctggatcc</u> ATGAACCTAATGATTGCAAACAG	PCR para clonar TcCK1.1 en sitio BamHI de pET22b(+)
CK1.1pET22-3 antisense	<u>acaagctt</u> ATTGTTAGACAATTCTTTCTCTTC	PCR para clonar TcCK1.1 en sitio HindIII de pET22b(+)
1.1PCRSonda5' sense	ctattacaaccacaaatac	Obtención por PCR Sonda específica TcCK1.1
1.1PCRSonda3' antisense	TGACTAATGCAATACCTG	Obtención por PCR Sonda específica TcCK1.1

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>Uso</i>
<i>ECOGFP1 sense</i>	<i>caatggaattcATGAACCTAATGATTGCAAAC</i>	<i>PCR para clonar en sitio ECORI de pRIBOTEX</i>
<i>HINDGFP1 antisense</i>	<i>cgtcaagcttCTAATTGTTAGACAATTCTTTC</i>	<i>PCR para clonar en sitio HindIII de pRIBOTEX</i>
<i>1.1GST3 antisense</i>	<i>ctagaattcCTAATTGTTAGACAATTCTTTCTC</i>	<i>PCR para clonar TcCK1.2 en sitio EcoRI vector pGEX-2T</i>
<i>OLI-TcCK1.1</i>	<i>GACTAATGCAATACCTGTTTGCAATCATTAGGTTCA</i>	<i>Sonda específica TcCK1.1 para uso en southern transfectantes.</i>
<i>Miniexon sense</i>	<i>cgctattattgatacagtttctg</i>	<i>PCR para clonación cDNA</i>
<i>1212-1 antisense</i>	<i>gtgggacgtccaaagacgtc</i>	<i>Verificación final de secuencia</i>
<i>1212-2 antisense</i>	<i>cagtagcgcgtacggagaag</i>	<i>PCR para obtención sonda específica 1.2</i>
<i>1212-3 sense</i>	<i>CTGAAGGCGGAGGGGTC</i>	<i>PCR para obtención sonda específica 1.2</i>
<i>1212-4 antisense</i>	<i>GGGTGTAGTTGAGGTACG</i>	<i>Oligo interno para verificación de secuencia</i>
<i>1212-5 sense</i>	<i>GGCACAAACATACAGACG</i>	<i>Oligo interno para verificación de secuencia</i>
<i>1212-6 sense</i>	<i>ggtaggagtgaacgtcacac</i>	<i>Obtención clon ADN por PCR</i>
<i>1212-7 antisense</i>	<i>CACAGAAGCTGAAGAGGTC</i>	<i>Oligo externo para verificación del extremo 5' de la secuencia</i>
<i>1212-8 sense</i>	<i>GTATTTCTTGCGTGGCTCAC</i>	<i>Oligo externo para verificación del extremo 5' de la secuencia</i>

Nombre	Secuencia 5'-3'	Uso
<i>CK1.2pQE30-5 sense</i>	ctggatccATGAGCTTAGAGCTTCGAG	PCR para clonar TcCK1.2 en sitio BamHI de pQE-30, pET-28a y pGEX-2T
<i>CK1.2pQE30-3 antisense</i>	acaagcttCTACGCCTGCTCTACATC	PCR para clonar TcCK1.2 en sitio HindIII de pQE-30 y pET-28a
<i>CK1.2pET22-5 sense</i>	ctggatccgATGAGCTTAGAGCTTCGAGTG	PCR para clonar TcCK1.2 en sitio BamHI de pET22b (+)
<i>CK1.2pET22-3 antisense</i>	acaagcttCGCCTGCTCTACATCCCCC	PCR para clonar TcCK1.2 en sitio HindIII de pET22b (+)
<i>ECOGFP2 sense</i>	cagtgaattccATGAGCTTAGAGCTTCGAG	PCR para clonar TcCK1.2 en sitio EcoRI de pRIBOTEX
<i>HINDGFP2 antisense</i>	cgtcaagcttCTACGCCTGCTCTACATC	PCR para clonar TcCK1.2 en sitio HindIII de pRIBOTEX
<i>BAMGFP- sense</i>	gctacggatccATGGTGAGCAAGGGC	PCR para clonar GFP en sitio BamHI de pRIBOTEX
<i>ECOGFP- antisense</i>	caatggaattCTTGTACAGCTCGTCCATG	PCR para clonar GFP en sitio EcoRI de pRIBOTEX
<i>ECOGFPs antisense</i>	caatggaattTACTTGTACAGCTCGTCC	PCR para clonar GFP con stop en sitio EcoRI de pRIBOTEX

Las letras minúsculas corresponden a secuencias no codificantes que flanquean los genes, o no presentes en el ADN genómico y que fueron agregadas para introducir sitios de restricción, que aparecen subrayados. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados en el "Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos" del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (CSIC), Granada.

A6. Genoteca empleada

λ ZAP (Stratagene) cDNA *T. cruzi*: elaborada por el Dr. Carlos Robello (Facultad de Medicina, Univ. De la República de Montevideo, Uruguay).

B. Métodos

B1. Cultivos de *Trypanosoma cruzi* "in vitro"

La manipulación de los parásitos se llevó a cabo en cabinas de flujo laminar vertical AV-10 de Telstar S.A., Cytair 125 y Supcris Model A. de Equipments Scientifiques et Industriels S.A. Flufrance.

B1a. Cultivo "in vitro" de formas epimastigotas

Para el cultivo de las formas epimastigotas se empleó el medio líquido LIT (Castellani 1967), suplementado con un 10% v/v de suero bovino fetal inactivado a 50°C, durante 30 min, y esterilizado por filtración a través de membranas de 0,2 µm de poro. El cultivo se realizó en frascos estériles de 25 cm² a partir de un inóculo inicial de 4x10⁶ células/ml, a la temperatura de 28°C y en agitación de 70 rpm en agitador Heidolph Unimax 2010. Con objeto de mantener los cultivos en fase logarítmica de crecimiento se realizaban las resiembras cuando el número de parásitos/ml era aproximadamente de 3 x10⁷ parásitos/ml. El recuento celular se realizó utilizando un Coulter Counter, modelo Z1.

Los transfectantes se mantienen continuamente en presencia de 500 µg/ml de Geneticina (G418), para mantener los elementos extracromosómicos que contienen los genes TcCK1.1, TcCK1.2, TcCK1.1/GFP, TcCK1.2/GFP, así como los controles pRIBOTEX y pRIBOTEX/GFP.

B1b. Obtención de tripomastigotes y amastigotes

La obtención de formas tripomastigotas se realizó mediante la infección "in vitro" de células Vero. Se partió de cultivos en monocapa de células Vero crecidos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, en frascos de 75 cm², con medio RPMI suplementado con bicarbonato de sodio 0,22%, suero bovino fetal al 10% para crecimiento y al 5% para mantenimiento. Todos los cultivos contenían estreptomicina 0,1 mg/ml y penicilina 100U/ml. Cuando las células alcanzan confluencia se infectan con tripomastigotas a una densidad de 200.000 parásitos/cm² y se incuban a 37°C. A los días 5, 6 y 7 post infección, se recogieron los sobrenadantes que contenían las formas tripomastigotas emergidas por roturas celulares. Se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min, y se incubaron a 37°C por 2 horas en un incubador de CO₂, para permitir que las formas tripomastigotas (móviles) emergieran del sedimento. Se recogieron los sobrenadantes que contienen los tripomastigotas purificados. El precipitado tiene una mezcla de tripomastigotas y amastigotas que se resuspenden en medio LIT con 10% SBF y se incuban a 37°C por 48 h para que todos los tripomastigotas contaminantes se viren a formas amastigotas. Es entonces cuando se recolectan los amastigotas.

B1c. Criopreservación y descongelación de parásitos.

La criopreservación se realiza con cultivos en fase logarítmica a los cuales se les adiciona un 10% de glicerol. La temperatura se reduce de forma escalonada hasta llegar a -80°C y por último se almacenan en nitrógeno líquido.

La descongelación de los parásitos se lleva a cabo de un modo rápido introduciendo el vial a descongelar en un baño a 37°C . Posteriormente, los parásitos son centrifugados a 1000 g durante 10 min para eliminar los restos de glicerol y el sedimento celular se resuspende en 4 ml de medio de cultivo para iniciar su cultivo a 28°C .

B1d. Recuento de los parásitos.

Los experimentos que requieren recuento celular se realizan siempre por duplicado. Se utilizó un contador celular Coulter counter modelo Z1, diluyendo 100 μl del cultivo de parásitos, previamente homogenizado, en 9,9 ml de medio isotón II (Coulter).

B1e. Determinación de la inhibición del crecimiento y de la dosis inhibitoria (IC50).

Las células fueron cuantificadas al final de cada experiencia mediante el ensayo MTT. El método se basa en que las deshidrogenasas mitocondriales convierten el sustrato MTT, soluble y amarillo, en el producto formazán, insoluble y de color púrpura. La cantidad de producto formado depende del número de células y de la viabilidad de las mismas, y es cuantificado espectrofotométricamente tras solubilizar los cristales de formazán (Mosmann 1983). Por duplicado y en un volumen de 0.1 ml de medio de cultivo se inocularon 12×10^6 parásitos/ml en presencia de distintas concentraciones de los inhibidores. Los cultivos se hicieron en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Nunc), y se incubaron durante 48 h a 28°C . Al cabo de este tiempo, se añadieron 10 μl de MTT (5 mg/ml), y se incubó 4 h a 28°C con agitación suave. Las células se lisaron, y los cristales de formazán se disolvieron, añadiendo 50 μl de SDS 20% e incubando en oscuridad a 37°C durante 4 h. La reducción del MTT se determinó leyendo la D.O.₅₄₀ en un lector de ELISA, tras añadir 10 μl de etanol en el caso de que se hubiesen formado burbujas en los pocillos. La IC50 se calculó a partir de las gráficas de cantidad de parásitos vivos al final de las 48 h vs concentración del inhibidor.

B2. Sincronización de cultivos de formas epimastigotas

Se lavaron cultivos de $2,5 \times 10^9$ de *T. cruzi* en fase logarítmica y se resuspendieron en 100 ml de medio LIT con un 10% SBF y 20 mM hidroxiiurea. Se incubaron 24 h a 28°C con agitación suave. Después de

ello, la hidroxurea se retiró mediante dos lavados con 5 ml de PBS a 3500 rpm durante 10 min, tras lo cual los parásitos se resuspendieron nuevamente en la misma cantidad (100 ml) de medio LIT con un 10% SBF. En este punto los parásitos se encontraban sincronizados alrededor de las fases G1/S del ciclo celular (Galanti 1994). Alicuotas de 60×10^6 epimastigotas se tomaron a diferentes tiempos y la sincronización verificada tanto por incorporación de timidina tritiada como por tinción del ADN con yoduro de propidio (PI) y análisis de citometría de flujo, como se explica en los apartados correspondientes.

B2a. Análisis de la sincronización por tinción con PI y citometría de flujo

Los parásitos se fijan como lo describe Dvorak, J. (Dvorak 1993). Alicuotas de 6×10^7 fueron centrifugadas a $110 \times g$ por 15 min, lavados dos veces con PBS y resuspendidos en 100 μ l PBS. 900 μ l de etanol 70% fueron añadidos con agitación vigorosa e incubados por 5 min a 4°C. Las muestras fueron entonces centrifugadas, lavadas dos veces con PBS y resuspendidos en 500 μ l PBS. Otros 500 μ l de solución de extracción de ADN (fosfato de sodio 200 mM, ácido cítrico 4 mM, pH 7,8) fueron añadidos e incubados por 10 min a 37°C. Después de una rápida centrifugación, los parásitos se mezclaron con 250 μ l de una solución de PI/ARNasa (40 μ g/ml PI y 100 μ g/ml ARNasa in PBS) e incubados en oscuridad a 37°C. Los parásitos fueron analizados luego por citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson, San Jose, Ca) determinando la fluorescencia intracelular debido al ADN teñido con PI usando el Cell Quest Software.

B3. Cultivo y manipulación de bacterias

B3a. Cultivo de bacterias

Se siembra un preinóculo de 5 ml de bacterias en medio LB, que se crece durante 16 horas a 37°C y con agitación constante, en presencia del antibiótico de selección. Este preinóculo se utiliza para sembrar grandes cultivos líquidos de bacterias que se crecen en las mismas condiciones que el preinóculo, hasta que alcancen una OD a 600 nm de alrededor de 1. La cantidad empleada del antibiótico de selección es: ampicilina 100 μ g/ml, tetraciclina 100 μ g/ml y/o kanamicina 25 μ g/ml.

Las bacterias también fueron cultivadas en medio sólido, en placas de petri con LB-agar, con o sin antibiótico a 37°C. Los stocks de bacterias se conservan también a -80°C en medio LB suplementado con glicerol al 15%.

B3b. Preparación de células competentes

Los cultivos se realizaron en medio líquido con agitación a 37°C. Se crecieron 3 ml de bacterias durante 16 horas y se pasaron a 150 ml de medio LB, prosiguiendo el cultivo hasta que la D.O. a 600 nm fue de 0,6. Las células se centrifugaron a 4000 g durante 15 min a 4°C, y se lavaron con agua bidestilada estéril con los siguientes volúmenes: 1 volumen, 0,5 volúmenes y 0,02 volúmenes, centrifugándose cada vez 15 min a 4000 g a 4°C. Las bacterias se resuspendieron en 0,003 volúmenes de glicerol al 10%, se hicieron alícuotas de 50 µl y se almacenaron a -80°C.

B3 c. Transformación de células competentes

Para la transformación de las células competentes, éstas se descongelaron en hielo y se mezclaron en la cubeta de electroporación, previamente enfriada, las células y el vector que contiene el inserto. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador BTX ECM 600 y las condiciones fueron 2.5 kV, 129 ohms, generándose un pulso de alrededor de 5,5 milisegundos. Posteriormente, se agregó 950 µl de medio LB suplementado con 0,2% de glucosa, trasvasándolo a un tubo nuevo, y se incubó una hora a 37°C antes de ser plaqueado en medio LB sólido, para la separación de las colonias.

B4. Rastreo de genoteca de cDNA de la cepa Y de *T. cruzi* en λZAP

B4a. Infección de bacterias y obtención de placas de lisis

Previamente a la infección, células de la cepa XL1-Blue de *E. coli* fueron crecidas hasta la fase logarítmica, precipitadas y resuspendidas en 0,5 volúmenes de MgSO₄ 10 mM. Un volumen de una dilución de los fagos en SM se incubó con 2,5 volúmenes de las células, anteriormente preparadas, durante 15 min a 37°C. La dilución de fagos se calculó de forma que se esperaba obtener 3 x 10⁵ placas de lisis por placa de bacterias. Seguidamente, a la mezcla se agregaron 20 ml de NZY top agar a 50°C y se vertieron en placas Petri de 150 mm con NZY agar equilibradas a 37°C. Estas placas se incubaron durante toda la noche a 37°C hasta observar las placas de lisis. A continuación se transfirieron las placas a un filtro de nitrocelulosa, como se describe en el punto siguiente, y ese filtro se hibridó con la sonda de interés. Tras la hibridación, los clones positivos se purificaron por un procedimiento similar. Las colonias positivas se recogieron con pipetas Pasteur estériles y se resuspendieron en 1 ml de SM. De esta solución se prepararon diluciones para plaquear unas 200 a 300 unidades formadoras de placas (ufp) por placa, sometándose a un nuevo proceso de selección hasta que todas fueron positivas. Los clones positivos se almacenaron en alícuotas de 1 ml de SM con unas gotas de cloroformo a 4°C, y para tiempos prolongados a -80°C con DMSO al 7% (Sambrook 1989).

B4b. Transferencia de fagos a filtros de nitrocelulosa

Para la transferencia de los fagos, se colocó sobre las placas de lisis un filtro de nylon seco dejándose absorber durante 1 min. Una vez retirado se colocó un segundo filtro durante 2 min para obtener una réplica del primero. Para su posterior hibridación, los filtros fueron tratados durante 2 min con solución desnaturalizante, luego 4 min con solución neutralizante, y finalmente durante 2 min en SSC 20x. El tratamiento se hizo en bandejas sobre papeles Whatman 3 MM mojados en las soluciones anteriores, manteniendo los fagos en la parte superior de los filtros. Para fijar el ADN a los filtros, estos se secaron a temperatura ambiente y se fijaron con luz UV (360 nm) durante 5 min (Sambrook 1989).

B4c. Preparación de bacteriófagos a gran escala

Para obtener el lisado de bacterias se incubó una mezcla de 250 µl de células XL1-Blue en fase estacionaria con 100 µl del stock de fagos en SM y 100 µl de una solución 1:1 de MgCl₂/ CaCl₂ 10 mM durante 15 min a 37°C. Esta mezcla se transfirió a un matraz con 20 ml de medio NZY, incubándose a 37°C con agitación durante 6 a 8 horas hasta observar lisis celular. A este lisado se agregó 500 µl de cloroformo y se agitó por 15 min para completar la lisis y posteriormente se centrifugó durante 10 min a 10.000 rpm (rotor Sorvall SS-34) para eliminar restos celulares. El sobrenadante se almacenó a 4°C con unas gotas de cloroformo; este sobrenadante suele tener un alto título de fagos (cerca de 100.000/ml) siendo conveniente guardar una alícuota como stock (Sambrook 1989).

B5. Aislamiento de ADN

B5a. Aislamiento de ADN genómico de parásitos

Para la extracción de ADN genómico total de *T. cruzi* se siguió el procedimiento descrito por Coderre y col. (Coderre 1983). Los parásitos se crecieron hasta la fase estacionaria, se centrifugaron y el precipitado de parásitos se lavó dos veces con solución salina de PBS. Las células se resuspendieron en tampón A (0,2 M Tris-HCl pH 8, 0,1 M EDTA) y se lisaron con 0,5% SDS y 100 µg/ml de proteinasa K incubándose 4 horas a 37°C o bien toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una extracción con NaCl 0,1M y fenol-cloroformo/cloroformo isoamílico. El ADN contenido en la fase acuosa se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto lavándose con un volumen de etanol 70%. El precipitado se resuspendió en tampón TE y se trató con ARNasa (10 µg/ml) 1 hora a 37°C (o a temperatura ambiente toda la noche). Finalmente, se realizó una nueva extracción fenólica y una nueva precipitación con etanol, resuspendiéndose en agua bidestilada estéril.

B5b. Excisión “in vivo”

200 µl de células XL1-Blue se coinfectan con 200 µl de stock de fagos conteniendo los genes de interés y con 1 µl del fago “helper” R408. La mezcla se incuba a 37°C por 15 min. Se añadió 5 ml de medio LB y se incubó durante 3 h a 37°C con agitación. Se calentó la mezcla a 70°C por 20 min para matar las bacterias y se centrifugó durante 5 min a 4000 x g para deshacerlos de los restos bacterianos. El sobrenadante, conteniendo el fagémido p-Bluescript SK- con los genes de interés, se decantó en tubos estériles. Para plaquear los fagémidos rescatados, 200 µl de este fagémido y una dilución 1:10 se combinaron con 200 µl de células SOLR. Todo se incubó a 37°C por 15 min. De esta mezcla, 50 µl se añadieron a placas de LB con ampicilina (50 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias que crecieron en estas placas fueron sembradas en medio LB líquido con ampicilina e incubadas toda la noche a 37°C. Estos cultivos son almacenados en glicerol a -80°C. Los posibles fagos contaminantes no pueden replicarse en las cepas SOLR, por lo que así se previene la contaminación después de la excisión.

B5c. Aislamiento de ADN plasmídico

B5c1. Roche High Pure Plasmid Isolation Kit

Se utiliza para las extracciones de ADN plasmídico a pequeña escala, partiendo de 2-3 ml de cultivo bacteriano crecido durante toda la noche en agitación a 37°C. Este método permite el aislamiento de pequeñas cantidades de ADN plasmídico en condiciones de pureza e integridad aceptables. El procedimiento consiste en una lisis alcalina que es precipitada con una solución de acetato sódico. Una vez centrifugado, el sobrenadante es retenido en fibras de vidrio empaquetadas previamente en microtubos de centrifuga. El ADN plasmídico adherido es lavado y luego eluido con agua destilada. Se siguió el protocolo recomendado por la casa comercial.

B5c2. Wizard maxiprep

El procedimiento es semejante a la miniprep salvo que se parte de 500 ml de cultivo bacteriano para obtener mayores cantidades de ADN plasmídico. También se siguió en este caso el protocolo de la casa comercial.

B5d. Aislamiento de ARN total de parásitos

Se siguió el procedimiento descrito por Chomczynski y col. (Chomczynsky 1987) con algunas modificaciones. El ARN se extrajo a partir de cultivos en fase logarítmica que fueron centrifugados durante 15

min a 3.000 rpm (rotor Sorvall SS-34), en el caso de las formas tripomastigotas se mantuvieron previamente en hielo y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min.

Para homogenización o lisis de los parásitos, se utilizó el reactivo TRIzol de Gibco. El TRIzol, una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, mantiene íntegro el ARN mientras que rompe los parásitos y disuelve los componentes celulares. Tras la lisis, la adición de cloroformo y posterior centrifugación separa la solución en fases acuosa y orgánica. Después de transferir la fase acuosa, el ARN se recupera por precipitación con alcohol isopropílico.

Debido a que el ARN se degrada fácilmente es conveniente que todas las soluciones sean tratadas previamente con DEPC y se trabaje a 4°C o en hielo.

B6. Cuantificación de ácidos nucleicos

Tanto la concentración del ADN como del ARN puede medirse espectrofotométricamente a 260 nm. Para el ADN, una unidad de densidad óptica a 260 nm (D.O.₂₆₀) corresponde a 50 µg/ml. Para el ARN, una unidad de D.O.₂₆₀ corresponde a 40 µg/ml. Se considera que para una preparación buena de ácidos nucleicos, el cociente 260/280 debe ser superior a 1,8 pero no mayor de 2,0 (Sambrook 1989).

B7. Tratamiento enzimático del ADN

B7a. Digestión del ADN con enzimas de restricción

Las enzimas se emplean de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial. La reacción se lleva a cabo generalmente en un volumen final de 25-30 µl empleando de 1 a 10 U de enzima por µg de ADN a digerir, incubándose dos horas a la temperatura recomendada. Las enzimas se inactivaron de acuerdo con las condiciones recomendadas por la casa comercial.

B7b. Reacción de ligamiento

Las reacciones de ligamiento de fragmentos de ADN se realizaron con la enzima T4 ADN ligasa (1 U/µg de ADN), procedente del bacteriófago T4. Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5' y 3' del ADN, pudiendo unir tanto extremos cohesivos como romos. El volumen final fue de 20 µl en el tampón suministrado por la casa comercial, utilizando relaciones molares inserto:vector de 5:1. De forma general, la reacción se realizó durante 16 h a 16 °C.

B7c. Tratamiento con fosfatasa alcalina

Esta enzima hidroliza el grupo fosfato del extremo 5' del ADN. La ligasa necesita este grupo para la reacción de ligamiento por lo que el tratamiento de los vectores de clonado con esta enzima disminuye la posibilidad de religamiento de los vectores abiertos. La reacción se realizó agregando 1 unidad de enzima a las digestiones con endonucleasas e incubando 30 min a 37°C.

B7d. Marcaje radioactivo del ADN

B7d1. Marcaje de dCTPs

Se utilizó el procedimiento de "Random Primed" (Feinberg 1983) para marcar moléculas de ADN con [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (Amersham corp.). Esta técnica se basa en la utilización de una mezcla de hexanucleótidos que actúan como cebadores para la síntesis de ADN por la enzima Klenow. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μl con una concentración de ADN de 20 a 50 ng, 50 μCi de [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP y 2 U de polimerasa Klenow, siguiendo el protocolo de la casa comercial (Boehringer Mannheim). Las sondas marcadas se purificaron mediante cromatografía en columnas de 1 ml de Sephadex G-50 (Pharmacia). El ADN marcado fue resuspendido en un volumen final de 100 μl y se emplearon 2 μl para medir el número de cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo.

B7d2. Marcaje con timidina

A 1×10^7 parásitos se le añadieron 10 μCi de [^3H]timidina (1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) y se llevaron hasta 1000 μl con PBS. Se incubaron 1 h a 28°C en agitación. Este tiempo permitió la incorporación de timidina tritiada en el ADN de los parásitos. Posteriormente se incubaron en hielo durante 10 min y después de centrifugarlos a 10000 rpm durante 10 min se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se agitaron bien y se centrifugaron de nuevo, tras lo cual se congeló el sedimento a -80°C hasta su uso.

B7d3. Marcaje de oligonucleótidos

A 30 pmol oligonucleótidos se le añaden 3 μl de [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (3000 Ci/mmol), 2 μl (20 U) de la quinasa 5' polinucleótido (PNK) y 5 μl del tampón de PNK 10X. Esta mezcla se completa hasta 100 μl con agua bidestilada. Se incuba durante 20 min a 37°C y se inactiva la quinasa incubando otros 20 min a 65°C. La mezcla se purifica por precipitación con 1/10 de acetato sódico y 2,5 volúmenes de etanol absoluto por 10 min a -80°C. Tras una centrifugación de 15 min a 13000 rpm el precipitado se lava varias veces con etanol al 75% y luego se deja secar. La elución se lleva a cabo con tampón de hibridación de oligos para conseguir un volumen de 100 μl .

B7e. Reacción de la transcriptasa reversa

La retrotranscriptasa es una ADN polimerasa de origen viral que utiliza como molde una hebra de ARN y por lo tanto se aplica para sintetizar ADN complementario a partir de ARN. En nuestro caso usamos 17 U de la AMV retrotranscriptasa ("Avian Myeloblastosis Virus") en una reacción conteniendo 1 µg de ARN poliA⁺, 100 pmol de cebador antisentido, una mezcla de deoxinucleótidos (400 µM de cada uno), incubándose durante dos horas a 42°C. Se realizó posteriormente una desnaturalización a 95°C durante 15 min, y una dilución 1:10 en agua bidestilada, para su utilización en PCR.

B7f. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR permite amplificar, por medio de una polimerasa termoestable (Taq polimerasa de *Thermus aquaticus*), un determinado ADN molde a través de repetidos ciclos de desnaturalización térmica, apareamiento de oligonucleótidos y síntesis de ADN. Estos ciclos dan lugar a una amplificación exponencial de la molécula de ADN (Arnheim 1992). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl conteniendo una mezcla de 30 pmol de cada cebador, 0,1 vol. de tampón de PCR (Boehringer Mannheim), 400 µM de cada deoxinucleótido, 50-100 ng de ADN, 1 a 5 U de Taq polimerasa. Las condiciones de la PCR y el número de ciclos de amplificación se ajustaron para cada experimento. En otros casos, se utilizó el kit ExpandTM Long Template PCR System (Boehringer Mannheim), donde la polimerasa es una mezcla de las enzimas Taq polimerasa y Pwo ADN polimerasa, que favorece la corrección de posibles errores en la lectura del ADN molde. Para la amplificación de los diferentes fragmentos de ADN, las condiciones de los PCR están descritos en la siguiente tabla. Todos los ciclos fueron precedidos por uno de desnaturalización a 95°C durante 2 min, y terminados con un ciclo final de 7 min a 4°C.

Fragmento	ADN	Primers		Ciclos	Desnaturalización		Hibridación		Elongación	
		5'	3'		Tiempo	Temp (°C)	Tiempo	Temp (°C)	Tiempo	Temp (°C)
Sonda CK1 conservada	<i>T. cruzi</i> genómico	CK1 conservada sense	CK1 conservada antisense	30	10 s	94	30 s	58	60 s	72
Sonda TeCK1.1 específica	cDNA TeCK1.1 /pGEMT + Sal I	1.1PCRsonda5'	1.1PCRsonda3'	30	10 s	94	30 s	48	30 s	72
cDNA TeCK1.1	<i>T. cruzi</i> cDNA	Minixon	1112-2	10	10 s	94	30 s	57	60 s	68

				20	10 s	94	30 s	57	60 s +20s c/u	68
TcCK1.1 para clonar en pET-22b+	cDNA TcCK1.1 /pGEMT + Sal I	CK1.1pET22-5	CK1.1pET22-3	30	10 s	94	30 s	60	60 s	68
GFP (sin stop)	Plásmido PXG-GFP+	BAMGFP-	ECOGFP-	30	10 s	94	30 s	52	60 s	72
GFPs (con stop)	Plásmido PXG-GFP+	BAMGFP-	ECOGFPs	30	10 s	94	30 s	52	60 s	72
TcCK1.1 para ligar a GFP	Plásmido I.1/pET28a +NcoI	ECOGFP1	HINDGFP1	30	10 s	94	30 s	52	60 s	72
Sonda TcCK1.2 específica	Plásmido clon 1212/pBSKS-	CK1212-3	CK1212-2	30	10 s	94	1 min	57	1 min	68
ADN TcCK1.2	<i>T. cruzi</i> Y ADN genómico	1212-6	1212-2	10	10 s	94	30 s	57	60 s	68
				20	10 s	94	30 s	57	60s +20s c/u	68
TcCK1.2 para clonar en pET-22b+	Plásmido TcCK1.2 /pGEMT + Sal I	CK1.2pET22-5	CK1.2pET22-3	30	10 s	94	30 s	60	60 s	72
TcCK1.2 para ligar con GFP	Plásmido TcCK1.2 /pQE30 + XbaI	ECOGFP2	HINDGFP2	30	10 s	94	30 s	56	60 s	72

B8. Secuenciación del ADN

La secuenciación de ADN se realizó por el método de terminación de cadena por didesoxinucleótidos descrito por F. Sanger y col. (Sanger 1977). El método consiste en la síntesis de una hebra de ADN por una polimerasa a partir de un molde, utilizando un cebador sintético y una mezcla de dNTPs junto a un análogo que carece del OH en 3' necesario para la formación del enlace fosfodiéster, por lo que al integrarse este 2'3'-didesoxinucleótido trifosfato (ddNTP), la elongación de la cadena se detiene.

La secuenciación se realizó con un secuenciador automático 373 Automated DNA (Applied Biosystems) utilizando el *kit* AmpliTaqDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer) y utilizando

una optimización llevada a cabo en nuestro Instituto (Lario 1997). Los cebadores utilizados fueron los universales T3, T7 y SP6, así como oligonucleótidos sintéticos específicos.

B9. Electroforesis de ácidos nucleicos

B9a. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Mediante esta técnica, los fragmentos de ADN pueden ser separados en función de su tamaño, para posteriormente ser transferidos a filtros o bien purificados a partir del gel. Se utilizaron geles horizontales de agarosa de porcentaje entre 0,8 y 1,5%, según los tamaños a separar, preparados en tampón TAE y realizándose la separación a 5 V/cm. Las muestras se cargaron en los geles con tampón de carga 1x (concentración final). El tampón contiene colorantes que nos dan referencias de la evolución de la electroforesis. La visualización del ADN se realizó al incorporarse directamente en el gel el agente intercalante bromuro de etidio, a una concentración final de 0,5 µg/ml, e irradiando el gel con luz ultravioleta.

Como indicadores de tamaño molecular se emplearon el ADN del fago lambda cortado con *Hind* III y el ADN del fago φX174 digerido a su vez con *Hae* III (0,1 µg por pocillo).

B9b. Electroforesis en campo pulsado

La electroforesis de campo pulsado permite la separación de fragmentos de ADN de gran tamaño o de cromosomas enteros del parásito en un gel de agarosa mediante la aplicación de campos eléctricos de dirección variable. Una de las variantes más utilizadas es la denominada "Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis (CHEF)" (Chu 1986), donde se emplea un circuito con los electrodos distribuidos hexagonalmente que producen patrones rectos de bandas, con lo que se facilita la hibridación y análisis densitométricos.

B9b1. Preparación de los bloques de agarosa para CHEF

La preparación de los bloques de agarosa se realizó siguiendo el método de Garvey (Garvey 1986). Cada bloque contiene aproximadamente 8×10^7 parásitos (unos 24 µg de ADN) en fase logarítmica de crecimiento. Tras lavar los parásitos tres veces en PBS 1x se resuspendieron en 0,3 ml de PBS y se mezclaron con igual volumen de agarosa de bajo punto de fusión (Preparative Grade, Bio Rad) al 1,2% en PBS. La mezcla se depositó en moldes y se dejó solidificar a 4°C. Los bloques solidificados se depositaron en el tampón de digestión (EDTA 0,5 M pH 9, N-lauril sarcosina 1% y proteinasa K 1%) y se incubaron durante 48 h a 50°C.

Posteriormente, se lavaron 3 veces en EDTA 0,2 M pH 8, (cada lavado de 3 h) y quedan almacenadas en este tampón a 4°C hasta su utilización.

B9b2. CHEF electroforesis

Las electroforesis se realizan en geles al 1,5% de agarosa y tampón TBE 0,5x en un aparato de electroforesis CHEF de LKB-Bromma con un sistema controlador de pulsos 2015 Pulsaphor Plus acoplado a un sistema de refrigeración 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator. El marcador de peso molecular utilizado es Yeast chromosome PFG Marker, de *S. cerevisiae* YPH80 No. 345 BioLab.

B9c. Electroforesis de ARN en geles de agarosa-formaldehído

La separación por tamaños del ARN se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes. Las muestras se prepararon en una solución 2 M de formaldehído, 50% formamida y MNE 1x, y se desnaturizaron 15 min a 65°C, y al cargarlos en el gel se añadió tampón de carga y 1 µl de bromuro de etidio. Los geles fueron de agarosa al 1%, 2,2 M formaldehído (agente desnaturizante) y MNE 1x, desarrollándose la electroforesis en tampón MNE 1x, a un voltaje entre 50 y 100 voltios. El marcador de tamaño fue el ARN ladder de Promega.

B10. Aislamiento de ADN en geles de agarosa: "Gene Clean"

Los fragmentos de ADN se aislaron utilizando el *kit* comercial Gene Clean® (Qiagen) siguiendo el protocolo de la casa comercial. En este procedimiento, el fragmento de agarosa se disuelve en una solución de NaI a aproximadamente 50°C durante 10 min, el ADN se retiene en una resina de sílice. La resina, que contiene el ADN, se lava con una solución de etanol para eliminar impurezas y el ADN se eluye con agua, incubándola a aproximadamente 50°C durante 2 min.

B11. Transferencia de ADN a membranas de nylon: "Southern blot"

La transferencia del ADN a membranas de nylon se realiza mediante la técnica descrita por E. Southern (Southern 1975). Se basa en el paso del ADN del gel a la membrana debido a un proceso de capilaridad que se genera a partir de un tampón con elevada concentración salina. El empleo de membranas cargadas positivamente favorece la unión.

El proceso necesita un tratamiento previo del gel con HCl 0,25 M durante 15 min que produce la despurinización parcial del ADN que facilita su posterior hidrólisis. Posteriormente se trata con solución

desnaturalizante durante 30 min y, por último, con solución neutralizante durante otros 30 min. La transferencia se realiza en tampón SSC 20x durante 16 h. Una vez completado el proceso, los filtros se lavan en SSC 2x y se dejan secar a temperatura ambiente. La unión covalente del ADN al filtro se consigue irradiando con luz ultravioleta de 250 nm durante 3-5 min.

B12. Transferencia de ARN a membranas de nylon: "Northern blot"

En el caso de la transferencia de ARN, los geles de agarosa-formaldehído se desnaturalizaron durante 15 min en NaOH 50 mM y se renaturalizaron durante 30 min en Tris-HCl 0,1 M pH 7,5. La transferencia por capilaridad a las membranas y el fijado del ARN a las mismas se realizó igual que en la técnica de Southern blot.

B13. Hibridación de ácidos nucleicos con sondas radioactivas

Esta técnica nos permite la localización e identificación de secuencias específicas de ADN inmovilizadas sobre un soporte. Para ello, se emplean sondas marcadas radioactivamente por el método del "random primed", previamente descrito.

Antes del proceso de hibridación, los filtros se preincubaron a 42°C y en agitación suave, con la solución de hibridación que contiene Denhardt's, formamida y ADN de esperma de salmón para bloquear los sitios inespecíficos de unión a ADN. El volumen de la solución de prehibridación, es de 0,2 ml/cm² de filtro. Posteriormente, se hibridaron durante toda la noche, a 42°C y agitación suave, con un volumen de solución de hibridación de 0,05 ml/cm² de filtro, en presencia de la sonda marcada radioactivamente (10⁶ cpm/ml) previamente desnaturalizada (10 min a 100°C y 3 minutos en hielo). Las condiciones del proceso tales como temperatura y cantidad de formamida, así como la concentración de sales de la solución de lavado, varían según la homología de la sonda empleada. En nuestro caso, la hibridación se realiza a 42°C en 50% de formamida durante 16 h y los lavados se llevan a cabo incubando a diferentes temperaturas con diferentes concentraciones de sal y detergente. Nuestro protocolo fue el siguiente: Solución 1, 5 min, T.A.; Solución 2, 15 min, T.A.; Solución 3, 20 min, 37°C; Solución 4, 20 min, 68°C; Solución 5, 5 min, T.A. En el caso de hibridaciones con la sonda TcCK1.1, todos los tiempo de lavados se redujeron a la mitad. Por último, los filtros se expusieron a una película autorradiográfica (Agfa Curix) a -80°C en presencia de una pantalla amplificadora.

Cuando se marcaron sondas de oligonucleótidos las condiciones de hibridación y lavados son las siguientes: el filtro se humedece en 6 x SSC antes de ponerlo a prehibridar con 10 ml del buffer de hibridación de 2 a 3 horas a una temperatura igual a la temperatura de hibridación (T_m) - 5°C. Luego se añade el oligonucleótido marcado (10⁶-10⁷) y se deja hibridando por 2 horas a la misma temperatura de prehibridación.

La solución se remueve y el filtro se lava brevemente a T. A. con 10 ml de tampón de hibridación sin ADN de esperma de salmón. Dos nuevos lavados iguales al anterior se repiten pero a temperatura de hibridación y durante 10 min cada vez. El filtro se coloca en una envoltura de plástico y se procede al análisis autoradiográfico.

B14. Transfección de *T. cruzi*

La transfección de formas epimastigotas de *T. cruzi* con el vector pRIBOTEX (Martinez-Calvillo, Lopez et al. 1997), conteniendo o no los genes de interés, se realizó lavando 4 veces los parásitos con HBS estéril y resuspendiéndolos en HBS a 5×10^7 parásitos/ml. 400 μ l de esta suspensión se mezclaron con 50 μ l de ADN plasmídico a 2 μ g/ml. La transfección se hizo en el sistema ECM 600[®] de BTX utilizando como condiciones 450 voltios, 800 μ F y 13 ohms. Tras la electroporación, los parásitos se incubaron durante 10 min en hielo y se transfirieron a 10 ml de medio LIT, incubándose 24 horas a 28°C tras lo cual se agregó G418 a una concentración de 150 μ g/ml. A los tres días se realizó una dilución 1:3 del cultivo, adicionándose nueva solución de G418 a la misma concentración. En esta dilución, los parásitos se mantuvieron durante 3 días tras lo cual se realizó una nueva dilución 1:10, adicionándose G418 a una concentración de 500 μ g/ml. Los parásitos resistentes se observaron a los 15-20 días de la última dilución.

B15. Electroforesis de proteínas: "SDS-PAGE"

B15a. Obtención de proteínas totales de parásitos

Los parásitos, en fase logarítmica de crecimiento, son lavados 3 veces con PBS y finalmente resuspendidos en tampón de lisis a una concentración de 25×10^6 parásitos/carril de la electroforesis (equivalente a unos 40 μ g de proteínas/carril). Posteriormente se añade el volumen necesario del tampón de muestra 1x (apartado 2.A.2) y se desnaturalizan a 100°C durante 5 min antes de cargar el gel.

B15b. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método colorimétrico de Bradford (Bradford 1976). Este método consiste en la cuantificación de la unión del colorante Coomassie brilliant blue a las proteínas de la muestra. Esta unión del colorante puede medirse a una longitud de onda de 594 nm. Para obtener los valores, se realizó previamente una curva patrón con los valores de D.O.₅₉₄ obtenidos a partir de concentraciones crecientes de albúmina de suero bovino.

B15c. Electroforesis

La separación de proteínas en función de su tamaño se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (Laemmli 1970). El método se basa en la carga negativa que adquieren las proteínas al unirse al detergente SDS. Como la cantidad de SDS unido es casi siempre proporcional al peso molecular del polipéptido e independiente de su secuencia, los complejos polipéptidos-SDS migran a través del gel en función del peso molecular de las proteínas.

La separación electroforética se realizó en geles discontinuos, compuestos por un gel superior de composición constante (almacenador) preparado al 4,5% de acrilamida/bisacrilamida y pH 6,8, y un gel inferior (separador) del 7 al 12% y pH 8,8 dependiendo del tamaño de las proteínas a separar. Los porcentajes de acrilamida se eligieron en función del tamaño de las proteínas de interés a separar. Las muestras de proteínas se preparan disueltas en un volumen de tampón de muestra 1x y se desnaturizan a 100°C durante 5 minutos antes de cargar el gel, o a 37°C durante 10 min en el caso de que la muestra contuviera imidazol. La electroforesis se lleva a cabo en minigeles empleando la cubeta Mighty Small SE250 (Hofer Sci. Inst.) entre 20-25 mA, usando el tampón de corrida a 1X. Como marcador de peso molecular se utilizaron los marcadores de bajo peso molecular en algunos casos o de amplio en otros, ambos de BioRad. La fijación y visualización de las proteínas se lleva a cabo mediante tinción con una solución de Azul Coomassie R-250 al 0,2% en 40% de metanol y 10% ácido acético durante media hora y posterior decoloración en 25% de metanol y 10% de ácido acético.

B16. Transferencia de proteínas a membranas de nylon: "Western blot" e inmunodetección

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de acrilamida se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron en el tampón de transferencia cátodo durante 15 min. Las membranas de PVDF del tamaño del gel se prepararon humedeciéndolas en metanol absoluto durante 15 s; posteriormente se lavaron en H₂O bidestilada por 2 min y finalmente se sumergieron en tampón de transferencia Ánodo II por 5 min. El "sandwich" de transferencia se montó humedeciendo y colocando, en este orden, dos pedazos de papel Whatmann en el tampón Anodo I, uno en el Anodo II, la membrana, el gel, y tres trozos más de papel Whatman humedecidos en tampón Cátodo. Los trozos de papel Whatmann son del mismo tamaño que el gel. La transferencia se realizó en un aparato Semi-Phor TE70 (Hofer Sci. Inst.) durante 1 hora a un voltaje máximo de 25 V y un amperaje máximo de 100 mA. Finalizada la transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau 0,5% /ácido acético 1% para visualizar las proteínas y determinar la eficiencia de la transferencia, destiñéndose con H₂O bidestilada.

Para la inmunodetección, las membranas de PVDF se bloquearon sumergiéndolas 10 s en metanol absoluto y dejándolas secar al aire por 15 min. A continuación se incubaron durante una hora a temperatura ambiente (T.A.) con la dilución elegida del anticuerpo en TBS-0,05% Tween20 y 1% BSA con agitación suave. Luego se lavaron dos veces por 10 s con TBS-0,05% Tween20 y 1% BSA con agitación. A continuación la membrana se incubó durante media hora a T.A. con el anticuerpo IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina o el anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Hrp) a una dilución 1: 5000 en TBS-0.05% Tween20 y 1% BSA. Finalmente, tras un nuevo ciclo de lavados, las membranas se revelaron con 5 ml de una solución de NBT-BCIP (Roche) en tampón fosfatasa, en cuyo caso la reacción de revelado se detuvo con tampón de parada, o, cuando se usa Hrp, con las soluciones potenciadores de señal del kit ECL (Amersham Corp.), en cuyo caso la membrana se expone a una autoradiografía hasta conseguir la señal deseada.

B17. Purificación de proteínas recombinantes

El vector pET22b+ permite expresar polipéptidos como proteínas de fusión con una cola de seis histidinas. Esta región rica en núcleos de imidazoles interacciona con iones de níquel fuertemente adsorbidos sobre la fase fija, facilitando la purificación por cromatografía de afinidad. La elución se realiza protonando las histidinas a pH bajo, con lo que pierden afinidad por el níquel, o bien añadiendo imidazol, que compite con las histidinas por el níquel. Así, el polipéptido puede purificarse en un solo paso por cromatografía de afinidad en columnas de agarosa conjugada con níquel.

La expresión de la proteína de fusión queda bajo el control de un promotor Tac, lo que permite inducir su expresión adicionando IPTG al medio de cultivo.

B17a. Obtención de proteínas solubles de bacterias transformadas

Se partió de una colonia aislada de bacterias transformadas con el vector con el inserto adecuado; ésta se incubó en 20 ml de LB ampicilina durante toda la noche a 37°C con agitación. Este cultivo se transfirió a un litro de LB incubándose a 37°C con agitación hasta una D.O.₆₀₀ de 1, momento en que se indujo la expresión de la proteína con la cola de histidina añadiendo al cultivo IPTG hasta una concentración de 0,5 mM.

Para las proteínas expresadas en pET22b+ las bacterias se incubaron durante 16 h a 19°C. El cultivo se centrifugó durante 15 min a 3,000 x g, y tras lavarlo 3 veces con PBS se resuspendió en 20 ml de una solución de HEPES 50 mM pH 7.8, MgCl₂ 10 mM e inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 0.7 µg/ml pepstatina y 5 µg/ml de leupeptina, aprotinina y antipain) y se lisó con 1 mg/ml de lisozima a temperatura ambiente durante 30 min. Tras de esto, las bacterias se sonicaron 2 veces durante 30 s, con intervalos de 30 s entre cada sonicación. Luego la solución homogénea se incubó a 4°C con ADNasa en una concentración de 200 µg/ml.

antes de centrifugar a 30.000 xg durante 20 min a 4°C para eliminar el material insoluble y las células intactas. Los sobrenadantes se usaron para su purificación en la columna de afinidad.

B17b. Preparación de las columnas de afinidad

Las proteínas recombinantes con su extremo de 6 histidinas se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando como soporte sólido Ni²⁺- ácido nitrilotetra-acético (Ni-NTA) de QIAGEN. Se utilizaron columnas de 2 ml de resina de níquel de Qiagen. Las columnas se lavaron antes de su uso con agua bidestilada, equilibrándose con 10 volúmenes de solución de equilibrado (Hepes 50 mM pH 7.8, NaCl 150 mM, 10% glicerol y Tritón X-100 al 1%) durante dos horas a T.A. con agitación continua. Posteriormente la resina se deja asentar en la columna por gravedad. Las columnas se almacenaron después de su uso a 4°C en una solución de PBS con 20% de etanol.

B17c. Purificación en columna de la proteína recombinante

La proteína con cola de histidina se purificó pasándola lentamente a través de la columna de Ni²⁺-NTA previamente equilibrada. La columna fue lavada extensivamente con 100 volúmenes de solución de lavado (50 mM Hepes pH 7.8, 0.7 M NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 40 mM imidazol y 2mM β-mercaptoetanol). Las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente de imidazol de 40 a 200 mM en solución de elución (50 mM Hepes pH 7.8, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 0.5% Triton X-100 y 1 mM β-mercaptoetanol) y se recogieron fracciones de 0,5 ml que se analizaron por SDS-PAGE al 12%. Las fracciones que contenían la proteína recombinante fueron escogidas por su actividad CK1 y se concentraron en Centricon-10 (Pall-Gelman). Después se determinó su concentración mediante la técnica de Bradford y se congeló alicuoteada en nitrógeno líquido hasta su utilización.

B18. Ensayos cinéticos

La mezcla de reacción para medir la actividad de la enzima contenía su sustrato y ATP marcado radioactivamente, en un medio óptimo para la actividad de esa enzima (sales, pH, etc). La reacción comenzó al añadir el ATP o la enzima, y se dejó seguir durante 10 min a 30°C. El sustrato debe añadirse en concentraciones saturantes para que la actividad de la enzima no dependa de la cantidad de sustrato disponible, excepto en el caso de los ensayos para determinar las *K_m*s, en los que el sustrato en estudio se añade en concentraciones crecientes. La reacción se detuvo mediante adsorción por filtros de fosfocelulosa P-81, (cargados negativamente a la mayoría de los pH) que se añaden a ésta. Estos filtros se lavaron extensivamente en ácido fosfórico 75 mM, que provee un medio ácido en el cual el sustrato fosforilado tendrá una carga neta positiva. En el caso de sustratos péptidos sintéticos, esta adsorción se facilita aún más al incluir en los extremos del péptido dos o tres

residuos de arginina o lisina, cuyas cadenas laterales se encuentran cargadas positivamente a ese bajo pH y favorecen también la unión al filtro. Después de secar los filtros, se introdujeron con líquido de centelleo en viales donde se pudo cuantificar la radioactividad adherida a ellos en un contador beta. La mezcla de reacción para CK1, con un volumen final de 30 μ l, llevaba 50 mM tampón Hepes pH 7,8; 7 mM $MgCl_2$; 0,5 mM ditioneitol; 150 mM NaCl; péptido sustrato CK1 250 ó 300 μ M o β -caseína 5 ó 10 mg/ml; 1 ó 2 U de enzima recombinante (1 U es la cantidad de enzima que puede incorporar 1 pmol de fosfato en el sustrato en un min) ó 20 μ g de proteína cuando se trataba de lisado de parásitos y finalmente 100 μ M [^{32}P]ATP (actividad específica: 500-1000 cpm/pmol). Se utilizó Hepes porque es un tampón orgánico sin sales ni grupos que pudieran intervenir en la reacción enzimática. Con el $MgCl_2$ se provee a la mezcla de suficiente Mg^{2+} para la reacción. El DTT es un agente reductor que previene la formación de puentes como los disulfuros que puedan interferir en la reacción. Por último, el NaCl provee los iones necesarios para que se dé la actividad enzimática.

Las K_m de los diferentes sustratos de la enzima se calcularon en base a gráficas de Michaelis-Menten.

B18a. Actividad CK1 en extractos de parásitos

Al utilizar parásitos lisados como fuente de la enzima CK1, los parásitos recogidos y lavados con PBS se resuspendieron en tampón Hepes 50 mM suplementado con 5 μ g/ml de antipaina, leupeptina y aprotinina; 0,7 μ g/ml de pepstatina y 1mM PMSF para evitar la degradación de las proteínas. Luego se sonicaron 2 veces por 30 seg antes de centrifugar a 10000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante de la sonicación se utilizó para los ensayos con extractos de parásitos. Para las determinaciones de las diferentes fracciones de la centrifugación diferencial, el sedimento del paso anterior se homogenizó con el mismo tampón de lisis descrito, con la ayuda de un homogenizador, y luego se utilizó este homogenizado, correspondiente a la fracción mitocondrial y nucléica, o, para abreviar, "Pellet-10" o P-10, para las determinaciones enzimáticas. El sobrenadante de esta primera centrifugación a 10000 rpm se centrifugó una vez más a 100000 rpm para obtener una fracción soluble o citosólica, y un sedimento microsomal. Este último se homogenizó de forma igual al P-10.

Para el resto de los ensayos los parásitos se resuspendieron en el tampón Hepes más antiproteasas descrito arriba, con la adición de 0.1% Triton X-100. Luego las muestras se centrifugaron durante 15 min a 13000 rpm a 4°C, y el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima para los ensayos.

B18b. Actividad CK1 en proteína recombinante

La mezcla de reacción para los ensayos era básicamente la misma que la descrita en el protocolo general, pero teniendo en cuenta la cantidad de NaCl del tampón en el que fue eluída la proteína recombinante al momento de purificarla. En la mayoría de los casos, el tampón de elución contenía 150 mM de NaCl así que

según el volumen de enzima añadido a la mezcla, esta cantidad se tomó en cuenta para ajustar la cantidad de NaCl añadida a la reacción para que alcanzara la concentración deseada, de 150 mM.

Todos los ensayos llevaban un blanco sustrato (sin sustrato) cuya actividad se sustrajo de la de las muestras. También se puso un control bacteriano para descartar actividad procedente de alguna otra kinasa.

B18b1. Determinación de la K_m para β -caseína

Se analizó el efecto que la β -caseína ejercía sobre la enzima variando la concentración de la primera desde 0,13 mg/ml hasta 15 mg/ml partiendo de preparaciones de 10 mg/ml para las concentraciones bajas y de 50 mg/ml para las más altas.

B18b2. Determinación de la K_m para el péptido sustrato específico de CK1

Igual que para la β -caseína, la concentración del péptido se varió desde 33,3 μ M hasta 300 μ M, partiendo de una solución 3 mM a una concentración de 100 μ M ATP.

B18b3. Determinación de la K_m para ATP

La concentración del ATP se varió desde 5 μ M hasta 166 μ M en presencia de 5 mg/ml β -caseína. Como la mayor o menor incorporación de radioactividad indica la actividad de la enzima, el variar la concentración de ATP marcado le conferiría mayor radioactividad a los ensayos con niveles más altos de la purina, falseando los resultados. Este problema se solucionó introduciendo blancos enzima (sin enzima) para cada concentración de ATP utilizada. Estos controles se sustrajeron de las actividades resultantes. Además, éstos fueron los únicos ensayos en los que la reacción se comenzó con la adición de la enzima y no del ATP. La solución de partida del ATP estaba a 500 μ M y era una mezcla de ATP frío a 500 μ M y una mínima fracción de [32 P]ATP (3000-5000 Ci/mmol).

B18b4. Determinación de la inhibición con heparina

La inhibición por heparina es una característica de la CK2 (caseína kinasa II), y por ello se ha utilizado clásicamente para discriminar entre actividad CK1 y CK2 especialmente cuando la medimos usando como sustrato una proteína ácida, como la β -caseína, que tiene distintos sitios fosforilables por ambas enzimas. La concentración de heparina se varió desde 1 mg/ml hasta 30 mg/ml, partiendo de una solución 0,015 mg/ml para las concentraciones bajas y de 0,15 mg/ml para las concentraciones altas.

B18b5. Determinación de la inhibición con himenialdisina y derivados del purvalanol

Para medir el efecto de nuevos posibles inhibidores de la CK1 de *T. cruzi*, usamos las siguientes concentraciones de los inhibidores derivados del purvalanol: NG-95, 100 nM; NG-97, 100 nM. Para determinar la IC50 de la himenialdisina, usamos concentraciones variables desde 5 nM hasta 5 mM y determinamos gráficamente la concentración del inhibidor necesaria para producir un 50% de disminución en la actividad enzimática.

B19. Estudios de la fluorescencia de los transfectantes.

B19a. Determinación de la fluorescencia por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite hacer medidas rápidas sobre células que fluyen en un líquido, una a una, a través de un punto sensible. Cada medida se realiza de forma separada en cada célula de la suspensión, por lo que no es una simple media de los valores de la población completa.

Todas las medidas se llevaron a cabo en un citómetro de flujo Becton Dickinson (Mountain View CA). El análisis de los datos se llevó a cabo determinando la fluorescencia intracelular debido a la Proteína Verde Fluorescente (GFP). Se establecieron regiones y se analizaron 20.000 sucesos en las mismas, que se representaron en forma de histogramas.

B19b. Microscopía

B19b1. Preparación de placas de poly-L-lysine®

Después de lavar los porta-objetos con agua y jabón, éstos se lavan con etanol al 70% y se dejan secar al aire. Luego se sumergen individualmente en una solución de poly-L-lysine (Sigma) diluída 1:10 con agua, durante 5 min. Los porta-objetos se secan al aire por 1 hora y se conservan hasta una semana a 4°C.

B19b2. Fijación de los parásitos

Los parásitos se lavaron con PBS y se fijaron durante 20 min en hielo con 2% de paraformaldehído en PBS (recién preparado). Para disolver el paraformaldehído es necesario calentarlo a 50°C y ajustarle el pH a 7 con NaOH 10 N añadido gota a gota. Para ver la fluorescencia de la GFP sólo fue necesario poner una gota de los parásitos en las placas de poly-L-lysine, esperar a que se secan un poco y añadirles una gota

(aproximadamente 25 μ l) del medio de montaje que usamos, que fue el VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories). Para teñir el núcleo con DAPI, después de fijar los parásitos, éstos se permeabilizaron con saponina al 0,025 % en PBS durante 1 ó 2 min. Luego se añadió el VECTASHIELD al que se le había incorporado DAPI a una concentración de 0,5 μ g/ml.

B19b3. Microscopía de fluorescencia y confocal

La microscopía de fluorescencia se llevó a cabo en un microscopio Zeiss Axiophot (West Germany) con un objetivo Planar Neofluar 100X, usando un filtro FITC para visualizar la proteína verde y un filtro UV para visualizar las estructuras teñidas con DAPI.

La microscopía confocal se llevó a cabo en un microscopio confocal Leica Modelo TCSSP perteneciente a la Unidad Mixta de Investigaciones Médicas, Hospital San Cecilio de Granada.

B20. Análisis informático

Para los análisis de similitud de secuencia en los bancos GenBank y EMBL se utilizó el programa BLAST (Altschul 1990). Para los alineamientos de secuencias se utilizó el paquete de programas GCG, desarrollados por la Universidad de Wisconsin (Devereux 1984).

Para el modelaje de la proteína TcCK1.1 se utilizó el programa WHAT IF version 19970813-1517 by Swiss Model.

Para la determinación de las *K_m* se utilizó una regresión no lineal de una curva Michaelis-Menten con ajuste estricto de los datos usando el software de GraphIt (Erithacus Software Limited).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

A. Aislamiento de los genes CK1 de *T. cruzi*

A1. Diseño de la sonda conservada, aislamiento y secuenciación de dos isoformas CK1 de *T. cruzi*

Como las proteínas pertenecientes a la familia CK1 contienen varias secuencias identificativas que las distinguen del resto de las quinasas (Hanks and Quinn 1991), usamos estas secuencias conservadas para diseñar cebadores que nos permitieran obtener por PCR la parte más conservada del o los genes de *T. cruzi*. El cebador 5' está tomado del dominio V, exactamente, de la secuencia conservada LLGPSLE, mientras que el cebador 3' está tomado del dominio X, concretamente, la secuencia conservada LPWQGLK (Fig. 1b1). La secuencia del producto de esta PCR de 603 pb se analizó y se confirmó que correspondía a una CK1 con una homología del 79% con respecto a la isoforma CK1 δ humana. Este fragmento se marcó radioactivamente y se utilizó posteriormente como sonda para rastrear una librería λ ZAP cDNA de la cepa Y de *T. cruzi*. En los ocho clones positivos que se encontraron, sólo se obtuvieron dos secuencias diferentes que confirmaban contener dos isoformas de los genes CK1 de *T. cruzi*. Una de ellas contenía el gen CK1 homólogo 1 (*TcCK1.1*) que tiene 936 nucleótidos y que codifica para una proteína de 312 aminoácidos de aproximadamente 36 kDa, y la otra contenía el gen CK1 homólogo 2 (*TcCK1.2*) que tiene 990 nucleótidos y que codifica para un polipéptido de 330 aminoácidos de aproximadamente 37 kDa. Las isoformas son 88% idénticas entre sí (94% en sus dominios catalíticos) y se diferencian principalmente en su extremo carboxilo. El homólogo 2 tiene una extensión de 35 aminoácidos más allá del dominio quinasa, mientras que el homólogo 1 tiene una cola más corta de tan solo 19 aminoácidos (Fig. A1)

TcCK1.1 y TcCK1.2 son aproximadamente 65% idénticas a las isoformas humanas CK1 δ y CK1 ϵ y a la isoforma CK1 de levadura, Hhp1. También tienen una alta homología con las CK1 de otras especies como *Arabidopsis thaliana* (63%), *Drosophila melanogaster* (59%) y *P. falciparum* (58%). En cuanto a los aminoácidos de interés para la estructura terciaria, las tres secuencias que identifican a la familia CK1 están presentes en TcCK1.1 y TcCK1.2 (Ver también Figura A1). La secuencia del loop L-EF (LPWQGLKA) (residuos 214-221 tomando a TcCK1.1 como punto de referencia) está conservada en todos los organismos descritos hasta ahora, excepto en TcCK1.1, descrito en este trabajo, en el cual la lisina es reemplazada por una prolina (para una descripción de la nomenclatura utilizada para las proteínas CK1 ver (Xu, Carmel et al. 1995). La secuencia de localización nuclear descrita por Gross y Anderson en la CK1 δ humana (Gross, Loijens et al. 1999), TKRQKY, corresponde a la secuencia TKQEKY (residuos 223-228) en ambos homólogos TcCK1. También hay un dominio homólogo de kinesina en la CK1 δ humana (Gross, Loijens et al. 1999), HIPYR que está conservada en ambos homólogos de *T. cruzi* (residuos 167-171). Por otra parte, existe una inserción de 3

residuos, GGV, en el dominio de unión a nucleótido (residuos 63-65) que está ausente en todas las otras CK1 publicadas hasta hoy (Figura A1).

TcCK1.1	MNLMIANR	YCISQKIGAG	SFGEIFRGTN	MQTGETVAIK	LEQAKTRHPQ	LAFEARFYRI	58
TcCK1.2	MSLELRVGNR	FRLGQKIGAG	SFGEIFRGTN	IQTGETVAIK	LEQAKTRHPQ	LALEARFYRI	60
HuCK1d	MELRVGNR	YRLGRKIGSG	SFGDIYLGTD	IAAGEEVAIK	LECVKTKHPQ	LHIESKIYKM	58
HuCK1e	MELRVGNK	YRLGRKIGSG	SFGDIYLGAN	IASGEEVAIK	LECVKTKHPQ	LHIESKIFYKM	58
Hhp1	MALDLRIGNK	YRIGRKIGSG	SFGDIYLGTD	VVSGEEVAIK	LESTRAKHPQ	LEYEYRVYRI	60
PfCK1	MEIRVANK	YALGKKLGS	SFGDIYVAKD	IVTMEEFVAVK	LESTRSKHPQ	LLYESKLYKI	58
DmCK1	MELRVGNK	YRLGRKIGSG	SFGDIYLGTT	INTGEEVAIK	LECIRTKHPQ	LHIESKIFYKT	58
AtCK1	MEPRVGNK	FRLGRKIGSG	SFGEIYLGTD	IHTNEELAIK	LENVKTKEHQ	LLYESKLYRI	58

1

TcCK1.1	LNAGGGVVGI	PNILFYGVEG	EFNVMVMDLL	GPSLEDLFSF	CGRKLSLKTT	LMLAEQMIAR	118
TcCK1.2	LNAGGGVVGI	PNILFYGVEG	EFNVMVMDLL	GPSLEDLFSF	CDRKLSLKTT	LMLAEQMIAR	120
HuCK1d	MQGG...VGI	PTIRWCGAEG	DYNVMVMELL	GPSLEDLFNF	CSRKFSLKTV	LLLADQMISR	115
HuCK1e	MQGG...VGI	PSIKWCGAEG	DYNVMVMELL	GPSLEDLFNF	CSRKFSLKTV	LLLADQMISR	115
Hhp1	LSGG...VGI	PFVRWFGVEC	DYNAMVMDLL	GPSLEDLFNF	CNRKFSLKTV	LLLADQLISR	117
PfCK1	LGGG...IGV	PKVYWYGI	DFTIMVLDLL	GPSLEDLFTL	CNRKFSLKTV	RMTADQMLNR	115
DmCK1	MQGG...IGI	PRIIWCGSEG	DYNVMVMELL	GPSLEDLFNF	CSRKFSLKTV	LLLADQMISR	115
AtCK1	LQGG...TGV	ENVKWFGVEG	DYNVLMVMDLL	GPSLEDLFNF	CSRKLSLKSV	LMLADQMINR	115

TcCK1.1	IEFVHSSKSVI	HRDMKPDNFI	MGTGKKGHHV	YVVDLGLAKK	YRDPRTHQHI	PYKEGKSLTG	178
TcCK1.2	IEFVHSSKSVI	HRDMKPDNFI	MGTGKKGHHV	YVVDLGLAKK	YRDPRTHQHI	PYKEGKSLTG	180
HuCK1d	IEYIHSKNFI	HRDVKPDNFI	MGLGKKGNLV	YIIDLGLAKK	YRDARTHQHI	PYRENKNLTG	175
HuCK1e	IEYIHSKNFI	HRDVKPDNFI	MGLGKKGNLV	YIIDLGLAKK	YRDARTHQHI	PYRENKNLTG	175
Hhp1	IEFIHSSKSLF	HRDIKPDNFI	MGIKGRGNQV	NIIDLGLAKK	YRDHKTHLHI	PYRENKNLTG	177
PfCK1	IEYVHSKNFI	HRDIKPDNFI	IGRKKVTLI	HIIDLGLAKK	YRDSRSHTSY	PYKEGKSLTG	175
DmCK1	IDYIHSRDFI	HRDIKPDNFI	MGLGKKGNLV	YIIDLGLAKK	FRDARSLKHI	PYRENKNLTG	175
AtCK1	VEFFHSSKSLF	HRDLKQTNFI	MGLGRRANQV	YIIDLGLAKK	YRDMTTHQHI	PYRENKNLTG	175

2

3

TcCK1.1	TARYCSINTH	LGIEQSRRDD	LEGIGYILMY	FLRGSPLWQG	LPAATKQEKY	VALAKCKMSL	238
TcCK1.2	TARYCSINTH	LGIEQSRRDD	LEGIGYILMY	FLRGSPLWQG	LKAHTKQEKY	SRISERKQTT	240
HuCK1d	TARYASINTH	LGIEQSRRDD	LESLSGYVLMY	FNLGSLPWQG	LKAATKROKY	ERISEKKMST	235
HuCK1e	TARYASINTH	LGIEQSRRDD	LESLSGYVLMY	FNLGSLPWQG	LKAATKROKY	ERISEKKMST	235
Hhp1	TARYASINTH	LGIEQSRRDD	LESLSGYVLVY	FCRGSPLWQG	LKATTKKQKY	EKIMEKKIST	237
PfCK1	TARYASINTH	LGIEQSRRDD	IEALGYVLMY	FLRGSPLWQG	LKAISKKDKY	DKIMEKKIST	235
DmCK1	TARYASINTH	LGIEQSRRDD	LESLSGYVLMY	FNLGALPWQG	LKAANKROKY	ERISEKKLST	235
AtCK1	TARYASMINTH	LGIEQSRRDD	LKSLGYILMY	FLKGSPLWQG	LKAGTKKKKY	ERISEKKVST	235

TcCK1.1SLET	LCKGFPAEFA	AYLNYTRGLR	FEDKPDYSYL	KRLFRELFIR	EGYHVDYVFD	292
TcCK1.2PVET	LCKGFPAEFA	AYLNYIRSLR	FEDKPDYSYL	KRFFRELFIR	EGYHVDYVFD	294
HuCK1dPIEV	LCKGYPSEFA	TYLNFCRSLR	FDDKPDYSYL	RQLFRNLFHR	QGFSYDYVFD	289
HuCK1ePIEV	LCKGYPSEFS	TYLNFCRSLR	FDDKPDYSYL	RQLFRNLFHR	QGFSYDYVFD	289
Hhp1PTEV	LCRGFPQEF	IYLNYSRSLR	FDDKPDYAYL	RKLFRLDFCR	QSYEFDYVFD	291
PfCK1SVEV	LCRNASEFEV	TYLNYSRSLR	FEDRPDYTYL	RRLKDLFIR	EGFTYDFLFD	289
DmCK1SIVV	LCKGFPEFEV	NYLNFCRQMH	FDQRPDYCHL	RKLFRLNLFHR	LGFTYDYVFD	289
AtCK1	SIEALCPIEA	LCRGYPSEFA	SYFHYCRSLR	FDDKPDYAYL	KRIFRDLFIR	EGFQFDYVFD	295

TcCK1.1	WTLKRIHESL	QDEEKELSNN					312
TcCK1.2	WTLKRIHENL	KAEGSGQQEQ	KQQQQQQRER	GDVEQA			330
HuCK1d	WNMLKFGASR	AADDAERERR	..DREERLRH	SRNPATRGLPSTDSG	RLRGTQEVAP	342
HuCK1e	WNMLKFGAAR	NPEDVDRERR	EHREERMGO	LRGSATRALP	PGPPTGATAN	RLRSAAEPVA	349
Hhp1	WTLKRKTQQD	QQHQOQLQQQ	LSATPQAINP	PPERSSFRNY	QKQNFDEKGG	DINTTVPVIN	351
PfCK1	WTCVYASEKD	KKKMLENKNR	FDQTADQEGR	DQRNN			324
DmCK1	WNLLKFGGPR	NPQAIQQAQD	GADGQAGHDA	VAAAAVAAA	AAASSHQQQQ	HKVNAALGGG	349
AtCK1	WTILKYQSQS	LTAPPSRALN	PAVGTSALP	PGISNIDRYT	GEEGRPHTE	SSRRRVSGAL	355

Figura A1. Alineación de secuencias de isoformas CK1 de diferentes especies. TcCK1.1 (*T. cruzi*), TcCK1.2 (*T. cruzi*), HuCK1d (isoforma δ humana), HuCK1e (isoforma ϵ humana), Hhp1 (*S. pombe*), PfCK1 (*P. falciparum*), DmCK1 (*D. melanogaster*), AtCK1 (*A. thaliana*). Las secuencias peptídicas fueron alineadas para una máxima identidad por medio de la introducción de espacios (representados por puntos) usando el programa GCG PILEUP de la Universidad de Wisconsin. Residuos idénticos en todos los CK1 descritos hasta hoy están sombreados en gris y los residuos idénticos en las especies representadas aquí y que están conservadas en todas la familia CK1 están sombreadas en negro. Las secuencias que caracterizan a la familia CK1 (Gross and Anderson 1998) se señalan con una doble línea numerada sobre la secuencia (1,2,3). Los cebadores diseñados para obtener la sonda *CK1* fueron tomados de los motivos 1 y 3. Los tres residuos que son exclusivos de CK1 de *T. cruzi* están encuadrados. Las líneas continúa y discontinua muestran la señal de localización nuclear y el dominio de homología con kinesina, respectivamente.

2. Consecución de sondas específicas para TcCK1.1 y TcCK1.2; localización cromosómica y organización genómica

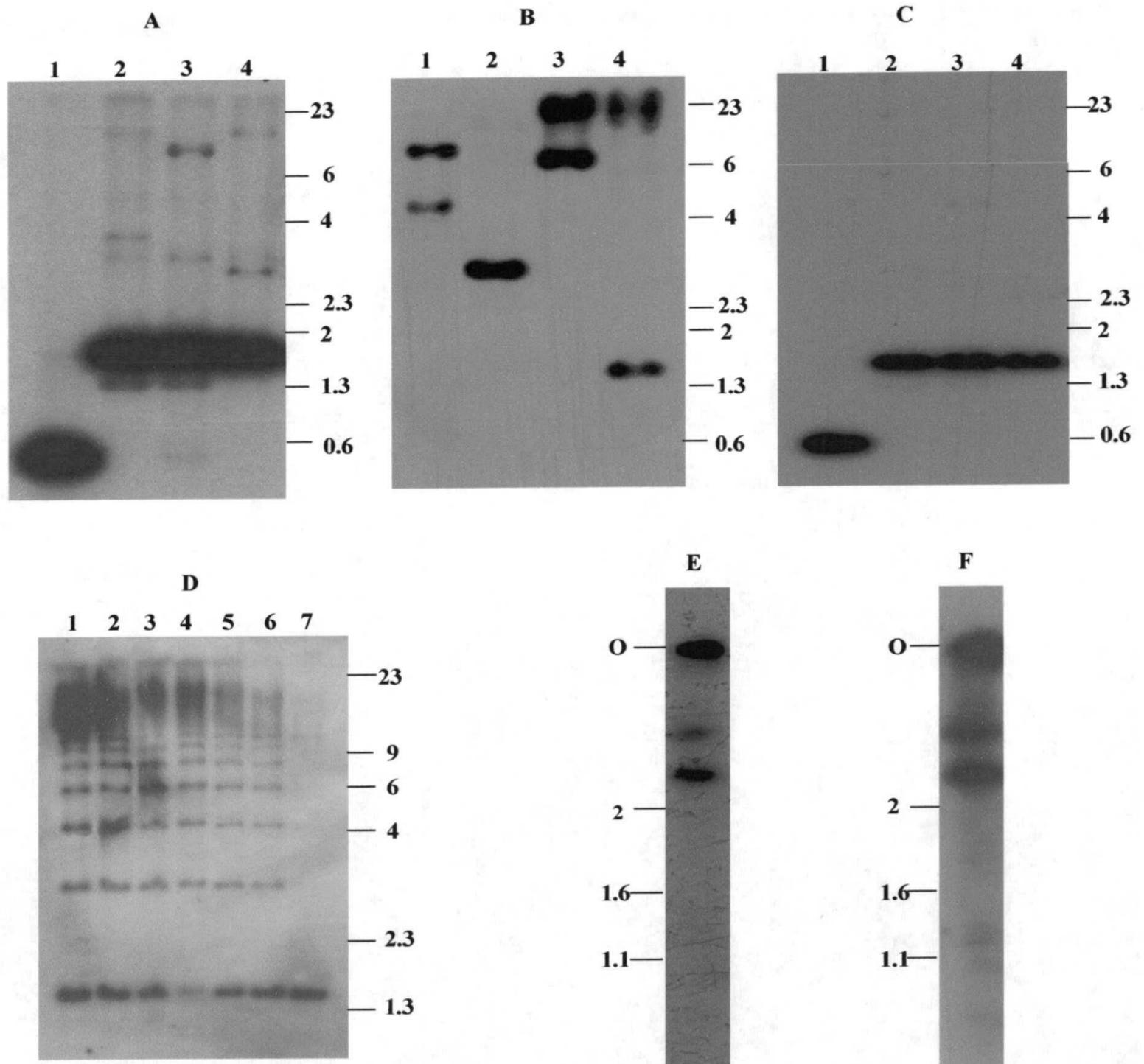


Figura A2. Organización genómica de los genes *TcCK1* de *T. cruzi*. 5 µg/carril de ADN genómico de la cepa Y fueron digeridos con distintas enzimas de restricción, sometidos a electroforesis, transferidos e hibridados con diferentes sondas. (A) sonda correspondiente a 603 pb de una región codificante de *CK1* (Ver Materiales y Métodos), carril 1, *KspI*; carril 2, *SacI*; carril 3, *KpnI*; carril 4, *ScaI*. (B) Sonda específica para *TcCK1.1*. Carril 1, *XhoI*; carril 2, *SacI*; carril 3, *KspI*; carril 4, *PvuII*. (C) Sonda específica para *TcCK1.2*. carril 1, *KspI*; carril 2, *SacI*; carril 3, *KpnI*; carril 4, *ScaI*. (D) 5 µg/carril de ADN genómico fueron digeridos con *KpnI* a 2, 4, 8, 15, 30, 60 y 90 min (carriles 1 a 7), e hibridados con la sonda específica para *TcCK1.2*, mostrando el típico patrón de escalera de un gen repetido en tándem. Ninguna de las enzimas utilizadas cortaban la sonda. Los marcadores de tamaño (Kb) son derivados del ADN del fago λ digerido con la endonucleasa *HindIII* y del fago φX174 digerido con *HaeIII*. (E,F) Localización cromosómica de los genes *TcCK1.1* and *TcCK1.2* genes: los cromosomas de formas epimastigotas se separaron utilizando una electroforesis de campo pulsado (CHEF) bajo con las condiciones descritas en Materiales y Métodos. El gel fue transferido e hibridado con las sondas específicas para *TcCK1.1* (E) y *TcCK1.2* (F). Los marcadores de tamaño (Mb) fueron los Marcadores de Cromosomas de Levaduras PFG de Biolabs. (O) representa la posición del pocillo de partida.

Una digestión preliminar del ADN genómico de la cepa Y de *T. cruzi* y la hibridación de su Southern blot con la sonda CK1 conservada de 603 pb sugirió la existencia de diferentes genes CK1, de los cuales uno de ellos parecía ser una gen multicopia (Figura A2A). Cuando los dos genes aislados fueron clonados y secuenciados, se diseñaron sondas específicas para cada uno de ellos. Para *TcCK1.1* se diseñó una sonda basada en los nucleótidos -166 a 37, y para *TcCK1.2* se usó una sonda que comprendía desde el nucleótido 909 hasta el 1260. Estas sondas marcadas radioactivamente fueron utilizadas para hibridar un Southern blot de ADN genómico de *T. cruzi* con diferentes enzimas de restricción. Cada Southern blot reveló diferentes patrones de corte como se muestra en la figura A2 (B y C). En el caso de *TcCK1.2*, exceptuando un carril, todo el ADN hibridó en bandas del mismo tamaño cuando fue digerido con diferentes enzimas que cortan el gen una vez, excluyendo a *KspI* (Figura A2C). En el caso de la digestión con *KspI*, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 600 pb, debido a un sitio más de corte en el gen para esta enzima (carril 1, figura A2C). El patrón de hibridación sugiere que *TcCK1.2* ciertamente está repetido en tándem; éste no es el caso de *TcCK1.1* que parece ser un gen de doble copia por genoma haploide (figura A2B). Para confirmar que *TcCK1.2* es un gen multicopia, se realizó una digestión parcial de ADN genómico de *T. cruzi* con la enzima *KpnI* que corta una vez el gen. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa, se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y se hibridaron con la sonda específica *TcCK1.2*. La digestión parcial muestra la repetición en tándem del gen multicopia (figura A2D). Para determinar la localización cromosómica de los genes *CK1*, los cromosomas de *T. cruzi* se separaron realizando una electroforesis de campo pulsado e hibridandola con las sondas específicas descritas arriba. Los resultados indican que, en la cepa Y, ambas isoformas, *TcCK1.1* y *TcCK1.2*, están localizadas en dos cromosomas mayores de 2 Mb (figura A2E,F)

B. Análisis de la expresión y actividad diferencial de las isoformas TcCK1.1 y TcCK1.2

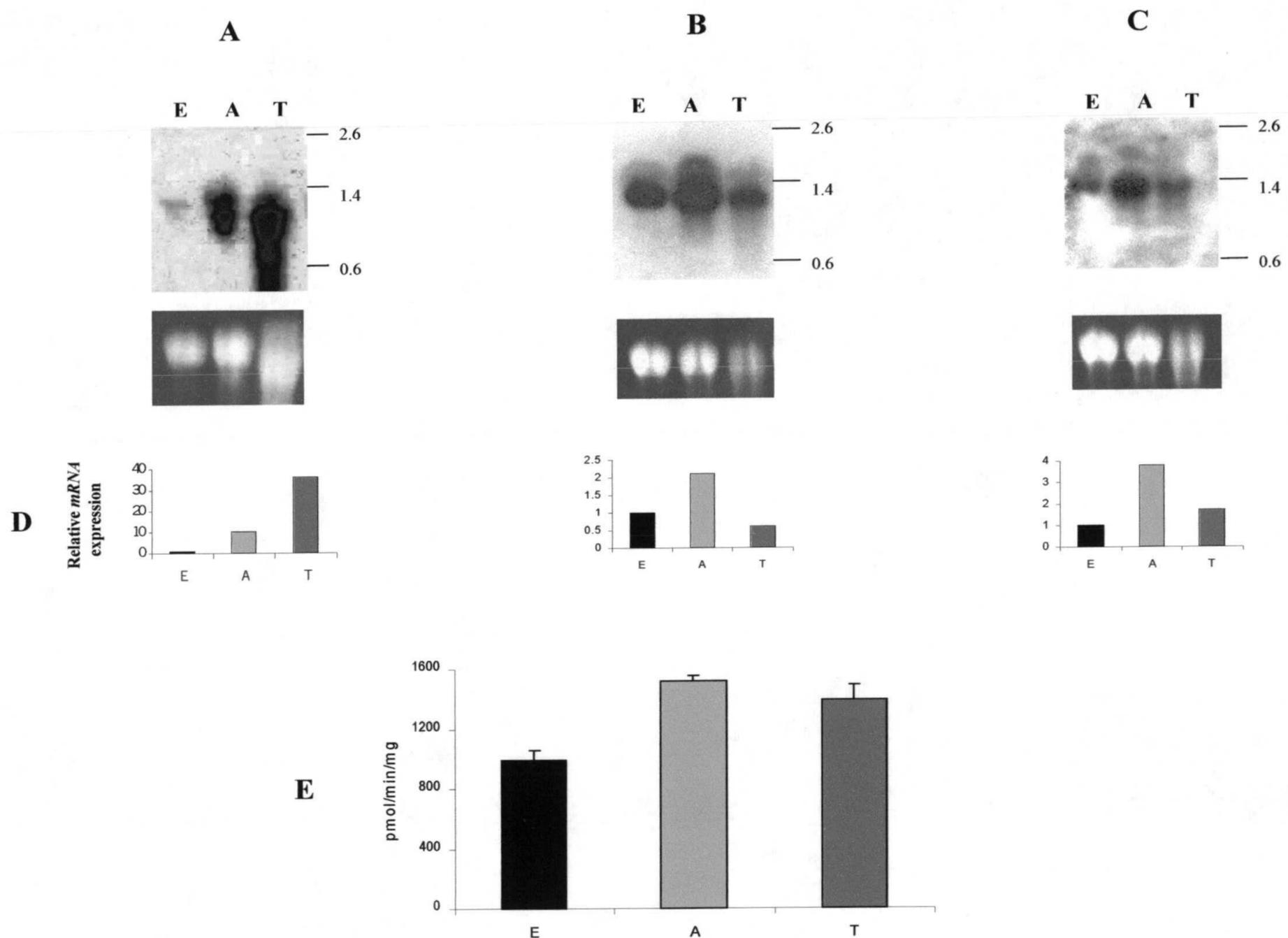


Figura B1. Expresión específica de estadio del ARNm de *TcCK1*. ARN total RNA (20 μ g) de formas epimastigotas (E), amastigotas (A), y tripomastigotas (T) en fase de crecimiento logarítmico medio y tardío de la cepa CL-Brener de *T. cruzi* fueron hibridados con las sondas específicas para *TcCK1.1* (A), *TcCK1.2* (B), y *TcCK1* (C). Las tinciones de los ARNr con bromuro de etidio se muestran en los paneles inferiores. Los marcadores ARN estándar (kb) son de Promega. (D) Aumento en la expresión de ARNm de CK1 de amastigotas y tripomastigotas con respecto a las formas epimastigotas del parásito, según normalización por análisis densitométrico de los *rARN* (Ver Materiales y Métodos). (E) Diferentes formas del parásito (cepa CL-Brener) fueron obtenidas según está descrito en Materiales y Métodos. Los sobrenadantes de la lisis y centrifugación a 13000 x g fueron analizados por duplicado sobre su actividad específica CK1. Los datos mostrados son el resultado de un experimento representativo. En el caso de los epimastigotas el número calculado fue la media de la actividad durante los seis días de la fase logarítmica de crecimiento.

Se estudiaron las expresiones de los dos genes en los diferentes estadios de vida del parásito. Se extrajo ARN total de las formas amastigotas, tripomastigotas y epimastigotas de la cepa CL-Brener de *T. cruzi* y se separaron por electroforesis en geles de formaldehído y agarosa. Estos geles se transfirieron a papel y se hibridaron con las sondas específicas de los genes *TcCK1.1* y *TcCK1.2*. Se obtuvieron señales en ARN mensajeros de aproximadamente 1300 pb, que era el tamaño previsto para los clones cDNA, pero la intensidad de la señal con respecto al estadio del parásito resultó ser diferente para cada uno de los genes. En el caso de *TcCK1.1* (figura B1A) hubo una baja expresión en el estadio epimastigota y, comparativamente, hubo un aumento superior a 30 veces (figura B1D) en las formas tripomastigotas (el filtro tuvo que ser sobreexposto para poder detectar la señal en el carril de los epimastigotas) (figura B1A). En lo que respecta a *TcCK1.2* (figura B1B), las formas epimastigotas y tripomastigotas mostraron una expresión similar entre sí, mientras que se produjo un incremento de expresión de dos veces en las formas amastigotas (figura B1D). Los Northern blots se hibridaron con la sonda general *TcCK1* que reconocía las dos isoformas, y se encontró que, en las formas amastigotas y tripomastigotas, los ARNm de los *TcCK1* están expresados más de tres y casi dos veces, respectivamente, en comparación con las formas epimastigotas (figura B1C).

La actividad CK1-like de los extractos de parásitos fue algo mayor en los amastigotas con respecto a los tripomastigotas, mientras que en los epimastigotas esta actividad alcanzó sólo de un 57 a un 68% de la de los amastigotas, dependiendo del estado de replicación en que se encontraran los parásitos en cultivo cuando se recogieron las muestras (ver abajo) (Para esta comparación, sólo se tomaron en cuenta las actividades CK1 anteriores a la fase estacionaria de crecimiento) (figura B1E)

C. Análisis de la actividad CK1 durante la replicación de *T. cruzi*

La actividad CK1-like de las formas epimastigotas a lo largo del crecimiento en cultivo en las cepas CL-Brener e Y de *T. cruzi*. Tal como se muestra en la figura C1, se observó actividad en el primer día de crecimiento. Esta actividad continuó aumentando hasta que los parásitos entraron en la fase tardía de crecimiento logarítmico. Tan pronto como los parásitos la alcanzan se observó un descenso de la actividad. El análisis de la actividad CK1-like en dos cepas con muy opuestos tiempos de duplicación (en CL-Brener es mucho más lento que en Y), reveló que el más alto nivel de actividad específica se daba en aquella cepa cuyo tiempo de duplicación era más rápido (figura C1).

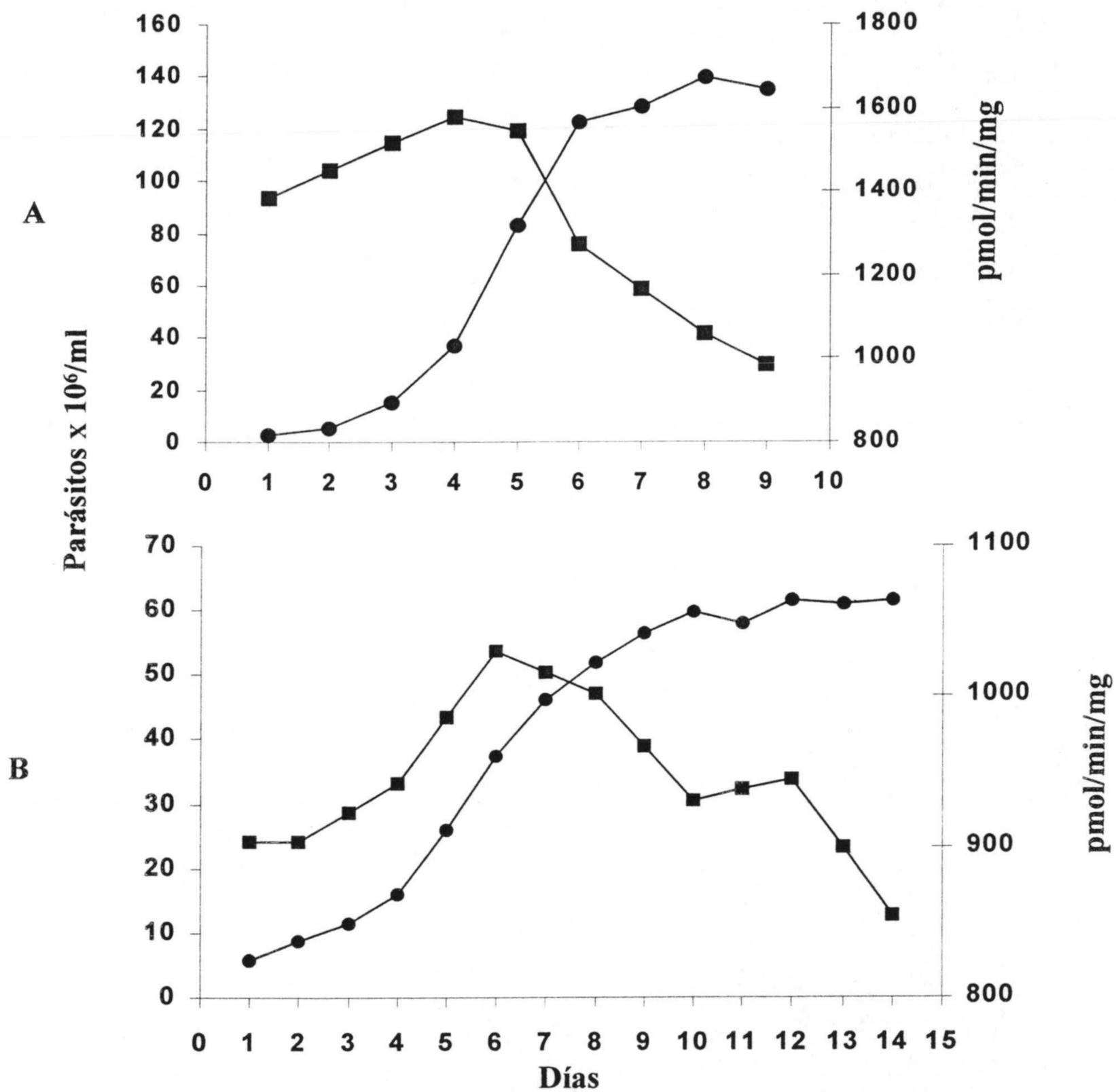


Figura C1. Actividad CK1-like durante el crecimiento de las formas epimastigotas de *T. cruzi*. Mediante el uso de formas epimastigotas de las cepas (A) Y y (B) CL-Brener de *T. cruzi*, se analizó la actividad CK1 a lo largo del crecimiento de los parásitos en cultivo utilizando el péptido sustrato específico para CK1. Los círculos representan el número de parásitos por ml y los cuadrados, la actividad específica CK1-like.

D. Localización celular de las isoformas CK1 de *T. cruzi*

Con formas epimastigotas de la cepa Y de *T. cruzi* se realizó un fraccionamiento subcelular para conseguir fracciones nucleares, citosólicas y microsomaes por centrifugación diferencial. Dichas fracciones fueron analizadas con respecto a su actividad CK1 revelando que la mayor parte de la actividad se localizaba en la fracción microsomal (Tabla D1). Más del 53% de la actividad se mantuvo en el precipitado microsomal mientras que el sobrenadante de la centrifugación a 105000 x g sólo contuvo un 16% de la actividad total y el P-10, o fracción nuclear y mitocondrial, contabilizó tan solo 7.5% de la actividad total.

Tabla D1

Actividad CK1-like de diferentes fracciones celulares de *T. cruzi*

Fracción	Actividad Específica (pmol/min/mg)	Actividad Total (pmol/min)
Extracto total sonificado	3180	24887
P-10	2460	1877
Sobrenadante citosólico	1406	4007
Precipitado microsomal	3755	13261

Epimastigotas de la cepa Y de *T. cruzi* fueron fraccionados tal como se describe en Materiales y Métodos. La actividad CK1-like se determinó con las diferentes fracciones. Los ensayos se realizaron por duplicado arrojando una desviación estándar de menos de 10%.

E. Análisis de la expresión de las isoformas TcCK1.1 y TcCK1.2 y actividad CK1 en el ciclo celular

Epimastigotas de *T. cruzi* se sincronizaron y monitorizaron por análisis de citometría de flujo como se muestra en la figura E1. Los ARNm de *TcCK1.1* y *TcCK1.2* se analizaron mediante cuantificación de las señales radioactivas y se normalizaron con β -tubulina y 18S rRNA (Fig. E2). La expresión de los ARNm de *TcCK1.1* sigue un patrón similar al de la actividad CK1-like de los extractos de parásitos, mientras que la expresión del ARNm de *TcCK1.2* aumenta después de la liberación del tratamiento con hidroxurea tras lo cual mantiene una expresión similar a lo largo del ciclo celular (figura E2B). Después de la liberación del bloqueo (t=0) (figura E2C), las formas epimastigotas presentaron un incremento gradual de la actividad CK1-like a medida que los parásitos entraron en la fase S hasta t=10 h

cuando la replicación del ADN alcanza su máximo. A $t=12$ h la mayor parte de la síntesis de ADN termina; en este momento la actividad CK1-like disminuye a su mínimo hasta $t=15$, momento en que las células están en la fase temprana G₂/M. Un fuerte aumento en la actividad enzimática se observó a $t=18$ h (fase G₂/M tardía), cuando los epimastigotas están dentro o abandonando la fase de mitosis, según el análisis de citometría de flujo (figura E1).

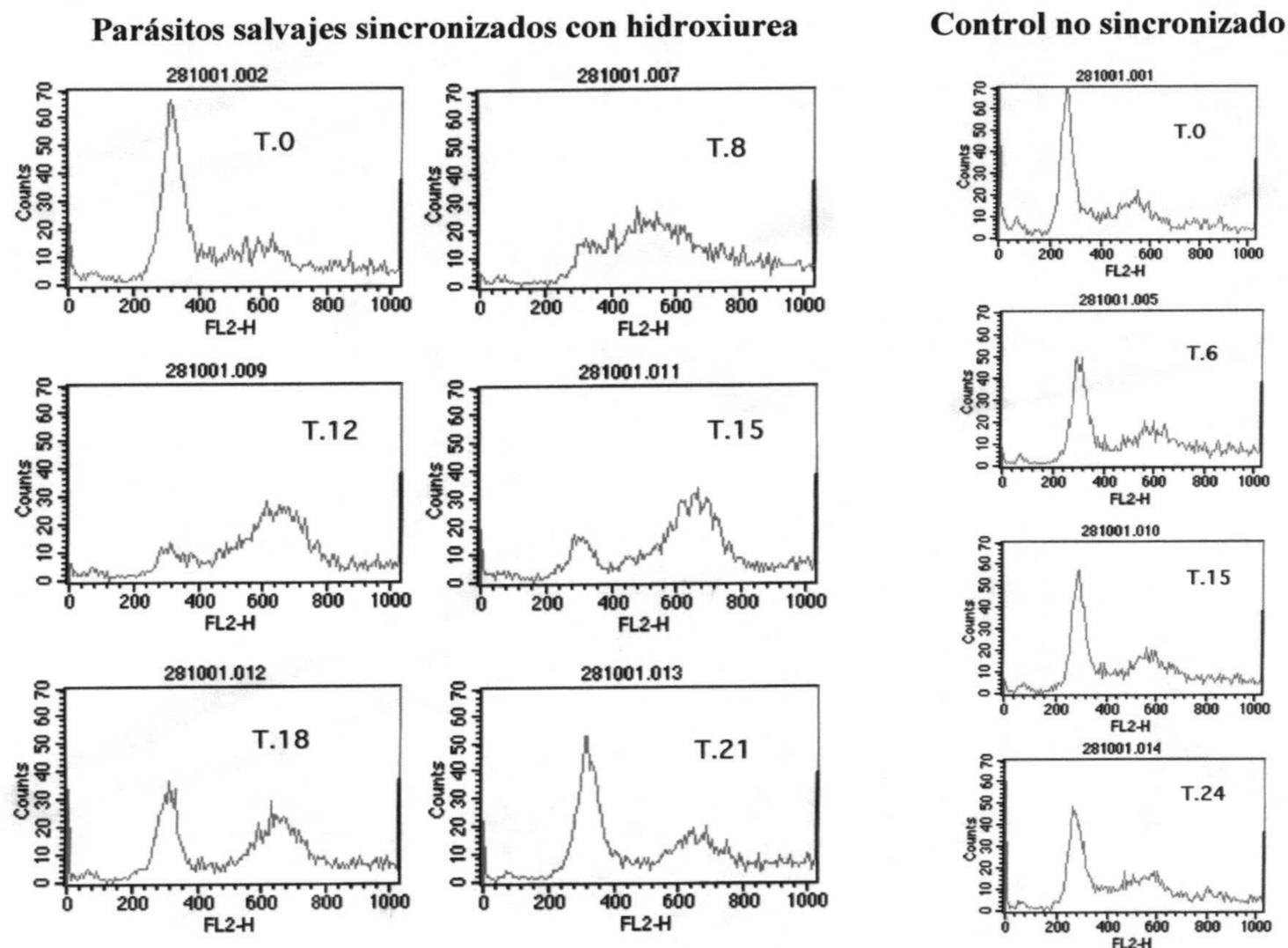


Figura E1. Sincronización de parásitos *T. cruzi*. La progresión del ciclo celular de los epimastigotas se interrumpió, mediante incubación durante 24 h, con hidroxurea. Después de la liberación del tratamiento se recogieron muestras de parásitos a diferentes tiempos y se analizaron por citometría de flujo para monitorizar su estado de ciclo celular (ver Materiales y Métodos). Un control de parásitos no tratados con hidroxurea también se analizó. El tiempo cero representa el momento en que los parásitos son liberados del medio que contenía hidroxurea. Se muestran aquí varios tiempos representativos. Las gráficas son histogramas de fluorescencias relativas por PI (proporcional al contenido de ADN) representado vs la frecuencia de eventos por canal (equivalente al número de células) (ver Materiales y Métodos). Cada histograma representa los datos recogidos de 20000 elementos por muestra.

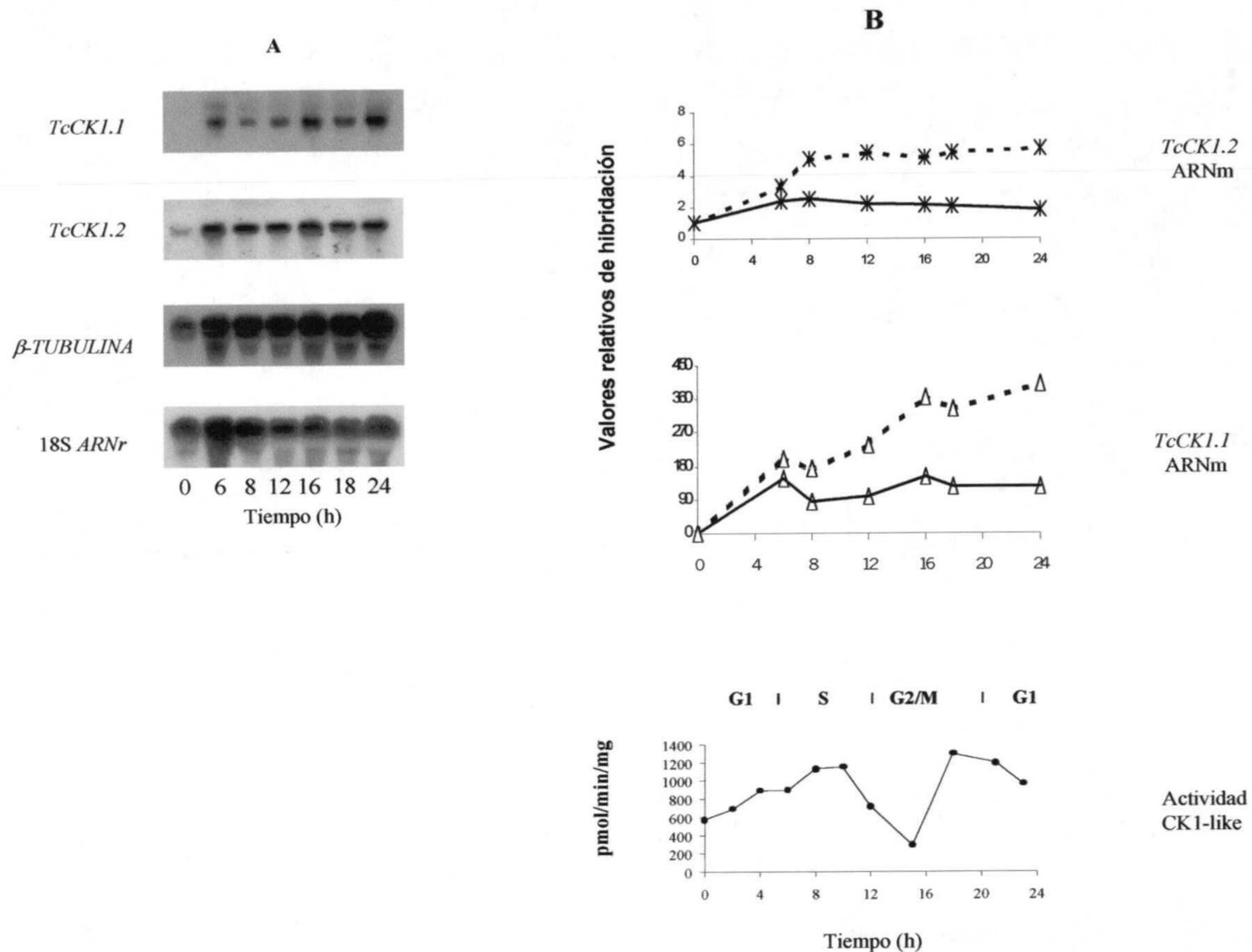


Figura E2. (A) Expresión de *TcCKI.1* y *TcCKI.2*. Se tomaron alicuotas de epimastigotas de la cepa Y a los siguientes tiempos: 0, 6, 8, 12, 16, 18 y 24 h. El tiempo cero representa el momento en el que los parásitos son sacados del medio que contenía la hidroxuurea (ver Materiales y Métodos). Los ARNm de estos parásitos se extrajeron; aproximadamente 25 μ g de cada uno se transfirieron a filtros de nylon y se hibridaron con las sondas específicas para *TcCKI.1* y *TcCKI.2* para determinar la variación en expresión a lo largo del ciclo celular. El blot se normalizó usando sondas para β -tubulina y 18S rRNA. (B) Relación de la expresión de ARNm con la actividad de las isoformas *TcCKI* durante el ciclo celular. En los dos paneles superiores, cada punto representa el cambio en el número de veces de expresión de los niveles de ARNm (relativos al tiempo 0) con respecto a la normalización tanto con la sonda para β -tubulina (líneas continua) como para los 18S rRNA (línea punteada). El panel inferior muestra la actividad CK1-like en los parásitos sincronizados. Para medir la actividad enzimática se recogieron parásitos a los siguientes tiempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21 y 23 h, y su actividad CK1-like se determinó usando el péptido sustrato específico para CK1 (ver Materiales y Métodos). Los experimentos se repitieron tres veces y arrojaron esencialmente los mismos perfiles mostrados aquí.

F. Proteína recombinante TcCK1.1

1. Análisis de la expresión de la proteína recombinante TcCK1.1

Se clonó el gen *TcCK1.1* en el vector pET22b⁺ y se expresó en bacterias *E. coli* C41(DE3). Los extractos inducidos mostraron la producción de un polipéptido de aproximadamente 36 kDa (figura F1A) que permaneció en la fracción precipitada del lisado crudo (figura F1B). El tamaño de la proteína sobreexpresada coincidía con el peso molecular previsto, de 36 kDa para el péptido del marco abierto de lectura. Debido probablemente a que CK1 afecta las funciones bacterianas, se obtuvo poca cantidad de la proteína recombinante, lo que dificultó la cuantificación de la concentración de proteína, como se ha observado en otras ocasiones. Sin embargo, esta proteína tiene una alta actividad específica, como indican Klimczak et al (Klimczak, Farini et al. 1995). Para optimizar la producción de la proteína TcCK1.1 recombinante, se cambió la temperatura de inducción de 37°C a 19°C y también se extendió el tiempo de incubación hasta 18 h. Aun así, la inmunodetección en la fracción soluble no arrojó ninguna señal. Se procedió a purificar esta fracción incubándola en una columna de Ni-NTA agarosa y eluyéndola luego con un gradiente lineal de concentración de imidazol. La actividad de las fracciones se determinó por su funcionalidad cinética, como se describe abajo, y aquellas con mayor actividad se combinaron y concentraron antes de analizarlas en un gel SDS-PAGE que fue luego teñido con azul de Coomassie (figura F1B). Al mismo tiempo se transfirió otro gel de estas características para realizarle una inmunodetección. Con esta estrategia se pudo detectar la presencia de la proteína recombinante (figura F1C).

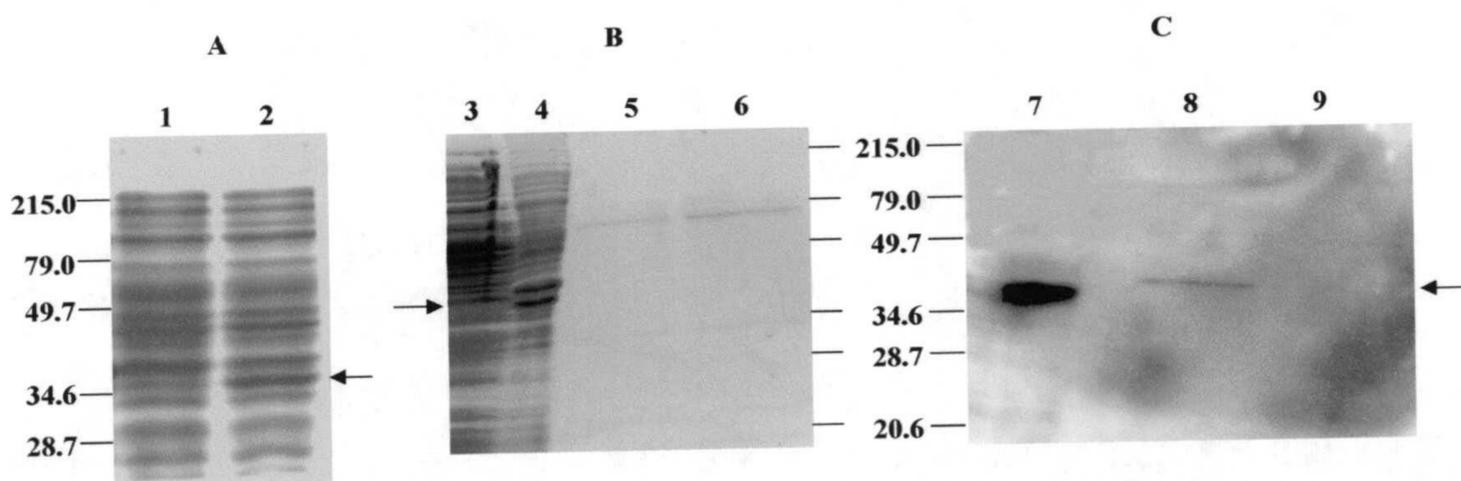


Figura F1. Sobreexpresión y purificación de TcCK1.1 recombinante. (A) Tinción del gel SDS-PAGE, con azul de Coomassie, de las proteínas totales de las bacterias *E. coli* transformadas con pET 22b⁺ (lane 1) y TcCK1.1/pET 22b⁺ (lane 2) después de la inducción con IPTG. (B) Tinción del gel que contiene el sobrenadante (carril 3) y el precipitado (carril 4) de los extractos crudos de TcCK1.1/pET 22b⁺; proteínas de fusión a cola de histidina purificadas

en una columna de Ni-NTA agarosa: fracción conteniendo la máxima actividad CK1 (carril 5) y fracción sin ninguna actividad (carril 6). (C) Análisis por Western blot de los extractos totales inducidos (carril 7), de la fracción con la máxima actividad CK1 (carril 8), y de una fracción sin actividad CK1 (carril 9) usando un anticuerpo monoclonal anti 6X-His (a una dilución de 1:1000) como se describe en Materiales y Métodos. Las flechas apuntan a la posición de TcCK1.1. Los patrones de peso molecular (kDa) eran de Bio-Rad.

F2. Análisis de parámetros cinéticos de la proteína TcCK1.1

Se usó TcCK1.1 recombinante para realizar ensayos enzimáticos según los procedimientos descritos en Materiales y Métodos. Las fracciones eluidas de la columna de Ni-NTA agarosa se analizaron en base a sus actividades CK1. Aquellas fracciones que estaban dentro del pico de actividad se unieron, se concentraron y se usaron para los ensayos cinéticos. Se encontró que las K_m aparentes para β -caseína y el péptido sustrato específico para CK1 eran de 5.7 mg/ml y 128 μ M, respectivamente. Para el ATP, la proteína TcCK1.1 mostró una K_m aparente de 56.2 μ M. Cuando se usó el péptido específico para CK1 como sustrato se obtuvo una inhibición cercana al 40% con 100 μ M del inhibidor CK1-7 y 100 μ M de ATP. La heparina ha sido utilizada como criterio para distinguir entre las proteínas quinasas CK1 y CK2 (Pulgar, Tapia et al. 1996) ya que es un inhibidor específico de las proteínas CK2. Se observó que la heparina apenas disminuía la actividad de TcCK1.1 (alrededor de un 10% a la máxima concentración utilizada, que fue de 30 μ g/ml). El otro compuesto utilizado, HD, es un potente inhibidor natural de CK1 (Meijer, Thunnissen et al. 2000). Cuando se estudió el efecto de HD sobre CK1, se observó que la actividad CK1 se inhibía significativamente, tanto cuando se usaron extractos de parásitos (IC₅₀, 23 nM), como cuando se utilizó proteína TcCK1.1 recombinante (IC₅₀, 13 nM) (figura F6). Así pues, en cuanto a los parámetros bioquímicos generales, la proteína TcCK1.1 recombinante mostró propiedades características de la familia de enzimas CK1.

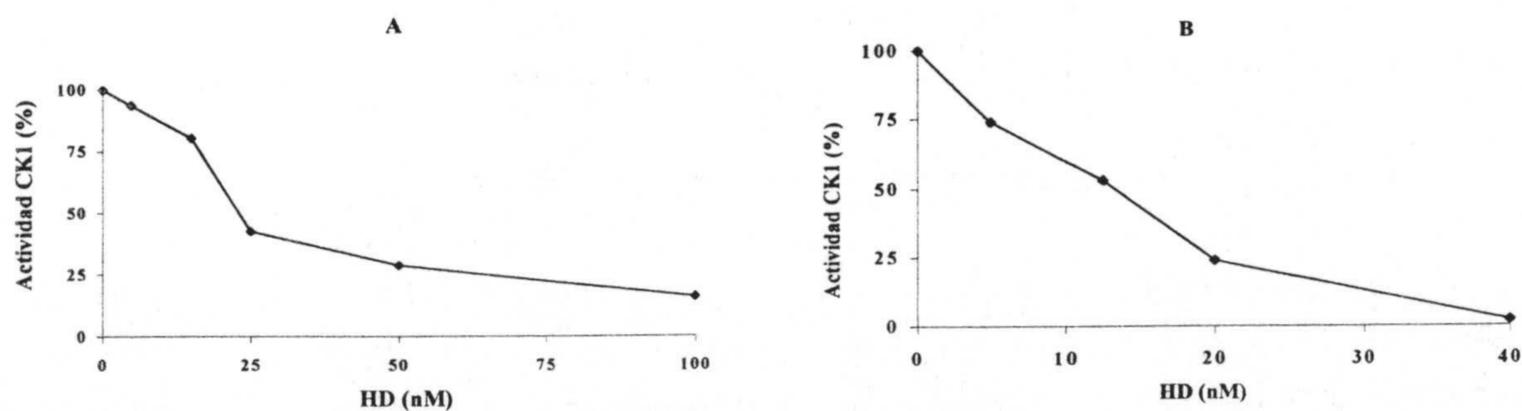


Figura F2. Efecto de HD sobre la actividad CK1 de *T. cruzi*. La actividad CK1 fue analizada usando 300 μ M del péptido sustrato específico de CK1 y 100 μ M de ATP sobre extractos de epimastigotas de *T. cruzi* (Panel A) y sobre proteína TcCK1.1 recombinante purificada (Panel B). Se añadieron concentraciones crecientes de HD (0, 5, 15, 25, 50 y 100 nM para los extractos de parásitos y 0, 5, 12.5, 20 y 40 nM para la TcCK1.1 recombinante).

G. Transfectantes CK1 y CK1/GFP de *T. cruzi*

G1. Sobreexpresión de CK1 de los transfectantes

G1a. Expresión ARNm de los genes CK1 transfectados

Después de conseguir parásitos transfectados resistentes al antibiótico de selección (ver Materiales y Métodos) la sobreexpresión de los genes transfectados fue analizada mediante Northern blots hibridados con sondas específicas para cada gen. La expresión de los ARNm de los parásitos transfectados con los genes *TcCK1.1* y *TcCK1.2* ligados al vector pRIBOTEX fue comparada con la de los parásitos transfectados con el vector vacío (figura G1a1). La construcción 1.1/pRIBOTEX no mostró sobreexpresión alguna a nivel de ARN

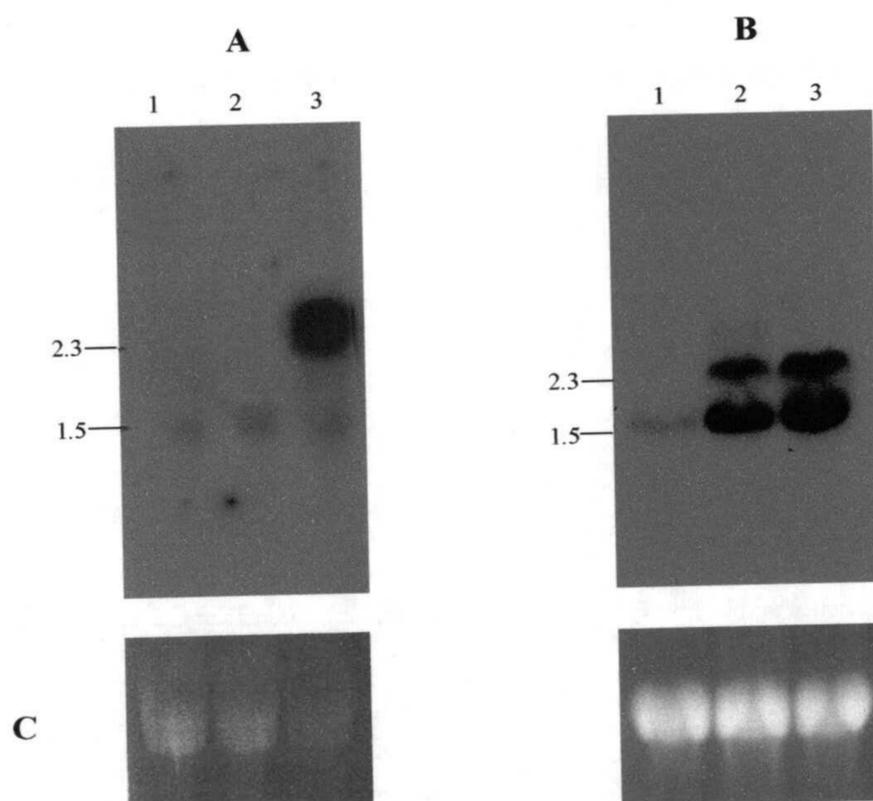


Figura G1a1. Se analizó por Northern blot ARN total (20µg) de los parásitos transfectados de la cepa Y de *T. cruzi*. (A) La expresión de ARNm de CK1 del vector pRIBOTEX vacío (carril 1) se comparó con la de los parásitos transfectados con los genes *TcCK1.1* (carril 2) y *TcCK1.1*/GFP (carril 3), ambos clonados en el vector pRIBOTEX. Se utilizó la sonda específica del gen *TcCK1.1*. (B) La expresión de ARNm de CK1 del vector pRIBOTEX vacío (carril 1) se comparó con la de los parásitos transfectados con los genes *TcCK1.2* (carril 2) y *TcCK1.2*/GFP (carril 3), también clonados en pRIBOTEX. Se usó la sonda específica para el gen *TcCK1.2*. (C) Imágenes de los ARN ribosomales teñidos con bromuro de etidio. Los mismos se usaron como marcadores de tamaño (kb).

pero sí la construcción 1.1/GFP/pRIBOTEX (figura G1a1A). En cambio la transfección con el gen *TcCK1.2* con y sin fusión a GFP mostró una sobreexpresión significativa con relación a la expresión del gen constitutivo

(figura G1a1B). Para confirmar que los genes transfectados con fusión a GFP eran procesados de forma continua con la proteína fluorescente se utilizó la sonda GFP para hibridar un northern de los transfectantes fluorescentes comparados con el vector vacío pRIBOTEX. Como se puede observar en la figura G1a2, el tamaño de los transcritos de los genes *TcCK1.1* y *TcCK1.2* fusionados a GFP está por encima de la señal para el ARNm del transfectante con sólo la cola GFP. La especificidad de la sonda se puede observar en la falta de señal del carril control con el vector vacío.

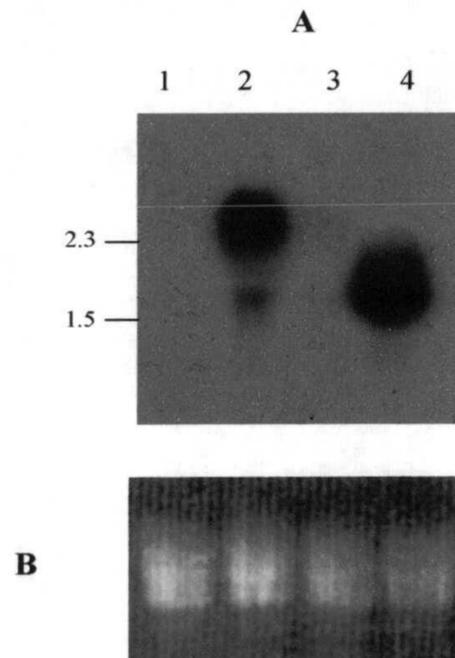


Figura G1a2. Expresión de las construcciones con GFP. (A) Northern blot de los parásitos transfectados con: el vector vacío pRIBOTEX (carril 1), *TcCK1.2/GFP/pRIBOTEX* (carril 2), *TcCK1.1/GFP/pRIBOTEX* (carril 3) y *GFP/pRIBOTEX*. La sonda utilizada era específica para la GFP. Se usaron los ARN ribosomales como marcadores de tamaño (kb). (B) Tinción de los ARN ribosomales con bromuro de etidio como control de carga.

G1b. Análisis de la sobreexpresión de proteínas CK1 en los transfectantes

Las proteínas totales de los parásitos transfectados con las construcciones pRIBOTEX, 1.1/pRIBOTEX, 1.2/pRIBOTEX, GFP/pRIBOTEX, 1.1/GFP/pRIBOTEX y 1.2/GFP/pRIBOTEX se extrajeron y analizaron por tinción con azul de Coomassie de un gel SDS-PAGE. No se observó, por este método, sobreexpresión de las proteínas transfectadas (figura G1b)

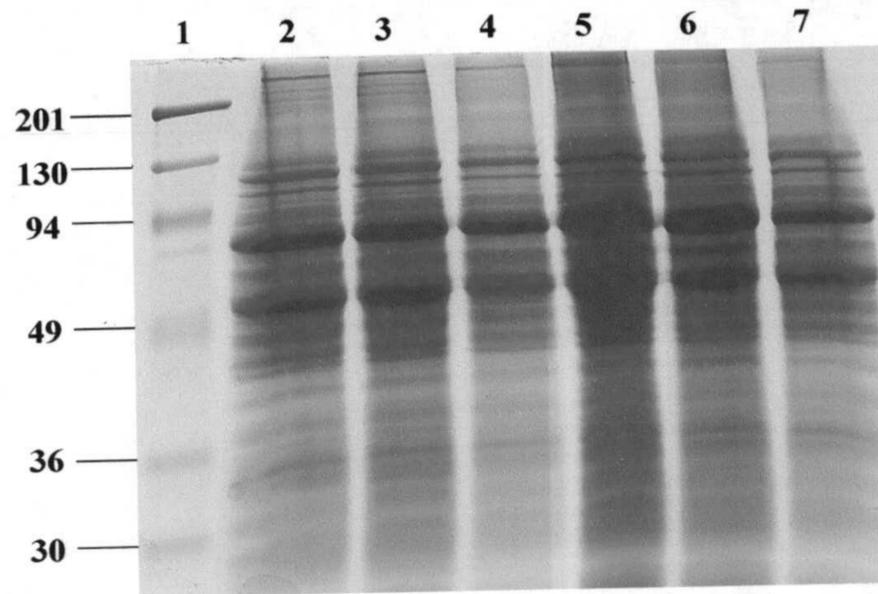
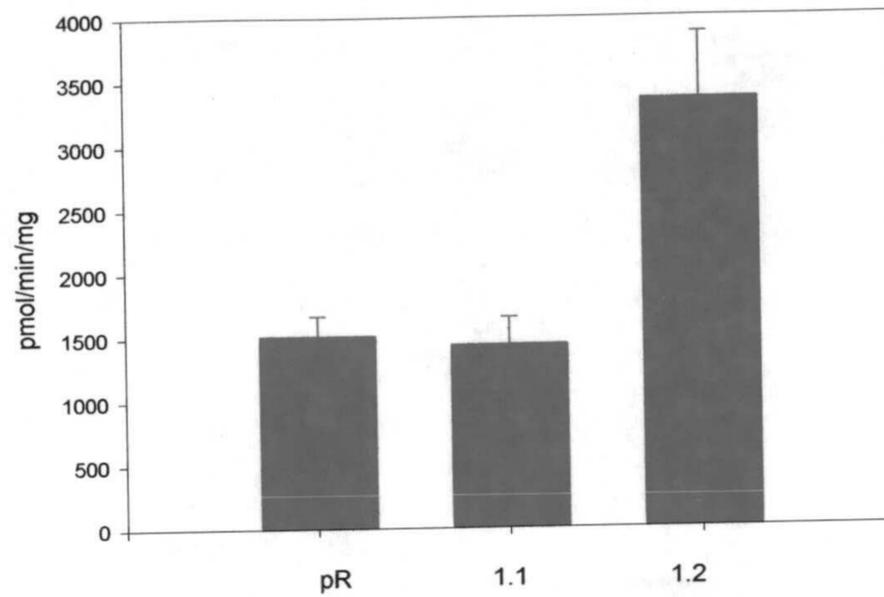


Figura G1b. Tinción con azul de Coomassie del gel SDS-PAGE que contiene las proteínas totales de los parásitos transfectados con las construcciones: pRIBOTEX (carril 2), GFP/pRIBOTEX (carril 3), 1.1/pRIBOTEX (carril 4), 1.2/pRIBOTEX (carril 5), 1.1/GFP/pRIBOTEX (carril 6)) y 1.2/GFP/pRIBOTEX (carril 7). El carril 1 muestra los patrones de peso molecular (kDa) de BioRad.

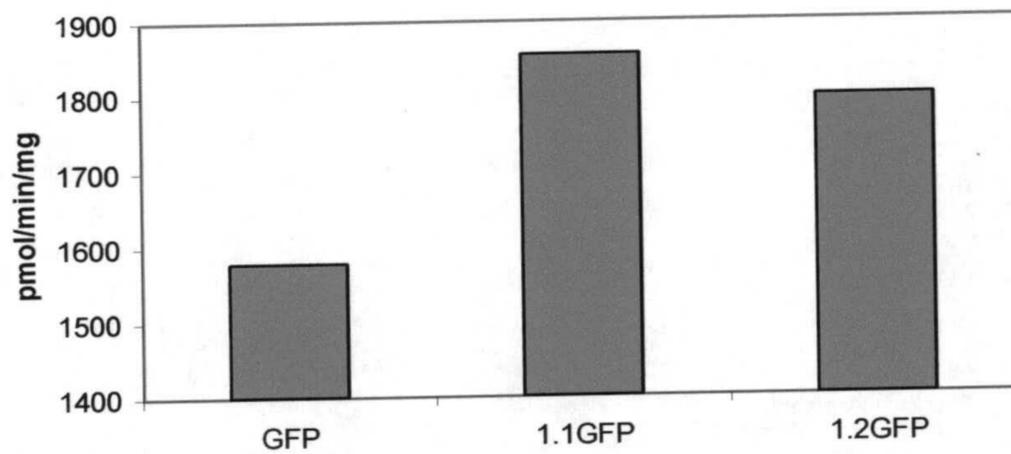
G1c. Análisis de la sobreexpresión de actividad CK1 en los transfectantes

Se analizó la actividad CK1 de los transfectantes con las construcciones 1.1/pRIBOTEX, 1.2/pRIBOTEX, 1.1/GFP/pRIBOTEX y 1.2/GFP/pRIBOTEX para comprobar que los parásitos transfectados con estos genes poseían una mayor actividad CK1 que aquellos transfectados con el vector vacío o con el vector fusionado a GFP (figura G1cA y B). Se observó que no había sobreexpresión de actividad CK1 en los parásitos transfectados con el gen *TcCK1.1*. Sin embargo aquellos que incluían la transfección con el gen *TcCK1.2* sobreexpresaron la actividad quinasa con una media de dos veces más capacidad de fosforilar el sustrato específico para CK1 que el control (figura G1cA). Para ésta última sobreexpresión el análisis estadístico del student t arroja un valor de $p < 0.0005$.

En cuanto a la actividad CK1 de los transfectantes fluorescentes, se observó una ligera subida en la actividad específica para los transfectantes *TcCK1.1/GFP* y un incremento también para la construcción *TcCK1.2/GFP* con respecto al control del vector fusionado a la proteína verde (GFP) (Gráfica G1cB). La aplicación del student t-test corrobora que la diferencia entre las actividades es significativa: $p < 0.015$ para *TcCK1.1/GFP* y *TcCK1.2/GFP* con respecto a GFP.



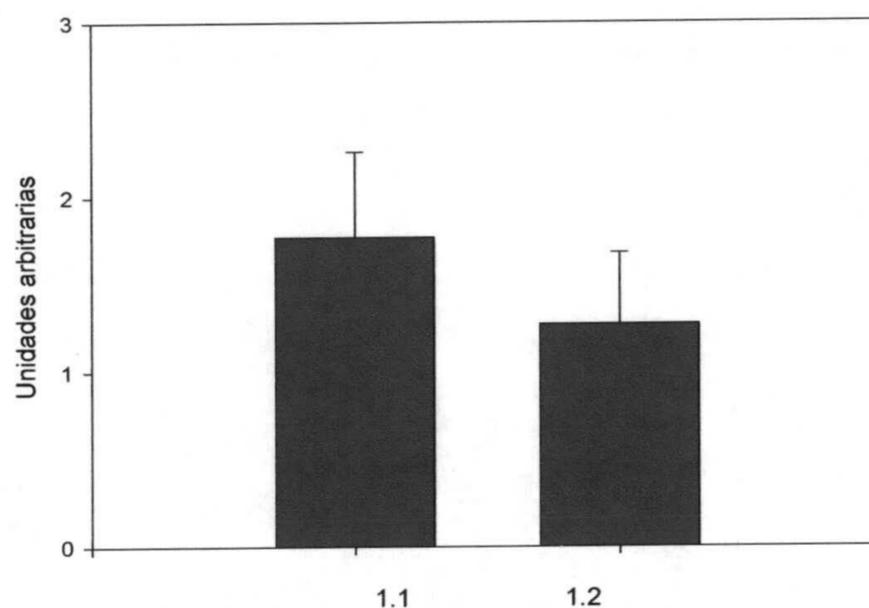
Gráfica G1cA. Determinación de la actividad específica de los transfectantes CK1 de *T. cruzi*. (A) La actividad de los parásitos transfectados con el vector vacío (pR) es comparada con la de aquellos transfectados con los genes *TcCK1.1* (1.1) y *TcCK1.2* (1.2). La gráfica representa la media de los datos de siete experimentos independientes.



Gráfica G1cB. Determinación de la actividad específica de los transfectantes CK1/GFP de *T. cruzi*. El vector de transfección ligado a la proteína verde (GFP) es utilizado como control para medir la actividad de los parásitos que sobreexpresan las proteínas de fusión *TcCK1.1/GFP* (1.1/GFP) y *TcCK1.1/GFP* (1.2/GFP). La gráfica representa la media de los datos de dos experimentos independientes.

G2. Estudio de la sensibilidad a inhibidores

Se analizó el efecto que los inhibidores NG-95 y NG-97 tenían sobre los transfectantes que sobreexpresaban la actividad CK1. Para ello se realizaron estudios de viabilidad de parásitos crecidos en cultivo en presencia de dichos inhibidores. El método del MTT con controles en ausencia de los compuestos permitió la determinación de la IC50 de los parásitos, que, en el caso del NG-97, resultó ser de casi dos veces más elevada para los parásitos TcCK1.1 y sólo ligeramente más alta para los TcCK1.2 (ver gráfica G2) comparada con los controles pRIBOTEX



Gráfica G2. Número de veces en que los transfectantes CK1 resisten la acción de NG-97. Parásitos transfectados con los genes *TcCK1.1* (1.1) y *TcCK1.2* (1.2) son comparados con el control (vector vacío) en cuanto a su IC50 para el inhibidor NG-97. Las determinaciones de las concentraciones inhibitorias se realizaron por el método del MTT según descrito en Materiales y Métodos. Los datos mostrados son la media de cinco experimentos independientes.

En cuanto a la sensibilidad de los parásitos transfectantes al inhibidor NG-95 no se encontraron inhibiciones significativas en los niveles micromolares del inhibidor.

G3. Microscopía de transfectantes TcCK1.1 y TcCK1.2 fusionados a GFP

El análisis por microscopía confocal reveló que la localización de las proteínas quimeras TcCK1.1/GFP y TcCK1.2/GFP se encuentra mayoritariamente cerca del bolsillo flagelar para TcCK1.1/GFP y además de forma perinuclear para TcCK1.2/GFP (ver figura G3B y C). Las figuras se comparan con las de la localización nuclear del control GFP (figura G3A).

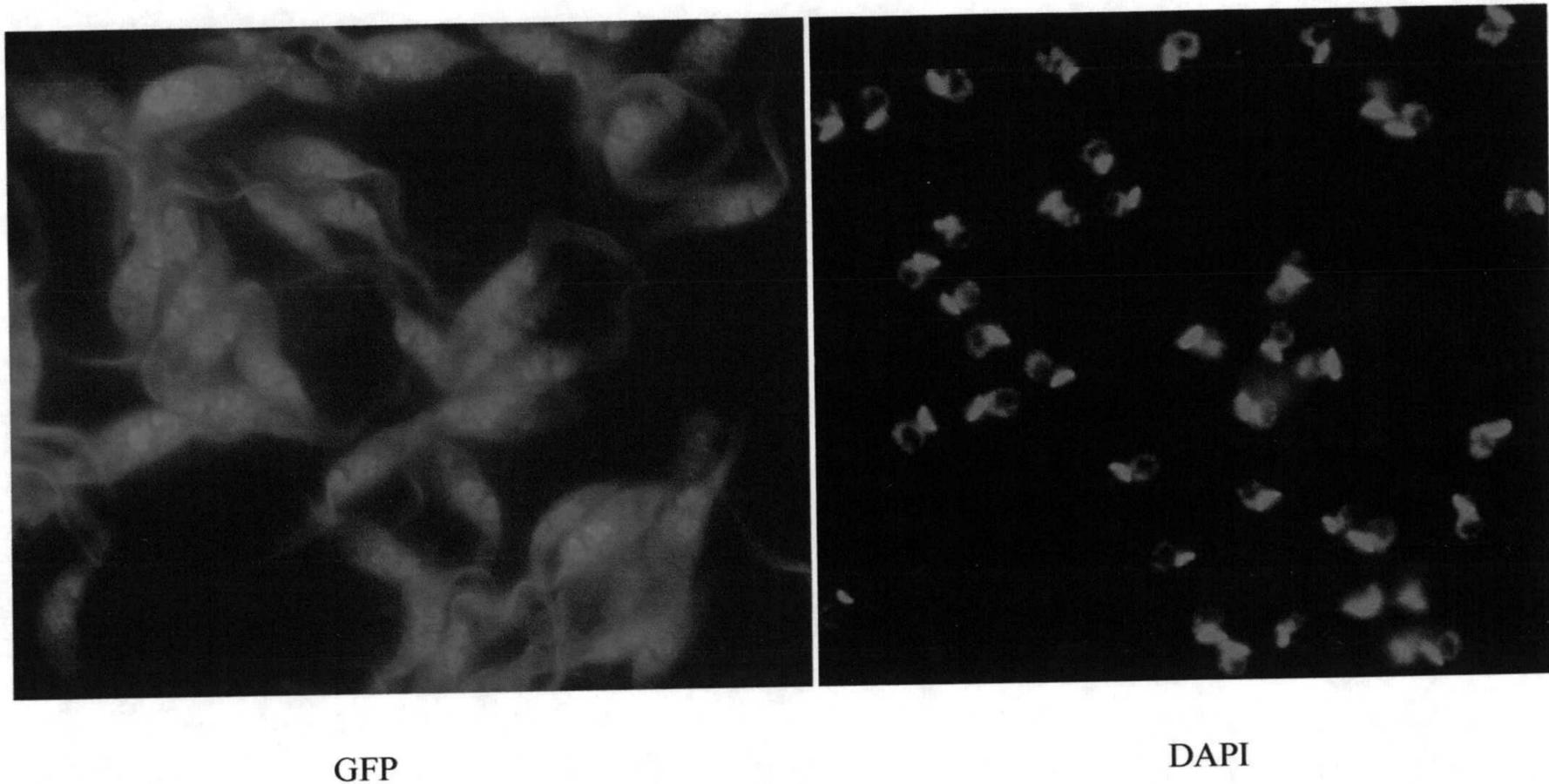


Figura G3A. GFP se localiza en el núcleo. Parásitos transfectados con la proteína verde (GFP) fueron observados con un aumento de 63X y un filtro azul para detectar su fluorescencia verde, y con un filtro UV para detectar la fluorescencia producida por la tinción con DAPI (ver Materiales y Métodos).

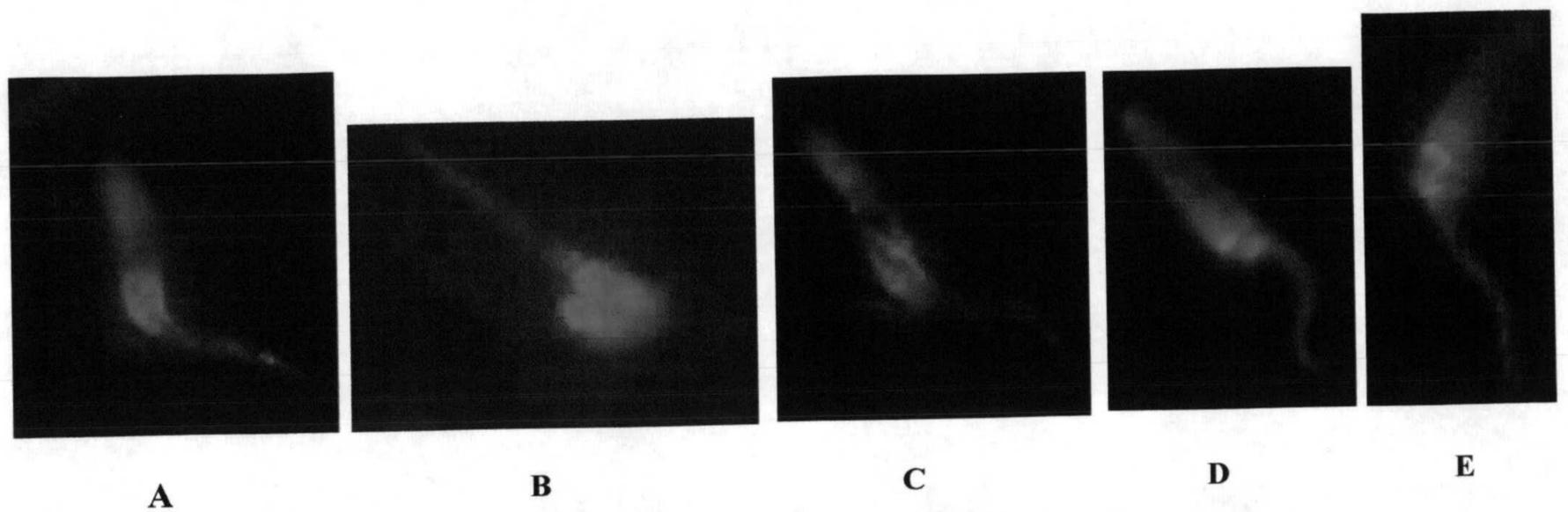


Figura G3B. La proteína TcCK1.1/GFP se concentra mayoritariamente en estructuras cercanas al bolsillo flagelar. Transfectantes *T. cruzi* conteniendo la proteína TcCK1.1 fusionada a GFP (A-E) fueron observados *in vivo* con un objetivo 100X y un filtro para GFP. (A-E) Tomas de diferentes parásitos.

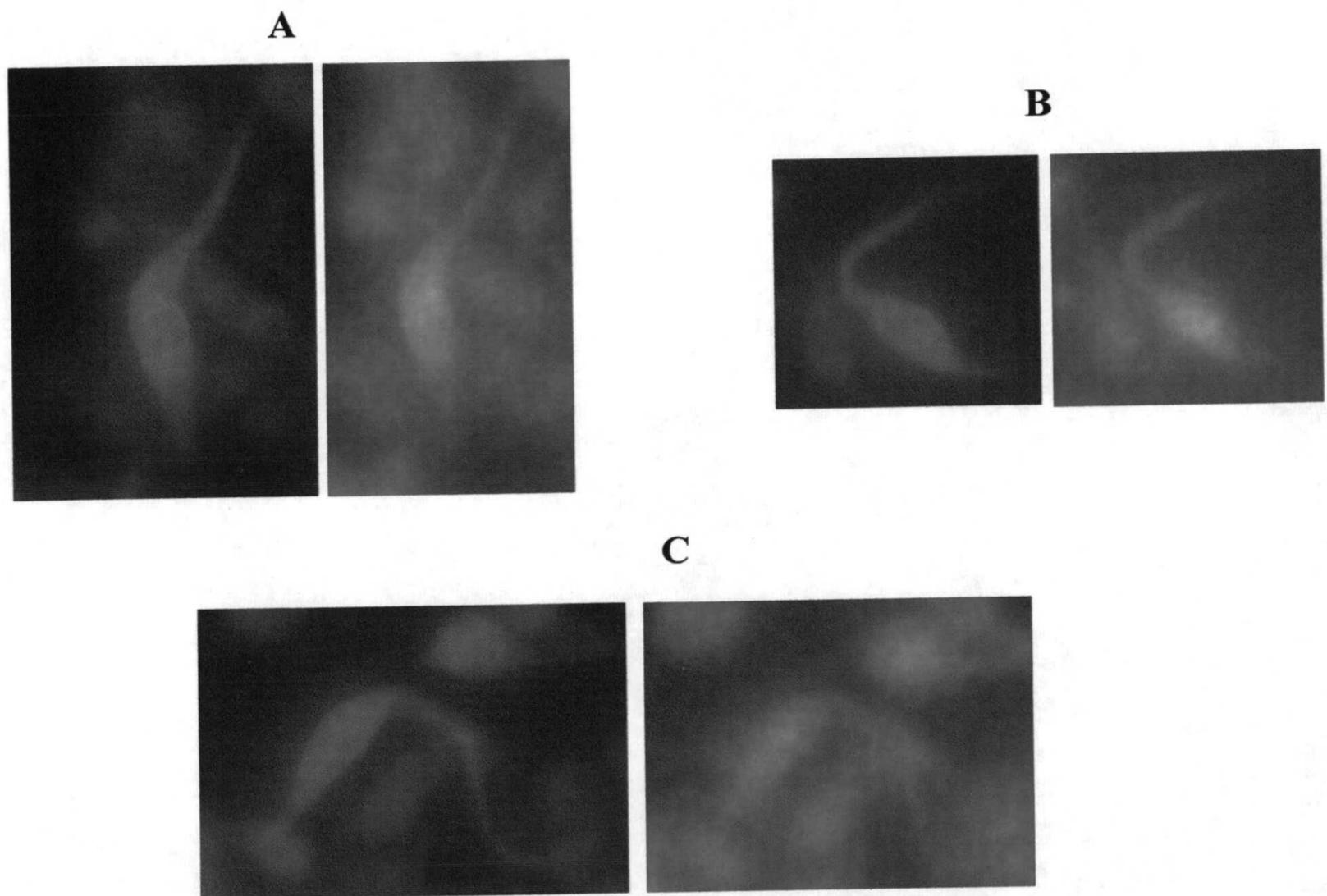


Figura G3C. Localización de la proteína quimera TcCK1.2/GFP. Los parásitos *T. cruzi* transfectados con la construcción para la proteína TcCK1.2 unida a GFP fueron fijados y teñidos con PI como se describe en Materiales y Métodos. (A-C) Diferentes tomas con un objetivo 100X muestran al lado izquierdo la fluorescencia por GFP y al lado derecho, aquella por PI.

DISCUSIÓN

V. Discusión

Se aislaron dos genes de *T. cruzi* que codifican proteínas homólogas a la familia de quinasas CK1. Ambos genes *TcCK1* parecen localizarse en dos cromosomas. Sin embargo, teniendo en mente que este organismo es diploide y que se han descrito polimorfismos alélicos en él (Dujardin 2000), esta localización probablemente se trata de dos alelos de distinto tamaño del mismo cromosoma. Una característica importante de las isoformas *TcCK1* es que a pesar de que uno de sus genes, *TcCK1.1*, es un gen de dos copias (por genoma haploide), el otro, *TcCK1.2*, es un gen multicopia, el único descrito hasta ahora.

CK1 es una familia de quinasas Ser/Tre altamente conservadas en su dominio catalítico: son idénticos en más de un 50%, presentando la mayoría de las diferencias en sus extremos amino y carboxilo terminal. En estas diferencias está basada la mayoría de la clasificación de las isoformas. Las isoformas CK1 han sido agrupadas en tres ramas mayoritarias (Gross and Anderson 1998): enzimas localizadas exclusivamente en el citoplasma, en donde interaccionan con la membrana plasmática, y que están representadas por las YCKs y Cki1; enzimas localizadas mayoritariamente en el núcleo, donde regulan la reparación del ADN y cuyo mejor ejemplo se encuentra en la HRR25; y, finalmente, enzimas que parecen distribuirse en muchos lugares de la célula (donde realizarían funciones tan diversas como regulación de la mitosis o transducción de señales) y que estarían representadas por las isoformas CK1 β y CK1 α . Los homólogos de CK1 de *T. cruzi* son similares a muchas de las isoformas CK1 de mamíferos y levaduras y no se les puede adscribir una función particular basándonos sólo en las similitudes de secuencia. Ambos genes contienen casi todos los residuos que son característicos de estas proteínas quinasas, pero con algunas diferencias. El aspecto más destacable de las secuencias de los homólogos *TcCK1*, es una singular inserción de tres residuos en el dominio catalítico, ausentes en todas los demás miembros de la familia descritos hasta hoy; dicha inserción ocuparía un lugar en el bucle que une la hélice αA con la lámina $\beta 4$ (LA4) (Xu, Carmel et al. 1995). Este bucle se localiza detrás del sitio de unión de ATP, donde estos tres residuos podrían influir sobre la unión del nucleótido. Esta inserción en la secuencia podría explicar algunas diferencias bioquímicas en *TcCK1.1*. Como el subsitio donde se localizaría el trifosfato está altamente conservado a través de la superfamilia de quinasas, cualquier diferencia encontrada en los residuos que bordean el bolsillo para la purina son claves para el diseño de agentes específicos que puedan interferir con la actividad enzimática. En la búsqueda de principios activos eficaces contra las enfermedades parasitarias, las enzimas diana deben ser lo suficientemente distintas de sus homólogas en el hospedador como para que el fármaco utilizado solo afecte al parásito. Llama mucho la atención que Knockaert y col. (Knockaert, Gray et al. 2000) describieran cómo una matriz de purvalanol (un derivado de purina) unía algunas CK1 de protozoos, entre ellas la de *T. cruzi*, y no las de otras especies. ¿Podrían estos tres residuos ser la explicación de dicha observación en el caso de este tripanosomátido?

Cuando buscaban inhibidores específicos de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), Meijer et al encontraron la himenialdisina (HD) (Meijer, Thunnissen et al. 2000), un inhibidor de las CDK1, CDK5, GSK3- β y CK1, con una IC50 de 22, 28, 10 y 35 nM, respectivamente. Nosotros hemos probado HD sobre la CK1 de *T. cruzi*, y hemos obtenido una IC50 de 23 nM para la actividad CK1-like del parásito y de 13 nM para la actividad CK1 de la proteína TcCK1.1 recombinante. En todos los experimentos utilizamos el péptido sustrato específico para CK1. La especificidad de este péptido, prácticamente anula toda posibilidad de detectar señales de fosforilación procedentes de otras quinasas (algo que parece confirmarse por el hecho de que la inhibición de TcCK1.1 recombinante muestra un patrón casi idéntico al de los extractos totales del parásito *T. cruzi*); esto indicaría que la mayoría de la actividad cuantificada en estos últimos es exclusiva de la acción de CK1 y no de otras quinasas presentes en el extracto parasitario.

Otro inhibidor de algunas CK1, la heparina (que es un polianión que sirve para distinguir entre las dos caseína quinasas: CK1 y CK2) se probó en la TcCK1.1 recombinante. Se obtuvo una muy baja inhibición (30%) a 30 μ g/ml. Esta cifra es comparable con los datos publicados para la CK1 de mamíferos, que tiene una IC50 de 24 μ g/ml cuando se utiliza caseína a 2 mg/ml como sustrato (Kuret, Woodgett et al. 1985), mientras que la IC50 de CK2 a las mismas condiciones es ≤ 0.15 μ g/ml (Padmanabha R 1987). Aparte de estos datos, los parámetros cinéticos de la TcCK1.1 recombinante apuntan a una diferencia estructural entre las CK1 de *T. cruzi* y la mayoría de las de otros organismos estudiados. Por ejemplo, TcCK1.1 tiene una de las K_m para ATP más altas de todas las publicadas para la familia (con la excepción de K_m de la CK1 del núcleo de hígado de rata y levaduras (Gross and Anderson 1998)). Para la β -caseína encontramos una K_m también más alta que para la mayoría de otros organismos (Barik, Taylor et al. 1997), (Pulgar, Tapia et al. 1996), (Vancura, O'Connor et al. 1993), (Itarte E 1981), (Klimczak and Cashmore 1993); sin embargo, cuando se utilizó el péptido específico para CK1 como sustrato, nuestra TcCK1.1 nos dio una K_m un poco menor que la calculada para otras CK1 (Pulgar, Tapia et al. 1996). Es pertinente mencionar que la concentración de NaCl usada en los ensayos de actividad CK1 varía de grupo a grupo. Sin embargo, basándonos en los estudios llevados a cabo por Calabokis y col. (Calabokis, Kurz et al. 2002) sobre la concentración óptima de sales para una CK1 parcialmente purificada en *T. cruzi*, la concentración utilizada por nosotros (150 mM) varía sólo un 30% de la máxima, ó un 60% de la mínima actividad posible sin la adición de ninguna sal. Por ello, la mayoría de nuestras comparaciones están hechas con grupos que usaron condiciones similares a las nuestras en sus ensayos. Finalmente, la baja inhibición detectada en nuestra actividad TcCK1.1 con el inhibidor CK1-7, denota que la afinidad por el sitio de unión a nucleótido es más baja que para otras especies (Fish, Cegielska et al. 1995), (Barik, Taylor et al. 1997). Estas observaciones se confirman con el trabajo de Calabokis y col. (Calabokis, Kurz et al. 2002) cuando determinan los parámetros bioquímicos de su CK1 parcialmente purificada en *T. cruzi*; estos cuales están de acuerdo, en la mayor parte, con los que nosotros hemos obtenido. Es más, Vancura y col. (Vancura, O'Connor et al. 1993) trabajaron con un homólogo de CK1 en levadura, YCK2, y encontraron sólo un 30% de inhibición a concentraciones de hasta 500 μ m. Así pues, no es tan inusual encontrar algún miembro de la familia para el cual

el inhibidor específico de CK1 no actúa tan eficientemente. Esta es otra clave que apunta a una estructura diferente para las CK1 de *T. cruzi*, lo que las hace aún más relevantes a la hora de buscar posibles dianas terapéuticas contra el parásito.

Como se mencionó antes, una peculiaridad de los genes CK1 caracterizados aquí es el hecho de que uno de ellos está organizado en tándem. En muchos organismos se han encontrado CK1 presentes bajo varias isoformas, o como diferentes productos de procesamientos alternativos; pero en nuestro caso, hemos dado con una única isoforma, *TcCK1.2*, repetida varias veces. En los tripanosomátidos, muchos genes constitutivos están presentes como grandes grupos de repeticiones en tándem. Estas duplicaciones podrían estar relacionadas con la regulación de la expresión de dichos genes. De hecho, *TcCK1.2* está mucho más expresado que *TcCK1.1*. Un análisis comparativo de la expresión del ARNm de los *TcCK1s* refleja una contribución significativa de *TcCK1.1* en la fase infectiva del parásito. Aparte de esto, parece que *TcCK1.1* no contribuye demasiado a la expresión general de las *TcCK1s*. No podemos descartar la posibilidad de que haya alguna otra isoforma que contribuya a la expresión global de la expresión y la actividad de CK1 en *T. cruzi*, particularmente con respecto a la expresión de ARNm en las formas amastigotas donde el aumento de señal pareciera ser superior al de la suma de las dos isoformas que nosotros hemos aislado en este trabajo. Los resultados de las determinaciones de actividad enzimática en los tres estadios del parásito, revelan que las dos formas que viven en mamíferos, (amastigotas y tripomastigotas), tienen una actividad CK1 significativamente superior a la de la forma que vive en insecto. El punto común de los estadios mamíferos es la necesidad de ajustarse a un medio fisiológico y a necesidades celulares tales como temperatura, señalización parásito-hospedador, tráfico, etc. (factores que pueden requerir la presencia de numerosos reguladores del metabolismo, como CK1). El hecho de que la actividad CK1 presente diferencias con respecto a la expresión ARNm, puede ser atribuido a modificaciones post-traduccionales como proteólisis, fosforilación y localización de la proteína, los que han sido descritos para otros homólogos de CK1 (Graves 1995), (Zhai, Graves et al. 1995).

La expresión del ARNm de *TcCK1.1* varía a lo largo del ciclo celular, mientras que la de *TcCK1.2*, después de liberarse del bloqueo por hidroxurea, sube a niveles que tienden a mantenerse constitutivamente altos. A pesar de esta expresión constante del ARNm, se observa una caída en la actividad CK1 en medio del ciclo celular, probablemente (tal como hemos anotado antes) respondiendo a algún tipo de regulación post-traducciona. Los resultados de los ensayos de actividad CK1 en los cultivos sincronizados, muestran un aumento que corresponde a la entrada celular en la fase S (confirmada ésta por determinaciones de incorporación de timidina tritiada) y, probablemente, en la M. La presencia de un pico de actividad en mitosis confirma los hallazgos de otros grupos (Behrend, Stoter et al. 2000), (Robinson, Hubbard et al. 1992) y necesita ser mejor caracterizada todavía en *T. cruzi*. Lo que sí resultó sorprendente y nuevo fue encontrar un pico de actividad durante la fase de síntesis de ADN que aparecía constantemente en todos nuestros ensayos. Los sustratos de CK1 descritos en otros organismos, y su acción sobre ellos, también parecen indicar que existiría

una función de CK1 en la regulación de la replicación de ADN (como en el caso del bloqueo del origen de replicación de antígeno T grande del virus SV40 (Cegielska and Virshup 1993)). Así pues, no se puede descartar un probable papel de las TcCK1 en el control del crecimiento y del ciclo celular. Este concepto es apoyado con nuestros estudios de actividad CK1 durante el crecimiento de las formas epimastigotas de *T. cruzi*, que reflejan que, aunque hay siempre una actividad en células con muy poca o ninguna actividad replicativa, sí hay un aumento evidente de actividad CK1 durante la fase logarítmica de replicación celular.

Un posible nexo que uniría todas nuestras observaciones de este estudio con la probable función de las TcCK1, está en la fosforilación de proteínas estructurales. Tubulina, troponina, miosina, la banda 4.1, kinesina, tau y dineína flagelar (todas ellas proteínas relacionadas con la estructura) han sido descritas como posibles sustratos de CK1 (Tuazon and Traugh 1991), (Singh, Grundke-Iqbal et al. 1995), (Yang and Sale 2000). Algunas de ellas necesitarían la acción de una u otra isoforma CK1 en *T. cruzi*, dependiendo del estadio de vida en que se encontrara el parásito. Dineína, aparte de estar presente en el flagelo, es una proteína motora de microtúbulos, presente en los husos mitóticos y centrosomas, que tiene un importante papel en mitosis cuando los microtúbulos construyen la estructura necesaria para la segregación de los cromosomas. CK1 también ha sido relacionada con los centrosomas y los husos mitóticos (Brockman, Gross et al. 1992), más evidentemente después de daño al ADN, al fosforilar la proteína supresora de tumores, p53 (Knippschild, Milne et al. 1997). Igualmente, HRR25 está relacionada con reparación de ADN en *S. cerevisiae* (Hoekstra, Liskay et al. 1991) y la CK1 α de *D. melanogaster* está inducida cuando se perturba el ADN (Santos, Logarinho et al. 1996). Nuestras proteínas TcCK1 podrían jugar papeles similares en *T. cruzi*. No sólo tienen en su secuencia una señal de localización nuclear, que los habilitaría espacialmente para actuar durante el ciclo celular, sino que también tienen una secuencia homóloga a kinesina, lo cual es otra razón para plantearse una posible relación que CK1 tenga con proteínas estructurales (especialmente con aquellas asociadas a los microtúbulos). Nuestros resultados parecen apoyar esta posibilidad. Primero, las fracciones subcelulares que contienen la mayor parte de la actividad CK1 son aquellas enriquecidas con membranas, donde se localizan las proteínas del citoesqueleto. Segundo, la actividad CK1 muestra un pico durante las fases S y M del ciclo celular, especialmente en M, cuando la presencia de los microtúbulos resulta vital. Más aún, además de verlo en los cultivos sincronizados, lo vemos cuando los parásitos están en su punto más álgido de replicación, esto es, en la fase logarítmica de crecimiento en cultivo; entonces la actividad CK1 alcanza su pico. Tercero, el hecho de que una de las isoformas esté repetida en tándem apunta a que haya un gran requerimiento de la actividad CK1, lo que usualmente sucede con enzimas cuyos sustratos son proteínas estructurales con gran necesidad de sus enzimas reguladoras. Cuarto, es en el área cercana al bolsillo flagelar donde comienza la división del nuevo parásito cuando llega el momento de la replicación, y es allí donde parece localizarse una de las isoformas TcCK1. Todo lo dicho antes parece llevarnos a dilucidar una relación futura entre las TcCK1 y proteínas del citoesqueleto tales como microtúbulos, proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), o proteínas motoras de microtúbulos, como kinesina y dineína.

CK1 ha sido descrita como una enzima pleiotrópica, lo cual significa que podría estar involucrada en metabolismo, movilidad, tráfico y/o señalización. La presencia de una expresión y actividad de TcCK1 en el parásito, sin importar el estadio de vida en que se encuentre (con todas las diferencias fisiológicas que ello implica) parece apoyar esta idea. Por ello es particularmente importante encontrar inhibidores específicos de esta enzima en los parásitos *T. cruzi*. Nuestros estudios con los derivados del purvalanol NG-95, y particularmente NG-97, podrían arrojar información importantísima en el diseño racional de fármacos dirigidos contra las TcCK1. Nuestro transfectante CK1, que sobreexpresa la isoforma TcCK1.2, es un valioso instrumento en este sentido. Por otro lado, los ensayos de microscopía fluorescente en directo, sin la intervención de compuestos externos como los que se utilizan en las detecciones de inmunofluorescencia indirecta, permiten tener una mayor panorámica de la posible función de la proteína, a juzgar por su localización subcelular.

La posibilidad de que sea una proteína multifuncional, junto con el hallazgo de que las secuencias tienen una inserción única que probablemente les dota de diferencias estructurales con respecto a otras CK1, hace de las isoformas TcCK1 un factor muy relevante cuando se consideran blancos moleculares en la lucha contra la enfermedad de Chagas. Al mismo tiempo, los resultados presentados en este trabajo podrían ayudar a dilucidar mejor el papel de CK1 en organismos eucariotas superiores.

CONCLUSIONES

VI. Conclusiones

1. Hemos aislado dos isoformas CK1 en *Trypanosoma cruzi* denominadas TcCK1.1 y TcCK1.2. Estas enzimas, de 313 y 339 aminoácidos, están relacionadas con la familia CK1 descrita en otros eucariotas.
2. Los alineamientos de secuencia de TcCK1.1 y TcCK1.2 con las de CK1 de otros organismos reveló que existe una inserción de tres aminoácidos en el dominio catalítico de la enzima, lo que la convierte en la única de estas características dentro de la familia CK1.
3. La caracterización molecular de las isoformas CK1 en *T. cruzi* mostró que *TcCK1.1* es un gen de dos copias y *TcCK1.2* está múltiplemente repetido en tándem. Ambos genes se localizan en un cromosoma de más de 2 Mb.
4. Los estudios de expresión y actividad de la enzima revelaron que las dos isoformas se expresan diferencialmente en los tres distintos estadios de *T. cruzi*.
5. Los parámetros cinéticos estudiados reflejan ciertas diferencias bioquímicas con proteínas homólogas en otros organismos.
6. La actividad de la proteína CK1 en los parásitos aumenta durante la fase logarítmica de crecimiento, al igual que en las fases S y M del ciclo celular; esto indica algún tipo de implicación de la quinasa en la regulación de estos procesos.
7. Los estudios de localización por fluorescencia de la proteína verde fusionada a las dos isoformas TcCK1, permitieron distinguir la localización de TcCK1.1 cerca del bolsillo flagelar y de TcCK1.2 en estructuras alrededor del núcleo.
8. Los estudios de inhibición con derivados del purvalanol en parásitos que sobreexpresan TcCK1.2, muestran una mayor resistencia de estos parásitos al compuesto, con relación a sus controles.

BIBLIOGRAFÍA

VII. Bibliografia

- Agabian, N. (1990). "Trans splicing of nuclear pre-mRNAs." *Cell* **61**(7): 1157-60.
- Ahmad, Z., M. Camici, et al. (1984). "Glycogen synthase kinases. Classification of a rabbit liver casein and glycogen synthase kinase (casein kinase-1) as a distinct enzyme." *J Biol Chem* **259**(6): 3420-8.
- Akashi, M., Y. Tsuchiya, et al. (2002). "Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I var epsilon (CKIvar epsilon) and CKIdelta in Cultured Cells." *Mol Cell Biol* **22**(6): 1693-703.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., D.J. (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Alvarez, F., C. Robello, et al. (1994). "Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans." *Mol Biol Evol* **11**(5): 790-802.
- Arnheim, N., Ehrlich, H. (1992). "Polymerase chain reaction strategy." *Annu Rev Biochem* **61**: 131-156.
- Aymerich, S. and S. Goldenberg (1989). "The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids." *Exp Parasitol* **69**(2): 107-15.
- Bangs, J. D., P. F. Crain, et al. (1992). "Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides." *J Biol Chem* **267**(14): 9805-15.
- Barik, S., R. E. Taylor, et al. (1997). "Identification, cloning, and mutational analysis of the casein kinase 1 cDNA of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Stage-specific expression of the gene." *J Biol Chem* **272**(42): 26132-8.
- Behrend, L., M. Stoter, et al. (2000). "Interaction of casein kinase 1 delta (CK1delta) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus." *Eur J Cell Biol* **79**(4): 240-51.
- Beyaert, R., B. Vanhaesebroeck, et al. (1995). "Casein kinase-1 phosphorylates the p75 tumor necrosis factor receptor and negatively regulates tumor necrosis factor signaling for apoptosis." *J Biol Chem* **270**(40): 23293-9.
- Bioukar, E. B., N. C. Marricco, et al. (1999). "Serine phosphorylation of the ligand-activated beta-platelet-derived growth factor receptor by casein kinase I-gamma2 inhibits the receptor's autophosphorylating activity." *J Biol Chem* **274**(30): 21457-63.
- Bordin, L., C. Vargiu, et al. (2002). "Phosphorylation of recombinant human spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase by CK1 and modulation of its binding to mitochondria: a comparison with CK2." *Biochem Biophys Res Commun* **290**(1): 463-8.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities protein utilizng utilizing the principle of protein dye binding." *Anal Biochem* **131**: 499-503.
- Brener, Z., Chiari, C. (1963). "Variacoes morfologicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*." *Rev Inst Med Trop* **5**: 220-224.

- Brener, Z., C. A. Costa, et al. (1976). "Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **18**(6): 450-5.
- Bridges, A. J. (2001). "Chemical inhibitors of protein kinases." Chem Rev **101**(8): 2541-72.
- Brockman, J. L., S. D. Gross, et al. (1992). "Cell cycle-dependent localization of casein kinase I to mitotic spindles." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9454-8.
- Budd, D. C., J. E. McDonald, et al. (2000). "Phosphorylation and regulation of a Gq/11-coupled receptor by casein kinase Ialpha." J Biol Chem **275**(26): 19667-75.
- Calabokis, M., L. Kurz, et al. (2002). "Biochemical and enzymatic characterization of a partially purified casein kinase-1 like activity from *Trypanosoma cruzi*." Parasitol Int **51**(1): 25-39.
- Camacho, F., M. Cilio, et al. (2001). "Human casein kinase I delta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2." FEBS Lett **489**(2-3): 159-65.
- Carbonnet, F., C. Hattab, et al. (1998). "Kell and Kx, two disulfide-linked proteins of the human erythrocyte membrane are phosphorylated in vivo." Biochem Biophys Res Commun **247**(3): 569-75.
- Castellani, O., Ribeiro, L.V., Fernandez, J.F. (1967). "Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture." J Protozoology **14**: 447-451.
- Castro, C., S. P. Craig, et al. (1981). "Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **4**(5-6): 273-82.
- Cegielska, A., K. F. Gietzen, et al. (1998). "Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis." J Biol Chem **273**(3): 1357-64.
- Cegielska, A., I. Moarefi, et al. (1994). "T-antigen kinase inhibits simian virus 40 DNA replication by phosphorylation of intact T antigen on serines 120 and 123." J Virol **68**(1): 269-75.
- Cegielska, A. and D. M. Virshup (1993). "Control of simian virus 40 DNA replication by the HeLa cell nuclear kinase casein kinase I." Mol Cell Biol **13**(2): 1202-11.
- Chagas, C. (1909). "Nova tripanosomiasis humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiologico da nova entidade mórbida do homen." Mem Inst Oswaldo Cruz **1**: 159-219.
- Chauchereau, A., J. F. Savouret, et al. (1992). "Control of biosynthesis and post-transcriptional modification of the progesterone receptor." Biol Reprod **46**(2): 174-7.
- Chen, J., C. A. Rauch, et al. (1995). "The topology of the kinetoplast DNA network." Cell **80**(1): 61-9.
- Cheng, H. L. and C. F. Louis (1999). "Endogenous casein kinase I catalyzes the phosphorylation of the lens fiber cell connexin49." Eur J Biochem **263**(1): 276-86.
- Chishti, A. H., G. J. Maalouf, et al. (1994). "Phosphorylation of protein 4.1 in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells." Blood **83**(11): 3339-45.
- Chomczynsky, P. S., N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**: 156-159.

- Chu, G., Volbrath, D., Davis, R. (1986). "Separation of large DNA molecules by contour clamped homogeneous electric fields." Science **234**: 1582-1585.
- Coderre, J. A., Beverley, S.M., Schimke, R.T. & Santi, D.V. (1983). "Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*." Proc Natl Acad Sci USA **80**: 2132-2136.
- Cornelissen, A. W., M. P. Verspieren, et al. (1986). "The common 5' terminal sequence on trypanosome mRNAs: a target for anti-messenger oligodeoxynucleotides." Nucleic Acids Res **14**(14): 5605-14.
- Dahmus, M. E. (1981). "Phosphorylation of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerase. Identification of calf thymus RNA polymerase subunits phosphorylated by two purified protein kinases, correlation with in vivo sites of phosphorylation in HeLa cell RNA polymerase II." The Journal of Biological Chemistry **256**(7): 3332-3339.
- De Bondt, H. L., J. Rosenblatt, et al. (1993). "Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2." Nature **363**(6430): 595-602.
- de Castro, S. L. (1993). "The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*." Acta Trop **53**(2): 83-98.
- de Groot, R. P., J. den Hertog, et al. (1993). "Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function." Embo J **12**(10): 3903-11.
- De Lange, T., Lui, A. Y. C., Van der Ploeg, L. H. T., Tromp, M. C., Van Boom, J. H. (1983). "Tandem repetition of the 5' mini-exon of variant surface glycoprotein genes: a multiple promoter for VSG gene transcription?" Cell **34**: 891-900.
- Decottignies, A., G. Owsianik, et al. (1999). "Casein kinase I-dependent phosphorylation and stability of the yeast multidrug transporter Pdr5p." J Biol Chem **274**(52): 37139-46.
- DeMaggio, A. J., R. A. Lindberg, et al. (1992). "The budding yeast HRR25 gene product is a casein kinase I isoform." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 7008-12.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, et al. (2001). "Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8." Mol Cell **8**(3): 601-11.
- Desdouits, F., D. Cohen, et al. (1995). "Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase I in vitro and in vivo." J Biol Chem **270**(15): 8772-8.
- Devereux, J., Haeberth, P., Smithies, O. (1984). "A comprehensive set of sequence analysis programs for VAX." Nucleic Acids Res **8**: 5725-5737.
- Dhillon, N. and M. F. Hoekstra (1994). "Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair." Embo J **13**(12): 2777-88.
- Docampo, R. and S. N. Moreno (1990). "The metabolism and mode of action of gentian violet." Drug Metab Rev **22**(2-3): 161-78.
- Dubois, T., P. Kerai, et al. (2002). "Identification of syntaxin-1A sites of phosphorylation by casein kinase I and casein kinase II." Eur J Biochem **269**(3): 909-14.

- Dubois, T., C. Rommel, et al. (1997). "14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site in vivo regulates Raf/14-3-3 interaction." *J Biol Chem* **272**(46): 28882-8.
- Duceman BW, R. K., Jacob ST (1981). "Activation of purified hepatoma RNA polymerase I by homologous protein kinase NII." *The Journal of Biological Chemistry* **256**(21): 10755-10758.
- Dujardin, J. C., Henriksson, J., Victoir, K., Brisse, S., Gamboa, D., Arevalo, J., Le Ray, D. (2000). "Genomic rearrangements in trypanosomatids: an alternative to the 'one gene' evolutionary hypotheses?" *Mem Inst Oswaldo Cruz* **95**(4): 527-34.
- Dukowski, P., R. Szyszka, et al. (1993). "Subcellular localization of two different type-1 casein kinases from yeast." *Acta Biochim Pol* **40**(3): 405-10.
- Dvorak, J. A. (1993). Analysis of the DNA of parasitic protozoa by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology. Protocols in Molecular Parasitology*. H. JE. Humana Press Inc., Totowa.
- Eide, E. J., E. L. Vielhaber, et al. (2002). "The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon." *J Biol Chem* **277**(19): 17248-54.
- Ekdahl, K. N. and B. Nilsson (1999). "Alterations in C3 activation and binding caused by phosphorylation by a casein kinase released from activated human platelets." *J Immunol* **162**(12): 7426-33.
- Estrada, E., P. Agostinis, et al. (1996). "Phosphorylation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by casein kinase I." *J Biol Chem* **271**(50): 32064-72.
- Faundez, V. V. and R. B. Kelly (2000). "The AP-3 complex required for endosomal synaptic vesicle biogenesis is associated with a casein kinase Ialpha-like isoform." *Mol Biol Cell* **11**(8): 2591-604.
- Feinberg, A. P., Vogelstein, B.** (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal Biochem* **132**: 6-13.
- Filardi, L. S. and Z. Brener (1987). "Susceptibility and natural resistance of Trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in Chagas disease." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **81**(5): 755-9.
- Fish, K. J., A. Cegielska, et al. (1995). "Isolation and characterization of human casein kinase I epsilon (CKI), a novel member of the CKI gene family." *J Biol Chem* **270**(25): 14875-83.
- Flotow, H., P. R. Graves, et al. (1990). "Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action." *J Biol Chem* **265**(24): 14264-9.
- Flotow, H. and P. J. Roach (1991). "Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I." *J Biol Chem* **266**(6): 3724-7.
- Fu, Z., C. L. Green, et al. (1999). "Relationship between casein kinase I isoforms and a neurofilament-associated kinase." *J Neurochem* **73**(2): 830-8.
- Furet, P., T. Meyer, et al. (2001). "Identification of cyclin-dependent kinase 1 inhibitors of a new chemical type by structure-based design and database searching." *J Comput Aided Mol Des* **15**(5): 489-95.
- Furet, P., J. Zimmermann, et al. (2000). "Structure-based design of potent CDK1 inhibitors derived from olomoucine." *J Comput Aided Mol Des* **14**(5): 403-9.

- Galanti, N., Dvorak, J.A., Grenet, J. & McDaniel, J.P. (1994). "Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida." *Exp Cell Res* **214**: 225-230.
- Garvey, E. P., Santi, D.V. (1986). . *Science* **233**: (1986). "Stable amplified DNA in drug-resistant *Leishmania* exists as extrachromosomal circles." *Science* **233**: 535-540.
- Gonzalez, A., T. J. Lerner, et al. (1985). "Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*." *Nucleic Acids Res* **13**(16): 5789-804.
- Gorla, N. B., Ledesma, O. S., Barbieri, G., Larripa, I. B. (1988). "Assesment of cytogenic damage in chagasic children treated with benznidazole." *Mutation Res* **206**: 212-220.
- Gorla, N. B., Ledesma, O. S., Barbieri, G., Larripa, I. B. (1989). "Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox." *Mutation Res* **224**: 263-267.
- Graves, P. R., D. W. Haas, et al. (1993). "Molecular cloning, expression, and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis." *J Biol Chem* **268**(9): 6394-401.
- Graves, P. R. R., P. J. (1995). "Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta." *J Biol Chem* **270**(37): 21689-94.
- Green, C. L. and G. S. Bennett (1998). "Identification of four alternatively spliced isoforms of chicken casein kinase I alpha that are all expressed in diverse cell types." *Gene* **216**(1): 189-95.
- Grose, C., W. Jackson, et al. (1989). "Phosphorylation of varicella-zoster virus glycoprotein gpI by mammalian casein kinase II and casein kinase I." *J Virol* **63**(9): 3912-8.
- Gross, S. D. and R. A. Anderson (1998). "Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family." *Cell Signal* **10**(10): 699-711.
- Gross, S. D., D. P. Hoffman, et al. (1995). "A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I alpha associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins." *J Cell Biol* **130**(3): 711-24.
- Gross, S. D., J. C. Loijens, et al. (1999). "The casein kinase Ialpha isoform is both physically positioned and functionally competent to regulate multiple events of mRNA metabolism." *J Cell Sci* **112**(Pt 16)(1): 2647-56.
- Gross, S. D., C. Simerly, et al. (1997). "A casein kinase I isoform is required for proper cell cycle progression in the fertilized mouse oocyte." *J Cell Sci* **110**(Pt 24): 3083-90.
- Haas, D. W. and C. H. Hagedorn (1991). "Casein kinase I phosphorylates the 25-kDa mRNA cap-binding protein." *Arch Biochem Biophys* **284**(1): 84-9.
- Hadjuk, S. L., Harris, M. E., Pollard, V. W. (1993). "RNA editing in kinetoplastid mitochondria." *FASEB J* **7**: 54-63.
- Hanks, S. K. and T. Hunter (1995). "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification." *Faseb J* **9**(8): 576-96.

- Hanks, S. K. and A. M. Quinn (1991). "Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members." Methods Enzymol **200**(2): 38-62.
- Hathaway, G. M., P. T. Tuazon, et al. (1983). "Casein kinase I." Methods Enzymol **99**: 308-17.
- Henriksson, J., L. Aslund, et al. (1990). "Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **42**(2): 213-23.
- Henriksson, J., A. Solari, et al. (1996). "Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli*." Parasitology **112**(Pt 4): 385-91.
- Hicke, L., B. Zanolari, et al. (1998). "Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization." J Cell Biol **141**(2): 349-58.
- Ho, U., S. Mason, et al. (1997). "Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 581-6.
- Hoekstra, M. F., R. M. Liskay, et al. (1991). "HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA." Science **253**(5023): 1031-4.
- Huflejt, M. E., C. W. Turck, et al. (1993). "L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I." J Biol Chem **268**(35): 26712-8.
- Hug, M., V. B. Carruthers, et al. (1993). "A possible role for the 3'-untranslated region in developmental regulation in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **61**(1): 87-95.
- Hug, M., H. R. Hotz, et al. (1994). "Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor." Mol Cell Biol **14**(11): 7428-35.
- Itarte, E., M. Plana, et al. (1983). "Phosphorylation of fibrinogen by casein kinase 1." Biochem Biophys Res Commun **117**(2): 631-6.
- Itarte E, M. M., Salavert A, Pena JM, Bertomeu JF, Guinovart JJ (1981). "Purification and characterization of two cyclic AMP-independent casein/glycogen synthase kinases from rat liver cytosol." Biochimica et Biophysica Acta **658**: 334-347.
- Johnson, L. N. and R. J. Lewis (2001). "Structural basis for control by phosphorylation." Chem Rev **101**(8): 2209-42.
- Johnson, P. J., J. M. Kooter, et al. (1987). "Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene." Cell **51**(2): 273-81.
- Karino, A., M. Okano, et al. (1999). "Biochemical characterization of a casein kinase I-like actin kinase responsible for the actin-induced suppression of casein kinase II activity in vitro." Biochim Biophys Acta **1472**(3): 603-16.
- Kearney, P. H., M. Ebert, et al. (1994). "Molecular cloning and sequence analysis of two novel fission yeast casein kinase-1 isoforms." Biochem Biophys Res Commun **203**(1): 231-6.

- Kitamura, K. and I. Yamashita (1998). "Identification of a novel casein kinase-1 homolog in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." Gene **214**(1-2): 131-7.
- Klimczak, L. J. and A. R. Cashmore (1993). "Purification and characterization of casein kinase I from broccoli." Biochem J **293**(Pt 1): 283-8.
- Klimczak, L. J., D. Farini, et al. (1995). "Multiple isoforms of Arabidopsis casein kinase I combine conserved catalytic domains with variable carboxyl-terminal extensions." Plant Physiol **109**(2): 687-96.
- Knighton, D. R., J. H. Zheng, et al. (1991). "Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase." Science **253**(5018): 414-20.
- Knippschild, U., D. M. Milne, et al. (1997). "p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs." Oncogene **15**(14): 1727-36.
- Knockaert, M., N. Gray, et al. (2000). "Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors." Chem Biol **7**(6): 411-22.
- Kudlicki, W., N. Grankowski, et al. (1978). "Isolation and properties of two protein kinases from yeast which phosphorylate casein and some ribosomal proteins." Eur J Biochem **84**(2): 493-8.
- Kuret, J., J. R. Woodgett, et al. (1985). "Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Identification of the sites phosphorylated by casein kinase-I." Eur J Biochem **151**(1): 39-48.
- Kusuda, J., N. Hidari, et al. (1996). "Sequence analysis of the cDNA for the human casein kinase I delta (CSNK1D) gene and its chromosomal localization." Genomics **32**(1): 140-3.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Lario, A., González, A., Dorado, G.** (1997). "Automated Laser-induced fluorescence DNA sequencing: equalizing signal-to-noise ratios significantly enhances overall performance." Anal Biochem **247**: 30-33.
- LeBowitz, J. H., H. Q. Smith, et al. (1993). "Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*." Genes Dev **7**(6): 996-1007.
- Liu, C., Y. Li, et al. (2002). "Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism." Cell **108**(6): 837-47.
- Lu, P. W., C. J. Soong, et al. (1985). "Phosphorylation of ankyrin decreases its affinity for spectrin tetramer." J Biol Chem **260**(28): 14958-64.
- Mackie, K., B. C. Sorkin, et al. (1989). "Identification of two protein kinases that phosphorylate the neural cell-adhesion molecule, N-CAM." J Neurosci **9**(6): 1883-96.
- Madhusudan, E. A. Trafny, et al. (1994). "cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer." Protein Sci **3**(2): 176-87.
- Maniatis, T., S. Goodbourn, et al. (1987). "Regulation of inducible and tissue-specific gene expression." Science **236**(4806): 1237-45.

- Marchal, C., R. Haguenaer-Tsapis, et al. (2000). "Casein kinase I-dependent phosphorylation within a PEST sequence and ubiquitination at nearby lysines signal endocytosis of yeast uracil permease." J Biol Chem **275**(31): 23608-14.
- Marin, O., V. Burzio, et al. (2002). "Structural features underlying the multisite phosphorylation of the A domain of the NF-AT4 transcription factor by protein kinase CK1." Biochemistry **41**(2): 618-27.
- Marin, O., F. Meggio, et al. (1994). "Design and synthesis of two new peptide substrates for the specific and sensitive monitoring of casein kinases-1 and -2." Biochem Biophys Res Commun **198**(3): 898-905.
- Marin, O., F. Meggio, et al. (1994). "Phosphorylation of synthetic fragments of inhibitor-2 of protein phosphatase-1 by casein kinase-1 and -2. Evidence that phosphorylated residues are not strictly required for efficient targeting by casein kinase-1." Eur J Biochem **223**(2): 647-53.
- Martinez-Calvillo, S., I. Lopez, et al. (1997). "pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants." Gene **199**(1-2): 71-6.
- McDaniel, J. P. and J. A. Dvorak (1993). "Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants." Mol Biochem Parasitol **57**(2): 213-22.
- Meijer, L., A. M. Thunnissen, et al. (2000). "Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3beta and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent." Chem Biol **7**(1): 51-63.
- Miroux and Walker (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." J Mol Biol **260**: 289-298.
- Moreno, S. N., R. Docampo, et al. (1982). "Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations." Arch Biochem Biophys **218**(2): 585-91.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Oetting, W. S., P. T. Tuazon, et al. (1986). "Phosphorylation of prolactin." J Biol Chem **261**(4): 1649-52.
- Padmanabha R, G. C. (1987). "Casein kinase II of yeast contains two distinct alpha polypeptides and an unusually large beta subunit." J Biol Chem **262**: 1829-35.
- Parsons, M., M. Valentine, et al. (1993). "Protein kinases in divergent eukaryotes: identification of protein kinase activities regulated during trypanosome development." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2656-60.
- Parsons M, L. J., Schieven GL, Nel AE, Kanner SB (1994). "Developmental regulation of pp44/46, tyrosine-phosphorylated proteins associated with tyrosine/serine kinase activity in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **63**: 69-78.
- Pastorino, L., A. F. Ikin, et al. (2002). "The Carboxyl-Terminus of BACE Contains a Sorting Signal That Regulates BACE Trafficking but Not the Formation of Total Abeta." Mol Cell Neurosci **19**(2): 175-85.
- Pays, E., H. Coquelet, et al. (1989). "*Trypanosoma brucei*: posttranscriptional control of the variable surface glycoprotein gene expression site." Mol Cell Biol **9**(9): 4018-21.
- Pendergast, A. M. and J. A. Traugh (1985). "Alteration of aminoacyl-tRNA synthetase activities by phosphorylation with casein kinase I." J Biol Chem **260**(21): 11769-74.

- Pinto Dias, J. C., Deane, M. P., Brener, Z. (1991). *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas: A doença. "Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. L. Rey. Rio de Janeiro., Guanabara Koogan S.A. **Cap. 12.**
- Pollard, V. W., S. P. Rohrer, et al. (1990). "Organization of minicircle genes for guide RNAs in *Trypanosoma brucei*." Cell **63**(4): 783-90.
- Price, M. A. and D. Kalderon (2002). "Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1." Cell **108**(6): 823-35.
- Pulgar, V., C. Tapia, et al. (1996). "The recombinant alpha isoform of protein kinase CK1 from *Xenopus laevis* can phosphorylate tyrosine in synthetic substrates." Eur J Biochem **242**(3): 519-28.
- Rittschof D, T. J. (1982). "Identification of casein kinase II and phosphorylated proteins associated with messenger ribonucleoproteins particles from reticulocytes." European Journal of Biochemistry **123**: 333-336.
- Robinson, L. C., E. J. Hubbard, et al. (1992). "Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 28-32.
- Robinson, L. C., M. M. Menold, et al. (1993). "Casein kinase I-like protein kinases encoded by YCK1 and YCK2 are required for yeast morphogenesis." Mol Cell Biol **13**(5): 2870-81.
- Rowles, J., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., Cobb, M. H. (1991). "Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9548-52.
- Sacerdoti-Sierra, N. and C. L. Jaffe (1997). "Release of ecto-protein kinases by the protozoan parasite *Leishmania major*." J Biol Chem **272**(49): 30760-5.
- Salvatori, S., S. Furlan, et al. (1994). "Dual role of calsequestrin as substrate and inhibitor of casein kinase-1 and casein kinase-2." Biochem Biophys Res Commun **198**(1): 144-9.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci USA **74**: 5463-5467.
- Santos, J. A., E. Logarinho, et al. (1996). "The casein kinase 1 alpha gene of *Drosophila melanogaster* is developmentally regulated and the kinase activity of the protein induced by DNA damage." J Cell Sci **109**(Pt 7): 1847-56.
- Sather, S. and N. Agabian (1985). "A 5' spliced leader is added in trans to both alpha- and beta-tubulin transcripts in *Trypanosoma brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(17): 5695-9.
- Sharma, P., M. Sharma, et al. (1999). "Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11156-60.
- Shea, C. and L. H. Van der Ploeg (1988). "Stable variant-specific transcripts of the variant cell surface glycoprotein gene 1.8 expression site in *Trypanosoma brucei*." Mol Cell Biol **8**(2): 854-9.

- Sidorova, J. M., G. E. Mikesell, et al. (1995). "Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization." Mol Biol Cell **6**(12): 1641-58.
- Silva, L. P. H., Nussenzweig, V. (1953). "Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco." Folia Clinica e Biologica **20**: 197-233.
- Simpson, L. (1987). "The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution." Annu Rev Microbiol **41**: 363-82.
- Simpson, L. and F. Kretzer (1997). "The mitochondrion in dividing *Leishmania tarentolae* cells is symmetric and circular and becomes a single asymmetric tubule in non-dividing cells due to division of the kinetoplast portion." Mol Biochem Parasitol **87**(1): 71-8.
- Singh, T. J., A. Akatsuka, et al. (1984). "Comparison of the phosphorylation of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase by cAMP-dependent protein kinase and cAMP-independent glycogen synthase (casein) kinase-1." J Biol Chem **259**(20): 12857-64.
- Singh, T. J., A. Akatsuka, et al. (1984). "Cyclic nucleotide- and Ca²⁺-independent phosphorylation of tubulin and microtubule-associated protein-2 by glycogen synthase (casein) kinase-1." Biochem Biophys Res Commun **121**(1): 19-26.
- Singh, T. J., I. Grundke-Iqbal, et al. (1995). "Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state." J Neurochem **64**(3): 1420-3.
- Singh TJ, A. A., Huang KP, Sharma RK, Tam SW, Wang JH. (1982). "A multifunctional cyclic nucleotide- and Ca²⁺-independent protein kinase from rabbit skeletal muscle." Biochemical and Biophysical Research Communications **107**(2): 676-683.
- Sonka, J., D. Kubler, et al. (1989). "Phosphorylation by cell surface protein kinase of bovine and human fibrinogen and fibrin." Biochim Biophys Acta **997**(3): 268-77.
- Soong, C. J., P. W. Lu, et al. (1987). "Analysis of band 3 cytoplasmic domain phosphorylation and association with ankyrin." Arch Biochem Biophys **254**(2): 509-17.
- Southern, E. (1975). "Detection of specific genes among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**: 503-517.
- Stetler, D. A. and S. T. Jacob (1985). "Comparison of cytosolic and nuclear poly(A) polymerases from rat liver and a hepatoma: structural and immunological properties and response to NI-type protein kinases." Biochemistry **24**(19): 5163-9.
- Streichert, T., A. Ebrahimnejad, et al. (2001). "The microbial receptor CEACAM3 is linked to the calprotectin complex in granulocytes." Biochem Biophys Res Commun **289**(1): 191-7.
- Stuart, K. (1991). "RNA editing in mitochondrial mRNA of trypanosomatids." Trends Biochem Sci **16**(2): 68-72.
- Sturm, N. R. and L. Simpson (1990). "Partially edited mRNAs for cytochrome b and subunit III of cytochrome oxidase from *Leishmania tarentolae* mitochondria: RNA editing intermediates." Cell **61**(5): 871-8.

- Tao, M. C., Richard; Cheta Safinaz (1980). "Purification and Characterization of a membrane-bound protein kinase from human erythrocytes." The Journal of Biological Chemistry **255**: 2563-2568.
- Taylor, S. S. and E. Radzio-Andzelm (1997). "Protein kinase inhibition: natural and synthetic variations on a theme." Curr Opin Chem Biol **1**(2): 219-26.
- TDR, N. (1994). "Tropical Disease Research UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases." TDR **44**.
- Tipper, J. P., G. W. Bacon, et al. (1983). "Phosphorylation of acetyl-coenzyme A carboxylase by casein kinase I and casein kinase II." Arch Biochem Biophys **227**(2): 386-96.
- Tobin, A. B., N. F. Totty, et al. (1997). "Stimulus-dependent phosphorylation of G-protein-coupled receptors by casein kinase I alpha." J Biol Chem **272**(33): 20844-9.
- Toledo, L. M., N. B. Lydon, et al. (1999). "The structure-based design of ATP-site directed protein kinase inhibitors." Curr Med Chem **6**(9): 775-805.
- Tschudi, C. and E. Ullu (1988). "Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes." Embo J **7**(2): 455-63.
- Tuazon, P. T., W. C. Merrick, et al. (1989). "Comparative analysis of phosphorylation of translational initiation and elongation factors by seven protein kinases." J Biol Chem **264**(5): 2773-7.
- Tuazon, P. T., D. T. Pang, et al. (1985). "Phosphorylation of the insulin receptor by casein kinase I." J Cell Biochem **28**(2): 159-70.
- Tuazon, P. T. and J. A. Traugh (1991). "Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation." Adv Second Messenger Phosphoprotein Res **23**(1): 123-64.
- Ullu, E., Tschudi, C., G. Gunzl, A. (1996). Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. Molecular biology of parasitic protozoa. D. F. S. y. M. Parsons. Oxford University Press, IRL Press: 115-133.
- Ullu, E., K. R. Matthews, et al. (1993). "Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts." Mol Cell Biol **13**(1): 720-5.
- Ullu, E. and C. Tschudi (1991). "Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10074-8.
- Umphress, J. L., P. T. Tuazon, et al. (1992). "Determinants on simian virus 40 large T antigen are important for recognition and phosphorylation by casein kinase I." Eur J Biochem **203**(1-2): 239-43.
- Vancura, A., A. O'Connor, et al. (1993). "Isolation and properties of YCK2, a *Saccharomyces cerevisiae* homolog of casein kinase-1." Arch Biochem Biophys **305**(1): 47-53.
- Vancurova, I., J. H. Choi, et al. (1999). "Regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase from *Schizosaccharomyces pombe* by casein kinase I." J Biol Chem **274**(2): 1147-55.
- Vijasharaty, S., Ernest, I., Itzhaki, J. E., Sherman, D., Mowatt, M. R., Michels, P. A. M., Clayton, C. (1990). "The genes encoding fructose biphosphate aldolase in *Trypanosoma brucei* are interspersed with unrelated genes." Nucleic Acids Res **18**: 2967-2975.

- Vila, J., D. M. Payne, et al. (1990). "Phosphorylation and activation of p40 tyrosine kinase by casein kinase-1." *FEBS Lett* **264**(1): 21-4.
- Vila, J., J. M. Walker, et al. (1989). "Phosphorylation of protein kinase C by casein kinase-1." *FEBS* **255**(1): 205-208.
- Wahler, E., Keller, W. (1992). "The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors." *Annu Rev Biochem* **61**: 419-440.
- Walczak, C. E., R. A. Anderson, et al. (1993). "Identification of a family of casein kinases in Paramecium: biochemical characterization and cellular localization." *Biochem J* **296**(Pt 3): 729-35.
- Walder, J. A., P. S. Eder, et al. (1986). "The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's." *Science* **233**(4763): 569-71.
- Walter, J., J. Grunberg, et al. (1998). "Proteolytic fragments of the Alzheimer's disease associated presenilins-1 and -2 are phosphorylated in vivo by distinct cellular mechanisms." *Biochemistry* **37**(17): 5961-7.
- Walter, J., A. Schindzielorz, et al. (2000). "Phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2." *J Biol Chem* **275**(31): 23523-9.
- Wang, P. C., A. Vancura, et al. (1994). "Cytoplasmic forms of fission yeast casein kinase-1 associate primarily with the particulate fraction of the cell." *J Biol Chem* **269**(16): 12014-23.
- Wang, P. C., A. Vancura, et al. (1992). "Two genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode a membrane-bound form of casein kinase-1." *Mol Biol Cell* **3**(3): 275-86.
- Wang, X., M. F. Hoekstra, et al. (1996). "Prenylated isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the *gcs1* blockage of cell proliferation from stationary phase." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5375-85.
- Wang, X., F. E. Paulin, et al. (2001). "Eukaryotic initiation factor 2B: identification of multiple phosphorylation sites in the epsilon-subunit and their functions in vivo." *Embo J* **20**(16): 4349-59.
- Watts, A. D., N. H. Hunt, et al. (1999). "A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'." *Embo J* **18**(8): 2119-26.
- Wei, T. and M. Tao (1991). "Identity and substrate specificity of human erythrocyte membrane-bound and cytosolic casein kinases." *FEBS Lett* **292**(1-2): 141-4.
- WHO (1997). "Chagas disease. Interruption of transmission." *Weekly Epidemiol. Rec.* **72**: 1-5.
- Wiser, M. F., J. W. Eaton, et al. (1983). "A plasmodium protein kinase that is developmentally regulated, stimulated by spermine, and inhibited by quercetin." *J Cell Biochem* **21**(4): 305-14.
- Xu, R. M., G. Carmel, et al. (1995). "Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase." *Embo J* **14**(5): 1015-23.
- Yanagawa, S., Y. Matsuda, et al. (2002). "Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*." *Embo J* **21**(7): 1733-42.

Yang, P. and W. S. Sale (2000). "Casein kinase I is anchored on axonemal doublet microtubules and regulates flagellar dynein phosphorylation and activity." J Biol Chem **275**(25): 18905-18912.

Yoshii, T., T. Fukumori, et al. (2002). "Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest." J Biol Chem **277**(9): 6852-7.

Zhai, L., P. R. Graves, et al. (1995). "Casein kinase I gamma subfamily. Molecular cloning, expression, and characterization of three mammalian isoforms and complementation of defects in the *Saccharomyces cerevisiae* YCK genes." J Biol Chem **270**(21): 12717-24.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ARN_m	Acido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovina
CHEF	Contour clamped homogeneous electric field
CDK	Proteína quinasa dependiente de ciclina
CK1	Caseína quinasa 1
CK2	Caseína quinasa 2
col.	Colaboradores
cpm	cuentas por minuto
D.O.	Densidad óptica
g	gramo
g (x g)	Aceleración centrífuga relativa
G418	Geneticina
IPTG	Isopropyl-β-D-tiogalacto-piranosido
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	litro
M	Molar
Mb	Megabase
Mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
pb	pares de bases
PCR	Reacción de cadena de la polimerasa
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
PKC	Proteína quinasa dependiente de calcio y diacilglicerol
rpm	révoluciones por minuto
SBF	Suero bovino fetal
U	Unidades de enzima
μg	microgramo