

PRU. T-15/136

T
15
58

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 21-3-95
ENTRADA NUM. ... 817

DIHIDROFOLATO REDUCTASA-TIMIDILATO

SINTASA DE *Trypanosoma cruzi*:

CARACTERIZACION DEL GEN Y DE

LA PROTEINA RECOMBINANTE

Tesis Doctoral

D. Pedro Antonio Reche Gallardo

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 219675604
Nº Copia 2122187X

UNIVERSIDAD DE GRANADA
13 MAR. 1995
COMISION DE DOCTORADO

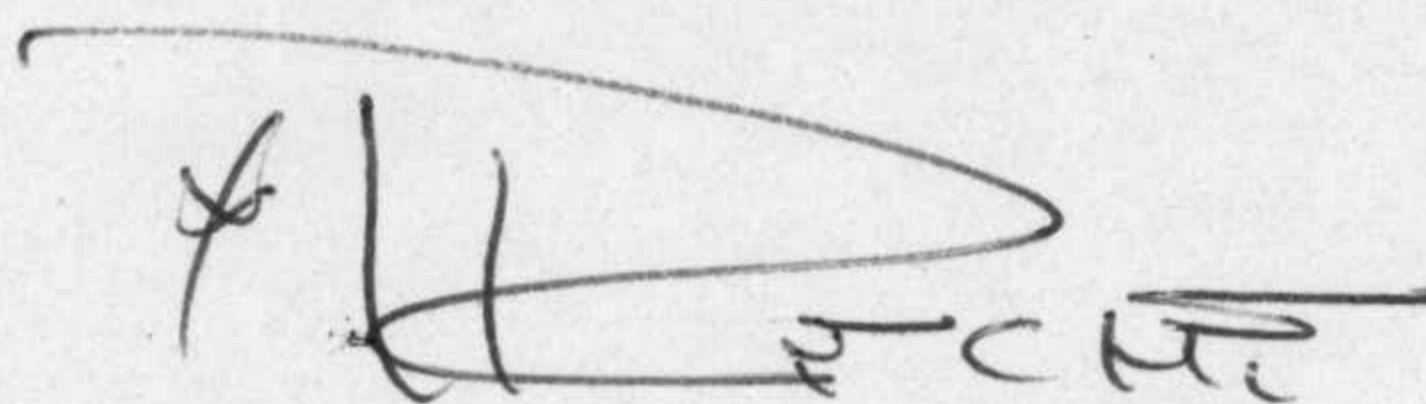
DIHIDROFOLATO REDUCTASA-TIMIDILATO

SINTASA DE *Trypanosoma cruzi*:

CARACTERIZACION DEL GEN Y DE

LA PROTEINA RECOMBINANTE

Memoria presentada por el licenciado
Pedro Antonio Reche Gallardo para
optar al grado de Doctor en Química
Granada 13 de Marzo de 1995.



Pedro Antonio Reche Gallardo

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra" (C.S.I.C) bajo la dirección de los Dres. LUIS MIGUEL RUIZ PEREZ y DOLORES GONZALEZ PACANOWSKA, Colaboradores científicos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.



Luis Miguel Ruiz Pérez



Dolores González Pacanowska

INDICE

I. INTRODUCCION

I.1 INTRODUCCIÓN.

I.2 *TRYPANOSOMA CRUZI*: GENERALIDADES Y CICLO DE VIDA. 1

I.3 ENFERMEDAD DE CHAGAS: DATOS CLÍNICOS Y TERAPIA. 2

I.4. BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS TRIPANOSOMATIDOS. 4

I.4.1. El genoma de los tripanosomátidos.

I.4.1.1. El DNA nuclear.

I.4.1.2. El DNA del kinetoplástido.

I.4.2. Organización de los genes.

I.4.3. Transcripción y procesamiento de los rna mensajeros.

I.4.3.1. Adición del miniexón: "trans-splicing".

I.4.3.2. Poliadenilación.

I.4.3.3. Corrección post-transcripcional de los RNA mitocondriales: "RNA editing".

I.4.4. Regulación génica de los tripanosomátidos.

I.5. BIOQUIMICA DE LOS TRIPANOSOMATIDOS.

I.5.1 Características generales.

I.5.2. Metabolismo pirimidínico.

I.6 DIHIDROFOLATO REDUCTASA. 11

1.6.1 Estructura.

1.6.2. DHFR: cinética y mecanismo catalítico.

1.7 TIMIDILATO SINTASA. 17

1.7.1. Estructura.

1.7.2 Cinética y catálisis.

I.8. DIHIDROFOLATO REDUCTASA-TIMIDILATO SINTASA DE PROTOZOOS. 22

I.8.1. Estructura de la dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa.

I.8.2. DHFR-TS de *L. major*: Interacción entre dominios y canalización de sustrato.

I.8.3 Relevancia biológica de la DHFR-TS.

I.9. INHIBIDORES DE LA DHFR. 27

1.9.1. 2,4-Diaminopirimidinas sustituidas: trimetoprim, pirimetamina y RO-46-8717.

1.9.2 Metotrexato.

1.9.3. Otros inhibidores de la DHFR.

II. MATERIAL Y METODOS. 33

II.1. MATERIAL. 33

II.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO 33

II.1.1.1 Parásitos.	
II.1.1.2. Bacterias y levaduras.	
II.1.2 REACTIVOS.	34
II.1.2.1. Preparación de dihidrofolato.	
II.1.2.2. Preparación de metilen tetrahidrofolato.	
II.1.3. TAMPONES Y SOLUCIONES.	34
II.1.4. MEDIOS DE CULTIVO.	36
II.1.4.1. Para parásitos.	
II.1.4.2. Para bacterias.	
II.1.4.3. Para levaduras.	
II.1.5. VECTORES.	37
II.1.6. PATRONES DE PESOS MOLECULARES PARA ELECTROFORESIS.	37
II.1.6.1. Electroforesis de proteínas.	
II.1.6.2. Electroforesis de DNA.	
II.1.7. OLIGOS.	38
II.1.8. INSTRUMENTACION Y SOFTWARE.	39
II.1.8.1. Instrumentación.	
II.1.8.1.1. Para el cultivo de células.	
II.1.8.1.2. Para eletroforesis.	
II.1.8.1.3. Centrífugas.	
II.1.8.1.4. Baños.	
II.1.8.1.5. Otros	
II.1.8.2. software	
II.2. METODOS.	41
II.2.1. CULTIVO DE CELULAS.	41
II.2.1.1 Cultivo de parásitos.	
II.2.1.2. Cultivo de bacterias.	
II.2.1.3. Cultivo de levaduras.	
II.2.2. MANIPULACION DE BACTERIAS.	42
II.2.2.1.1. Método del Cl ₂ Ca.	
II.2.2.1. Preparación de células competentes.	
II.2.2.1.1. Método del Cl ₂ Ca.	
II.2.2.1.2. Método del PEG.	
II.2.2.2. Transformación de bacterias competentes.	
II.2.2.3. Preparación de extractos crudos de bacterias para la determinación de actividad.	
II.2.2.4. Infeccion de bacterias con el fago lisogénico M13.	
II.2.3 SELECCION DE FAGOS DE INTERES.	44

II.2.3.1. Plaqueo de bacteriófagos: obtención de placas de lisis.	
II.2.3.2. Trasferencia de los fagos a filtros de nitocelulosa e hibridación.	
II.2.4. AISLAMIENTO DE DNA.	45
II.2.4.1. Aislamiento de DNA de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	
II.2.4.2. Aislamiento de DNA plasmídico.	
II.2.4.2.1. En pequeña escala ("Minipreps").	
II.2.4.2.1.1. Miniprep de Litio	
II.2.4.2.1.2. Magic Miniprep [®]	
II.2.4.2.2. Obtención de DNA plasmídico a gran escala ("Maxipreps").	
II.2.4.2.2.1. Aislamiento de DNA por Gradiente en CICs.	
II.2.4.2.2.2. Magic Maxiprep [®] .	
II.2.4.3. Aislamiento de DNA de M13.	
II.2.4.4. Aislamiento de DNA de bacteriófagos.	
II.2.4.4.1. Preparación de un lisado líquido de bacterias con el fago λ EMBL3.	
II.2.4.4.2. Preparación de un lisado líquido de bacterias con λ gt11.	
II.2.4.4.3. Aislamiento de DNA de lisados de bacteriófagos.	
II.2.5. AISLAMIENTO DE RNA DE <i>T. cruzi</i> .	48
II.2.5.1. Aislamiento de RNA total.	
II.2.5.2. Purificación de la fracción poliadenilada del RNA citoplasmático.	
II.2.6. CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS.	49
II.2.7. MANIPULACION ENZIMATICA DEL DNA.	49
II.2.7. MANIPULACION ENZIMATICA DEL DNA.	49
II.2.7.1. Digestiones con endonucleasas de restricción.	
II.2.7.2. Tratamiento del DNA con la Klenow.	
II.2.7.3. Tratamiento del DNA con fosfatasa alcalina.	
II.2.7.4. Reacción de ligamiento	
II.2.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	50
II.2.9. REACCION DE RT-PCR.	51
II.2.10. MARCAJE RADIATIVO DEL DNA.	52
II.2.11. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS	52
II.2.11.1. Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa.	
II.2.11.2. Electroforesis de RNA en geles horizontales de agarosa-formaldehido.	
II.2.11.3. Electroforesis en campo pulsado del DNA.	
II.2.11.3.1. Preparación de muestras para CHEF.	
II.2.11.3.2. CHEF electroforesis.	
II.2.12. AISLAMIENTO DE DNA DE GELES DE AGAROSA.	54
II.2.12.1. Electroelución.	
I.2.12.2. GeneClean [®] .	

II 2.13. TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS DE GELES DE AGAROSA A MEMBRANAS DE NYLON.	55
II.2.13.1. Transferencia del DNA a filtros de nylon ("Southern blot").	
II.2.13.2. Transferencia de RNA a membranas de nylon ("Northen blot").	
II.2.14. HIBRIDACIÓN CON SONDAS RADIATIVAS DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS TRANSFERIDOS A MEMBRANAS .	55
II.2.15. SECUENCIACIÓN.	55
II.2.16. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS: SDS-PAGE.	56
II.2.17. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.	57
II.2.18. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN MTX-SEFAROSA.	57
II.2.19. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO ANIONICO EN MONO Q.	58
II.2.20. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR.	58
II.2.21. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	59
II.2.22 ENSAYOS CINETICOS	59
II.2.22.1 Ensayo espectrofotométrico de la dihidrofolato reductasa.	
II.2.22.2. Ensayo espectrofotométrico de la timidilato sintasa.	
II.2.22.3. Determinación de las constantes de Michaelis-Menten (Km).	
II.2.22.4. Determinación de la constante catalítica (kcat).	
II.2.22.5. Cálculo de la constante de inhibición (Ki) para inhibidores del tipo competitivo, TMP, PYR y RO-46-8717.	
II.2.22.6. Determinación la Ki del MTX.	
II.2.23. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE DISOCIACIÓN DE MTX DEL COMPLEJO TERNARIO MTX-NADPH-ENZIMA.	63
III. OBJETIVOS.	64
IV. RESULTADOS.	65
IV.1 OBTENCION DE UNA SONDA ESPECIFICA PARA EL GEN DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> .	65
IV.2. AISLAMIENTO DEL GEN DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> .	66
IV.3 CLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA DHFR-TS.	68
IV.4 AISLAMIENTO DEL cDNA DE LA DHFR-TS.	71
IV.5. LOCALIZACION CROMOSOMICA Y ORGANIZACION GENOMICA DEL GEN DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> .	72
IV.5.1. Determinación del número de copias.	
IV.5.2 Localización cromosómica del gen de la DHFR-TS de <i>T. cruzi</i> .	
II.6. TRANSCRIPCION DEL GEN DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> .	75
II.7. DETERMINACION DEL SITIO ACEPTOR DEL MINI-EXON.	76
IV.8. EXPRESION DE LA DHFR-TS RECOMBINANTE DE <i>T. CRUZI</i>	77

IV.9. PURIFICACION DE LA DHFR-TS RECOMBINANTE DE <i>T. CRUZI</i> .	79
IV.10. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> .	81
IV.10.1. Determinación del pm de la DHFR-TS de <i>T. cruzi</i> .	
IV.10.2. Estabilidad de la DHFR-TS de <i>T. cruzi</i> .	
IV.11. CARACTERIZACION CINETICA DEL ENZIMA RECOMBINANTE DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> :: K_m s y k_{cat} .	82
IV.11.1. Dependencia de las actividades DHFR y TS del enzima bifuncional de <i>T. cruzi</i> con respecto al pH y la fuerza iónica.	
IV.11.2. Determinación de las K_m s y k_{cats} de la DHFR-TS de <i>T. cruzi</i> .	
IV.11.2.1. K_m s para el H ₂ F y NADPH y k_{cat} para la actividad DHFR.	
IV.11.2 2. K_m s para el dUMP y el CH ₂ -H ₄ F y k_{cat} para la actividad TS.	
IV.12. INHIBICION DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> POR TMP, PYR y RO-46-8717: CALCULO DE LAS CONSTANTES DE INHIBICION.	85
IV.13. ANALISIS DE LA INTERACCION DEL MTX CON LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> .	89
IV.13.1. Determinación de la KI del MTX para el enzima bifuncional.	
IV.13.2. Determinación de la velocidad de disociación del MTX del complejo ternario DHFR-TS-NADPH-MTX: Estequiometría de unión.	
II.14. EXPRESION DEL DOMINIO DHFR DEL ENZIMA BIFUNCIONAL DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> .	93
IV.15. PURIFICACION DEL DOMINIO DHFR DE <i>T. CRUZI</i> .	95
IV.16. PROPIEDADES FISICO QUIMICAS DE DOMINIO DHFR DE <i>T. CRUZI</i> .	97
IV.16.1. Estabilidad de la proteína del dominio DHFR de <i>T. cruzi</i> .	
IV.16.2. Determinación del Pm de la proteína del dominio DHFR de <i>T. cruzi</i> .	
IV.17. CARACTERIZACION CINETICA DEL DOMINIO DHFR DE <i>T. CRUZI</i> .	98
IV.17.1. Dependencia de la velocidad DHFR frente al pH.	
IV.17.2 Dependencia de la actividad frente a la concentración de ClK.	
IV.17.3. Determinación de la k_{cat} y las K_m s para el H ₂ F y el NADPH.	
IV.18. ANALISIS DE LA INHIBICION DEL DOMINIO DHFR DE <i>T. CRUZI</i> POR TMP, PYR Y RO-46-8717: CALCULO DE LAS CONSTANTES DE INHIBICION.	100
IV.19. ANALISIS DE LA INTERACCION DEL MTX CON EL DOMINIO DHFR DE <i>T. CRUZI</i> .	101
IV.19.1. Determinación de la KI del MTX para el dominio DHFR de <i>T. cruzi</i> ..	
IV.19.2. Determinación de la velocidad aparente de disociación del MTX del complejo ternario: Estequiometría de unión.	

V. DISCUSION.

V.1. ORGANIZACION DEL GEN DE LA DHFR-TS EN <i>T. CRUZI</i> : PLOIDIA Y KARIOTIO	101
V.3. TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA DHFR-TS DE <i>T. cruzi</i> .	102
V.4. ANALISIS DE LAS SECUENCIAS NO TRADUCIDAS QUE FLANQUEAN LOS EXTREMOS 5' Y 3' DEL GEN DE LA DHFR-TS.	103
V.4.1. Region 5'	
V.4.1.1. Composición de bases.	
V.4.1.2. Sitios aceptores del miniexon	
V.4.1.3. Posibles secuencias promotoras y de unión de proteínas.	
V.4.2. Región 3'.	
V.5. ESTUDIO DE LA SECUENCIA NULEOTIDICA CODIFICANTE DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> .	107
V.5.1. Uso codónico y Composición en bases.	
V.6. ANALISIS DE LA SECUENCIA PEPTIDICA DE LA DHFR-TS de <i>T. cruzi</i> .	112
V.6.1. Distinción de los dominios DHFR y TS en la enzima bifuncional de <i>T. cruzi</i> .	
V.6.2. Homología del dominio DHFR.	
V.6.3. Estructura del dominio DHFR de <i>T. cruzi</i> .	
V.6.4. Homología del dominio TS.	
V.6.5. Estructura del dominio TS.	
V.6. RELEVANCIA DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> : HACIA EL DISEÑO RACIONAL DE INHIBIDORES.	121
V.7. EXPRESIÓN Y PURIFICACION DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> .	122
V.8. CARACTERIZACION CINETICA DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> .	124
V.8.1 Efecto del pH y fuerza iónica (CLK).	
V.8.2. K_{ms} y k_{cats} .	
V.9. INHIBICION DE LA DHFR-TS DE <i>T. cruzi</i> MEDIANTE TMP, PYR Y RO-46-8717.	126
V.10. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> CON EL MTX.	128
V.11. EXPRESION Y PURIFICACION DEL DOMINIO DHFR DE LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> .	130
V.12. LA ESTABILIDAD Y LAS PROPIEDADES CINETICAS DEL DOMINIO DHFR DIFIEREN POCO DE LAS OBSERVADAS EN LA DHFR-TS DE <i>T. CRUZI</i> ..	131
V.12.1. Elevada estabilidad.	
V.12.2. La velocidad disminuye drásticamente a pH básicos y hay activación a una fuerza iónica elevada (CLK).	
V.12.3. K_{ms} y k_{cat} fueron similares a la del enzima bifuncional.	

V.13. TMP, PYR, RO-46-1787 y MTX FUERON PEORES INHIBIDORES DEL DOMINIO DHFR.	132
V.14. INTERACCION ENTRE DOMINIOS DHFR-DHFR EN EL ENZIMA BIFUNCIONAL.	134
BILIOGRAFIA	136

I. INTRODUCCION

I.1 INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades parasitarias en los países desarrollados son consideradas como una curiosidad solo mencionada en los libros de texto, o conocidas a través de notas de prensa referentes a una determinada epidemia. Sin embargo, la importancia de éstas es indiscutible y en los países tropicales y subtropicales representan uno de los mayores problemas sanitarios (Chang y col, 1985). Sólo los generos *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Plasmodium* son responsables de enfermedades protozoarias que afectan a millones de personas (WHO, 1992).

Estos protozoos parásitos presentan ciertas peculiaridades tanto a nivel bioquímico como molecular. Entre otras, sutiles mecanismos de evasión del sistema inmunitario, determinados procesos moleculares de maduración de RNAm, así como ciertos endemismos enzimáticos. Todo ello ha despertado el interés de la comunidad científica y es de esperar que el conocimiento detallado de todos estos aspectos contribuirá al desarrollo de agentes antiprotozoarios efectivos, rellenando así la laguna existente en este campo.

I.2 TRYPANOSOMA CRUZI: GENERALIDADES Y CICLO DE VIDA.

Trypanosma cruzi es un protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastidae. Los protozoos pertenecientes a este orden se caracterizan por poseer una única mitocondria en cuyo interior existe una compleja red de DNA distribuida en minicírculos y maxicírculos denominado kinetoplasto (Simpson, 1972). Filogenéticamente estos protozoos están considerados como los eucariontes más antiguos, pareciendo divergir muy pronto del resto de los eucariotas (Sogin y col, 1986).

Trypanosma cruzi es el agente etiológico de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, que afecta a unos 18 millones de personas en América Central y del Sur, y a la que unos 90 millones de personas están expuestas (WHO, 1992).

El ciclo de vida del parásito requiere el paso obligatorio a través de un huésped invertebrado y otro vertebrado, e incluye distintas formas de desarrollo del parásito (Fig. I.1). El ciclo de vida comienza cuando los insectos vectores pertenecientes a la familia reduviidae ingieren las formas tripomastigotas sanguíneas de un huésped contaminado. En el insecto, las formas tripomastigotas se diferencian en la forma proliferativa epimastigote, la cual, cuando alcanza el tracto posterior del intestino se diferencia en la forma tripomastigota metacíclica o forma infectiva. Estas salen al exterior junto las heces del insecto, y la infección ocurre cuando penetran por cualquier punto de discontinuidad de la piel, o por paso activo a través de las

mucosas y la conjuntiva. Otros modos de infección incluyen las transfusiones sanguíneas, la vía transplacentaria y la vía sexual. Una vez dentro del hospedador las formas tripomastigotas invaden una amplia variedad de células y dentro de ellas se diferencian en las formas amastigotas, que, tras varios ciclos de reproducción, se transforman de nuevo en las formas tripomastigotas. Estas últimas alcanzan el torrente sanguíneo tras ser liberadas por eclosión celular, pudiendo entonces infectar nuevas células y siendo por ello las responsables de la diseminación de la infección. El ciclo se cierra cuando el insecto vector se alimenta de la sangre de un huésped contaminada con tripomastigotes .

I.3 ENFERMEDAD DE CHAGAS: DATOS CLÍNICOS Y TERAPIA.

Trypanosma cruzi puede infectar cualquier tejido, incluidos el nervioso y el músculo cardíaco, dependiendo de ello la patología y la sintomatología desarrollada por el paciente. En humanos, después de la infección y un subsecuente periodo de incubación, comienza la fase aguda de la enfermedad caracterizada por una parasitemia de..... Si los hubiere, y en ausencia de un tratamiento específico, los síntomas de esta fase persisten durante aproximadamente dos meses, con una mortalidad del 2 al 8%, y con la mayor parte de las muertes ocurriendo entre los niños. A la fase aguda le sigue una fase crónica con una parasitemia de.....en la que la mayor parte de los adultos quedan asintomáticos. Sólo un 20% de casos desarrollan los síntomas de esta fase, principalmente alteraciones de tipo cardíaco, digestivo o neurológico (revisión en Brener, 1980).

Hasta la fecha, la enfermedad de Chagas ha desafiado todos los intentos de desarrollo de una quimioterapia segura y eficiente. No hay ningún tratamiento profiláctico disponible y sólo el violeta de genciana es usado con éxito en la prevención de la transmisión de la enfermedad vía transfusión sanguínea (Nussenzweig et al, 1953). Distintos fármacos, tales como derivados azólicos, nitroimidazoles y derivados purínicos entre otros, presentan in vitro cierta actividad frente alguna de las formas del parásito (Castro, 1993). Sin embargo, el nifurtimox, un nitrofurano derivado, y el benznidazol, un nitroimidazol derivado, son las únicas drogas disponibles en el mercado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Ambos nitroderivados tienen serios efectos colaterales (Gorla et al, 1988; Gorla et al, 1989), por lo que su administración es desaconsejable especialmente en los casos crónicos.

Ante esta panorámica es evidente la necesidad del desarrollo de un fármaco efectivo contra la enfermedad de Chagas, y es evidente también que sólo el conocimiento detallado del parásito podrá conducir a ello.

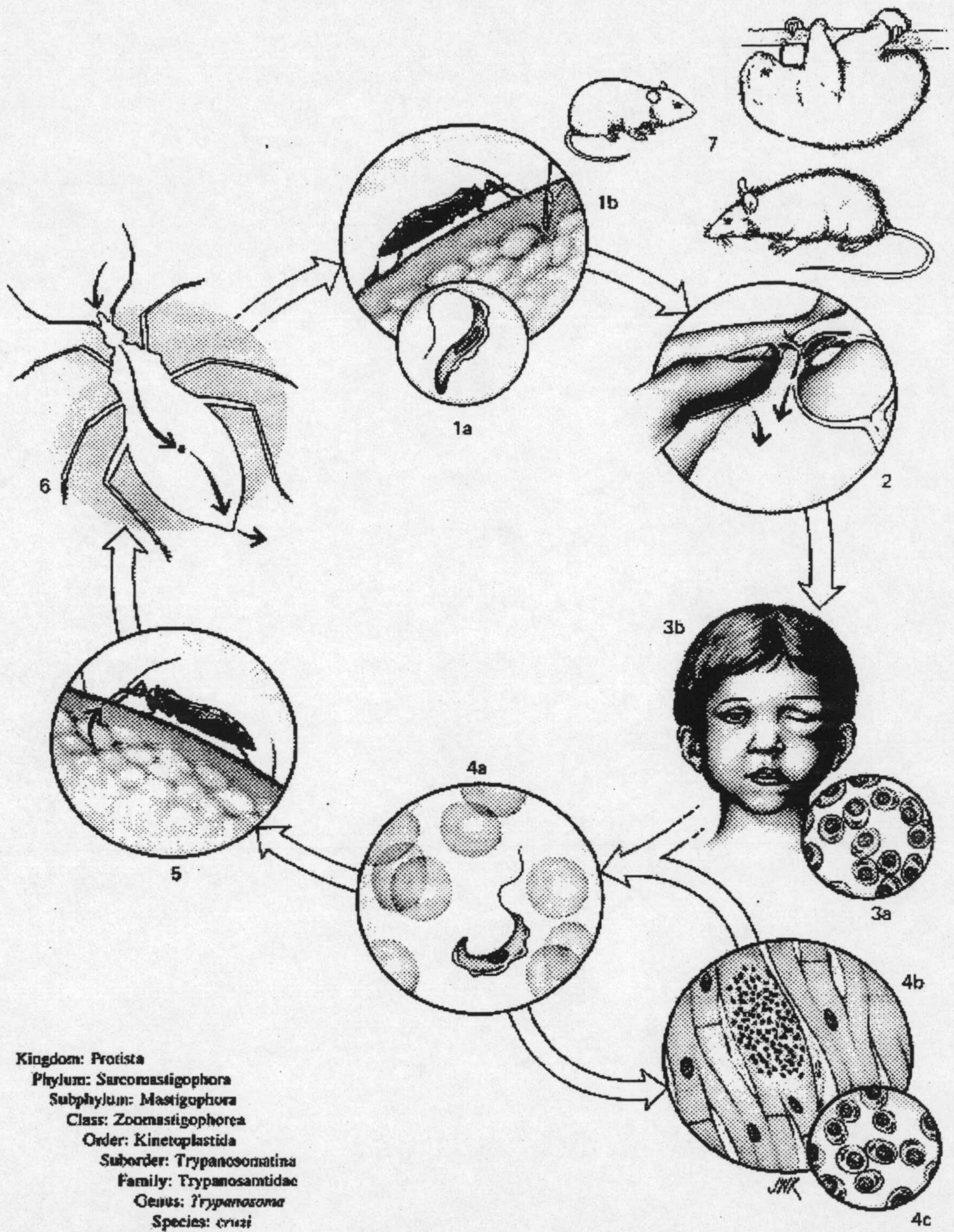


Figura I.1. Ciclo de vida de *T. cruzi*. 1. El insecto vector mientras se alimenta de la sangre del huésped (1b) deposita en sus excrementos las formas tripomastigotas. 2. El parásito penetra a través de discontinuidades de la piel o las mucosas. 3. Los parásitos infectan las células de los tejidos próximos al punto de entrada, donde se diferencian en amastigotes (3a), produciendo allí alteraciones locales (3b). 4. Algunas de las formas divisibles amastigotas se diferencian en tripomastigotes que quedan en libertad al eclosionar las células, diseminándose por el torrente sanguíneo e infectando nuevos tejidos (4a,b,c). 5. Las formas tripomastigotas sanguíneas pueden entonces ser ingeridas por el vector. 6. Los parásitos ingeridos viajan a través del tracto digestivo del insecto. En el tracto medio se transforman en epimastigotes que se reproducen y en el tracto posterior se diferencian en las formas tripomastigotas metacíclicas infectivas. 7. Reservorios naturales de *T. cruzi*.

I.4. BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS TRIPANOSOMATIDOS.

I.4.1. EL GENOMA DE LOS TRIPANOSOMÁTIDOS.

El DNA de los tripanosomátidos podemos clasificarlos en dos tipos bien diferenciados, por una parte el DNA nuclear y por otra el DNA correspondiente al kinetoplasto mitocondrial.

I.4.1.1. El DNA nuclear.

El genoma de *T. cruzi* es de aproximadamente 10^7 pares de bases, del cual sólo un 23 % del DNA es de copia única (Lanar y col, 1981*). Los cromosomas de estos protozoos no se condensan de manera visible durante el ciclo de vida lo que dificulta la asignación del número de cromosomas a la especie, sin embargo, se considera que oscila alrededor de 250, el más alto conocido para especie alguna.

La técnica de electroforesis de campo pulsado permite clasificar los cromosomas de los tripanosomátidos en tres grupos de acuerdo a su tamaño: a) aquellos que tienen un tamaño comprendido entre 700 y 4000 kb, son los cromosomas megabase y representa el 60% del genoma; b) los que tienen un tamaño comprendido entre los 150 y 500 kb, y por último c) los denominados minicromosomas con un tamaño entre 50 y 100 kb. Estos últimos sólo se han observado en *T. brucei*, *T. equiperdum*, *T. congolense* y *T. gambiense* (Van der Ploeg y col, 1984a) y *Leishmania* (Beverley y Cobum, 1990*).

I.4.1.2. El DNA del kinetoplástido.

El genoma mitocondrial de los tripanosomátidos contiene miles de minicírculos y 50 maxicírculos concatenados entre sí formando una compleja red denominada kinetoplástido. El DNA del kinetoplástido, kDNA, representa del 10 al 20% del DNA total (Simpson, 1987). Recientemente, Borst (1991) sugirió que esta estructura podría estar involucrada en el mantenimiento de la heterogeneidad del genoma mitocondrial.

El tamaño del DNA de los maxicírculos oscila entre los 20 kb en *T. brucei* y 40 kb en *C. fasciculata*, siendo en *T. cruzi* de aproximadamente 39 kb (Leon y col, 1980). Los maxicírculos contienen los genes codificantes para las proteínas y rRNA mitocondriales (Simpson, 1987). Los minicírculos están sujetos a una gran variación tanto en el tamaño como en la heterogeneidad de la secuencia dependiendo de la especie. Para *T. cruzi* el tamaño de los minicírculos es de 1.4 kb (Degrave y col, 1988*; Gonzalez, 1986*). Los minicírculos de todos los tripanosomátidos estudiados codifican para alguno o todos los gRNA (RNA guías)

requeridos para la corrección de los transcritos de los maxicírculos (Pollard y col, 1990; Sturm y Simpson, 1990; Stuart, 1991).

I.4.2. ORGANIZACION DE LOS GENES.

El genoma de *T. cruzi* presenta un 51% de DNA medianamente repetitivo frente a un 23% de copia única, y el resto altamente repetitivo. La mayoría de los genes descritos se repiten, organizados en tandem de repetición. Tal es el caso de los genes codificantes para los RNA ribosomales, rRNA, (Castro y col, 1981), del miniexón (De lange y col., 1984) de las histonas H2B y H2A (Salcedo y col, 1994*; Puertas, y col., 1994*) y de aquellos responsables de procesos celulares rutinarios (Genes housekeeping). Por contra, se han descrito muy pocos genes de copia única, entre ellos el correspondiente a la topoisomerasa II (Fragoso y Goldenberg, 1992*), el gen de la MIP, una proteína secretada al exterior por los tripomastigotes relacionada con la infectividad del parásito (Moro y col, 1994*) y el correspondiente a la DHFR-TS de *T. cruzi* tal y como se presentará en esta tesis doctoral.

En cuanto a la ploidía de los tripanosomátidos Iovannisci y Beverley (1989) indicaron que los "genes housekeeping" de *L. major* son diploides, y otros estudios revelaron que la DHFR-TS de *L. major* es diploide (Beverley y col, 1988). En el caso de *T. cruzi* un estudio de localización cromosómica de los genes codificantes para varios antígenos apoyó fuertemente la diploidía en este organismo (Henriksson y col., 1990).

I.4.3. TRANSCRIPCION Y PROCESAMIENTO DE LOS RNA MENSAJEROS.

La transcripción de los genes de los tripanosomátidos es policistrónica (varios genes se transcriben en un misma molécula de RNA precursora) (Gonzalez y col, 1985; Muhich y Boothroyd, 1988). La maduración de los RNA incluye la adición al extremo 5' de una secuencia conocida como mini-exon o "spliced leader", y la poliadenilación del extremo 3'. Por su parte los RNA mitocondriales sufren además una maduración especial conocida como corrección o edición del RNA (3' RNA editing).

I.4.3.1. Adición del miniexón: "trans-splicing".

Hasta el momento todos los mRNA localizados de tripanosomátidos portan en su extremo 5' una secuencia conocida como mini-exón o "spliced leader". Es más, el uso de oligonucleótidos complementarios a la secuencia del mini-exón inhibe la traducción "in vitro" de los RNAs de *T. brucei*, lo que indica que probablemente todos los mRNAs contienen esta secuencia en sus extremos 5' (Cornelissen y col., 1986*; Walder y col., 1986*). El mecanismo por el que se produce la adición consiste en una unión intermolecular en trans (Sather y Agabian,

1985) y recibe el nombre de "trans-splicing". El mini-exon consiste en una secuencia de 39 nucleótidos, cuyo extremo 5' empieza con una estructura de CAP o caperuza, diferente a la descrita en eucariotas y consistente en una 7 metil guanosina unida mediante un enlace 5'-5' trifosfato a 4 nucleótidos de secuencia variable (Freistadt y col., 1986*; Perry y col., 1987). La adición de esta secuencia se produce entre unas 30 y 70 pb corriente arriba sobre el codon de iniciación del RNA mensajero y ocurre siempre sobre el dinucleótico AG, que actúa como aceptor del mini-exon (Padgett y col., 1986).

Son varias las funciones asignadas al "trans-splicing" entre otras: a) la resolución de los transcritos policistrónicos iniciales en RNAm individuales; b) transporte de los RNAm maduros a través del núcleo; c) actuar como señales de reconocimiento necesarias para la unión de los ribosomas y d) proporcionar estabilidad a los transcritos en virtud de la estructura en CAP del extremo 5' (Laird, 1989; Agabian, 1990; Perry y Agabian, 1991*).

I.4.3.2. Poliadenilación.

Los RNA mensajero maduros de los tripanosomátidos, al igual que ocurre con la mayoría de los RNAm eucarióticos, poseen en su extremo 3' una cola constituida por un número variable del nucleótido adenosín monofosfato, denominada poli(A). Esta cola tiene una longitud aproximada entre 200-250 nucleótidos en el momento de su síntesis que va disminuyendo a lo largo del tiempo (Jackson y Standart, 1990). La adición de cola de poli(A) comienza con la acción de una endonucleasa que corta el transcrito primario en su extremo 3' a la que sigue un poli A polimerasa que añade los residuos A en extremo 3' del transcrito utilizando como dador de adenilatos el ATP. Por último esta cola se enrolla alrededor de varias copias de una proteína de unión de 78 kD.

En eucariotas superiores se ha descrito una secuencia consenso de seis nucleótidos AAUAAA situada entre 10 y 35 nucleótidos corriente arriba del sitio de poliadenilación. Se ha demostrado que esta secuencia consenso actúa como sitio de reconocimiento de la endonucleasa, sin embargo esta secuencia no es suficiente por sí sola para dirigir la poliadenilación siendo también importante el entorno (Wahle y Keller, 1992). En tripanosomátidos no se ha encontrado ninguna secuencia consenso relacionada con el sitio de poliadenilación.

Aún no están bien definidos cuales son los papeles de la poliadenilación aunque todo parece apuntar que está relacionada con la estabilidad de los transcritos. En tripanosomátidos además se ha comprobado que el 'trans-splicing' está acoplado a la poliadenilación (LeBowitz y col., 1993).

I.4.3.3. Corrección post-transcripcional de los RNA mitocondriales: "RNA editing".

En virtud de este proceso los transcritos primeros mitocondriales sufren una serie de adiciones o deleciones de uridinas que conducen a la aparición de nuevas pautas de lectura, no presentes en el mensajero primario (revisión en Hadjuk, 1993). Son varios los modelos propuestos para el mecanismo de corrección de los RNA, pero en todos ellos la corrección se produce gracias a la información contenida en los llamados RNA guías (gRNA). Estos gRNA actúan como molde, y la adición o deleción de uridinas se hace en base a la consecución de una complementaridad perfecta entre el híbrido mRNA-gRNA, complementaridad que contempla la formación de pares de bases G-U junto los convencionales pares A-U y G-C.

El papel que tiene la corrección de los RNA mitocondriales en tripanosomátidos es difícil de asignar aunque podría tratarse de un medio de regulación de la expresión, al igual que acontece en eucariotas superiores donde existe la posibilidad de una eliminación diferencial de los intrones.

I.4.4. REGULACION GENICA DE LOS TRIPANOSOMATIDOS.

La regulación de la expresión génica en tripanosomátidos se refleja en el complejo ciclo de vida de *T. cruzi* y el de el resto de los tripanosomátidos, determinando que el producto de muchos genes sólo sea detectable en alguna de los estadios de desarrollo del parásito.

La expresión génica implica tres pasos fundamentales: la transcripción, el procesamiento de los transcritos primarios y la traducción. La transcripción y el procesamiento se realizan en el núcleo y la traducción en el citoplasma. A estos niveles junto con la salida del mRNA del núcleo es donde tiene lugar de la expresión.

La inusual transcripción policistronica sugiere en tripanosomátidos una menor relevancia de la regulación transcripcional. Por otro lado, son muy pocas las regiones observadas con actividad promotora o responsables de la transcripción, no conociéndose secuencias consenso al respecto, como las existentes en eucariotas y procariotas. A pesar de todo, las secuencias promotoras correspondientes a los sitios de expresión de los genes VSG de *T. brucei* presentan un elevado grado de homología (Gottesdiener y col, 1991).

La capacidad que tienen los tripanosomas africanos de eludir la respuesta inmune cambiando regularmente una glicoproteína de superficie denominada VSG ("Variant surface

glycoprotein") (Boothroyd, 1985*; Borst, 1986) constituye uno de los ejemplos mejor estudiado de regulación génica en tripanosomátidos. Cada proteína VSG está codificada por un gen distinto, siendo el número de genes de aproximadamente 1000. Los genes VSG están presentes en todos los tipos de cromosomas y sólo se expresan si están situados en un sitio de expresión (ES, "expression site"). Cada organismo tiene unos 15 sitios de expresión, que se localizan cerca de los telómeros de los cromosomas, y sólo uno de ellos es funcional en un determinado instante. El gen que se está expresando recibe el nombre de copia ligada a la expresión (ELC, "Expression Linked Copy"). La activación de un VSG supone la duplicación y trasposición del gen a uno de los sitios teloméricos de expresión, aunque los genes VSG presentes ya en un sitio de expresión pueden ser activados e inactivados sin ningún tipo de reorganización génica.

Si bien la regulación post-transcripcional parece jugar un papel fundamental en la expresión génica en la familia trypanosomatidae, los mecanismos reguladores no han sido claramente definidos, aunque es importante destacar la importancia de las secuencias no traducidas del RNA mensajero. En este sentido Zomerdijk y col. (1990), estudiando la expresión de los genes VSG, encontraron que dos construcciones que diferían en la naturaleza de las secuencias situadas entre el promotor y la secuencia codificante diferían 20 veces en la actividad de un gen marcador. Por otro lado Hug y col. (1993) mediante experimentos de transfección en *T. brucei* confirmaron que la región 3' no traducida puede influenciar los niveles de expresión de un gen marcador, provocando incluso que la expresión de un gen "reportador" sólo sea detectada en ciertos estadios del ciclo de vida del parásito. El papel de las secuencias 3' no traducidas parece ser controlar la estabilidad del mRNA tal y como se ha descrito en otros eucariotas (Jackson y Standart, 1990), y cabría esperar que el papel de las secuencias en 5' sea el mismo.

I.5. BIOQUÍMICA DE LOS TRIPANOSOMATIDOS.

I.5.1 Características generales.

Los tripanosomátidos presentan ciertas características propias que los diferencian del resto de los eucariotas y procariotas (Revisión en Glew, 1988; y Urbina 1994). Entre otras destacan las siguientes:

- a. Utilizan como fuente principal de carbono ácidos grasos no esterificados y sobre todo ciertos aminoácidos (Cazzulo, 1984*; Cazzulo, 1992*).
- b. En un medio rico en carbohidratos, los parásitos los degradan incompletamente, incluso en presencia de oxígeno, dando lugar a una mezcla de CO₂ y productos como ácidos dicarboxílicos (Cannata y Cazzulo, 1984). La ruta glicolítica no está regulada en sus puntos clásicos, hexoquinasa y fosfofructoquinasa, completándose además (hasta el paso catalizado por la

fosfoglicerato kinasa), en un microcuerpo llamado Glicosoma. Este microcuerpo contiene también dos enzimas implicadas en el metabolismo del glicerol (Opperdoes, 1987).

c. Presentan la notoria capacidad para capturar proteínas procedentes del exterior y almacenarlas en unos orgánulos llamados reservomas, de donde son movilizadas en condiciones de stres nutricional (Cazzulo, 1984*; Soares y de Souza, 1991*). La abundancia de proteasas localizados en orgánulos especializados de la célula del parásito sugieren que podrían estar involucradas en la movilización de estas proteínas de reserva (Cazzulo, 1989*).

d. Presentan varios enzimas particulares involucrados en la defensa del parásito frente a la respuesta oxidativa producida por los macrófagos. Tales son una superoxido dismutasa insensible a CN, la tripanotión reductasa y la tripanotión oxidasa (éstas dos últimas exclusivas de los tripanosomátidos)

c. Por último presentan una serie de proteínas de superficie tales como fosfatasas ácidas y proteasas, que estarían involucradas en las interacciones parásito-huesped y en el desbloqueo por hidrólisis de la respuesta inmune.

I.5 2. Metabolismo pirimidínico.

Los nucleótidos pirimidínicos junto con los purínicos constituyen los precursores del DNA y del RNA. Todos los miembros del orden kinetoplastidae, entre ellos *T. cruzi*, presentan dos vías de síntesis de los nucleótidos pirimidínicos: una vía de síntesis de novo y una vía de salvamento (La fon y col, 1982; Hammond y Gutteridge, 1984).

La ruta de biosíntesis de novo es similar a la descrita en mamíferos y podemos dividirla en dos etapas. En la primera de ella tiene lugar la síntesis de UMP, y en una segunda etapa se sintetizan el conjunto de los nucleótidos pirimidínicos por modificación del UMP (Fig. I.2).

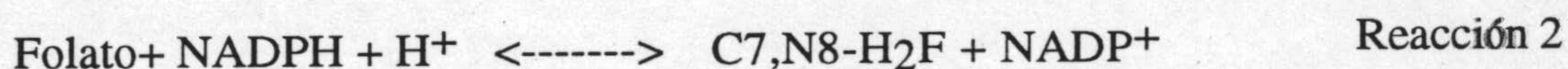
La síntesis de UMP parte de los precursores L-glutamina, HCO_3^- y L-aspartico, y transcurre mediante seis reacciones consecutivas catalizadas por sendas enzimas. Estas son: la carbamilsintetasa II, la aspartato transcarbamilasa, la dihidroorotasa, la dihidroorotato deshidrogenasa, la orotato fosforibosil transferasa y la orodilato descarboxilasa que rinde por último UMP (Figura I.2). Las cuatro primeras enzimas se encuentran localizadas en el citoplasma, mientras que las dos últimas están estrechamente ligadas a los glicosomas (Hammond y col., 1981). En el hospedador mamífero la cuarta enzima de la ruta, la dihidroorotato deshidrogenasa, se encuentra ligada a la membrana interna de la mitocondria y está asociada con la cadena transportadora de electrones, mientras que la correspondiente del parásito, además de ser citosólica, utiliza el oxígeno como aceptor final de los electrones de la reacción (Pascal, 1983).

El resto de los nucleótidos pirimidínicos se sintetizan ahora a partir del UMP. El CTP se obtiene mediante dos fosforilaciones sucesivas del UMP que rinden UTP, seguido de una aminación catalizada por la CTP sintetasa. Los desoxirribonucleótidos trifosfato dCTP y dUTP se obtienen por la acción de una ribonucleótido reductasa sobre los ribonucleótidos correspondientes. En cambio el dTMP se obtiene por metilación del dUMP, en una reacción catalizada por la timidilato sintasa y dependiente del cofactor N5,10-metilen-tetrahidrofolato (CH₂-H₄F). En protozoos la timidilato sintasa está asociada con la dihidrofolato reductasa, formando parte de un enzima bifuncional, de la que hablaremos con más detenimiento, y que constituye el detalle más característico en la síntesis de novo de nucleótidos pirimidínicos en tripanosomátidos.

En cuanto a la ruta de salvamento, indicar que todos los tripanosomátidos presentan alguna ruta de salvamento in vitro, y destacar también la presencia de otra enzima inédita, la uracil fosforibosil transferasa, que media la recuperación de uracilo en tripanosomátidos.

I.6 DIHIDROFOLATO REDUCTASA.

La dihidrofolato reductasa (DHFR) cataliza la reducción de dihidrofolato (H₂F) a tetrahidrofolato (H₄F) en una reacción que es NADPH dependiente (Reacción 1), y en menor grado es también capaz de catalizar la reducción de folato a H₂F (Reacción 2).



La DHFR es una enzima clave en el metabolismo de los organismos porque regenera el H₄F necesario para las reacciones de transferencia de unidades de carbono (Blakey, 1984), entre las que se cuenta la reacción catalizada por la timidilato sintasa. Así, la inhibición de la DHFR conduce a la interrupción de la síntesis de dTMP y por ello del DNA. La DHFR es el blanco de acción de numerosos agentes antibacterianos, antimaláricos y antitumorales (Schweitzer, y col., 1990). Además, se han descrito fenómenos de resistencia a fármacos que tienen como protagonista a la DHFR. Como consecuencia de todo esto, la DHFR ha sido el objeto de numerosos estudios biofísicos y bioquímicos, que han intentado explicar la estereoquímica de la reacción, así como el papel de determinados residuos en la catálisis y en la resistencia a drogas. Por otra parte su pequeño tamaño (18-22 kD), y el que se purifique sin problemas han facilitado en gran manera todos estos estudios.

1.6.1 ESTRUCTURA DE LA DHFR.

La homología que presentan estas enzimas a nivel de su secuencia aminoacídica es muy pequeña, e incluso en los residuos implicados en el centro activo no supera el 50%. En cuanto a la estructura tridimensional, son varias las DHFRs cuya estructura ha sido resuelta mediante cristalografía de R-X, entre otras: *Escherichia coli* y *Lactobacillus casei* (Bolin y col, 1982; Filman y col, 1982), ratón (Stammers y col, 1987), pollo (Matthews y col, 1985a), humana (Oefner y col, 1988; Codi y col, 1993) y parcialmente la de *Pneumocystis carini* (Stammers y col, 1993). En el caso del enzima de *E.coli* se han determinado las estructuras del enzima libre (Bystroff y Kraut, 1991); de los complejos binarios enzima-MTX, (Bolin y col, 1982), enzima-trimetoprim (Mathews y col, 1985a) y enzima NADP⁺ (Bystroff y col, 1990); del complejo terciario enzima-folato-NADP⁺ (Bystroff y col., 1991), así como la estructura de multitud de mutantes complejados con uno u otro inhibidor. A pesar de la baja homología a nivel de la estructura primaria, la estructura terciaria obedece a un modelo altamente conservado.

Todas Las DHFRs conocidas se pliegan en 8 láminas β (35% de la secuencia de la secuencia polipeptídica), 7 paralelas (β -A, β -B, β -C, β -D, β -E, β -F, β -G) y una antiparalela (β -H), y cuatro α -hélices que se insertan entre los giros (loops) que conectan las láminas β (α -B, α -C, α -E y α -F. (Figura 1.3). La mayor parte de las discrepancias observadas entre la secuencias polipeptídicas de las distintas DHFRs ocurren a nivel de los giros que conectan los elementos de la estructura secundaria (Volz y col., 1982). Sin embargo, las estructuras cristalinas de las DHFRs de vertebrados (Matthews y col., 1984a; Oeffner y col., 1988) señalan la existencia de una α -hélice adicional (α -E') en la región que conecta α -E a β -E. .

Tanto el NADPH como el H₂F se unen al enzima en unas conformaciones extendidas, por lo que el enzima posee regiones diferentes adaptadas a la unión de las distintas partes del cofactor y el sustrato (Bolin y col., 1982; Filman y col., 1982, Bystroff y col., 1990). El sitio activo queda definido por los sitios de unión de la porción nicotinamídica del NADPH y del anillo pteridínico del H₂F y su localización corresponde con una cavidad extendida que divide la proteína formada por residuos de las láminas centrales β -A y β -F, de la hélice α -C y del giro que sigue a la lamina β -A.

La DHFR es altamente accesible al disolvente detectándose mediante R-X cientos de moléculas de H₂O. Dos de ellas están conservadas en todas las estructuras cristalinas resueltas hasta la fecha y coinciden con las dos únicas moléculas detectadas en disolución de la DHFR de *L. casei* libre y complejada con MTX y NADPH (Gerothanassis y col., 1992). Estas dos moléculas de H₂O se ubican en el sitio activo del enzima e interaccionan con el anillo de la pteridina del sustrato, por lo que están involucradas en la fijación del sustrato y como veremos más adelante en catálisis.

Figura I.3. *Estructura de la DHFR.* A. Esqueleto carbonado de la DHFR de *E.coli* conteniendo MTX unido (Bolin y col., 1982). B. Ambiente del sitio activo de la DHFR de *E. coli* correspondiente al complejo ternario DHFR-H₂F-NADP⁺ (Bystroff y col., 1990).

Si bien todas las DHFRs poseen una estructura terciaria que se ajusta a la definida, existen pequeñas variaciones que determinan la estereoespecificidad con la que se unen ciertos inhibidores (Matthews y col, 1985b). Para el enzima de *E. coli* estudios de resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN) (Falzone et al, 1990), de flujo parado (stopped flow) (Pener and Frieden, 1985 y 1987), de estado estacionario (Appleman y col., 1990), indican que el apoenzima se encuentra al menos en dos conformaciones con distintas afinidades por el cofactor, sustrato e inhibidores, y tan sólo uno de estos conformeros es catalíticamente activo. Estas conformaciones explican la histéresis observada en la reacción catalizada por las DHFRs bacterianas, cuando la reacción es iniciada con el enzima. Bystrof y Kraut (1990), han analizado las estructuras correspondientes a la DHFR de *E. coli*., libre de inhibidores, el holoenzima con NADP^+ , del complejo terciario enzima-folato- NADP^+ , y el complejo binario enzima-sustrato, observando

pequeñas variaciones entre unas y otras. Estos autores señalan dos dominios más o menos rígidos en el enzima y un movimiento relativo de bisagra entre uno y otro dominio, en virtud del cual discuten las distintas conformaciones observadas. Estos dominios serían: el correspondiente al sitio de unión de la adenosina (ABD), menor y formado por las láminas β -B, β -C, y β -D y las hélices α -E y α -C; y el dominio mayor formado por las láminas β -G, β -H, β -F, β -A y las hélices α -B y α -F. El coenzima y el sustrato se unen en el espacio que queda entre los dominios, excepto la adenosina y el grupo 2' fosfato del coenzima que se unen exclusivamente en el ABD. La unión del primero de los sustratos es el que promueve el movimiento de los dominios, provocando un estrechamiento del sitio de unión del P_{AGB} (definido por varios residuos hidrofóbicos de las cadenas α -C y α -B) y del sitio de unión del pirofosfato (delimitado por los extremos aminoterminales de las hélices α -C y α -F). La formación del complejo terciario no conlleva desplazamientos relativos de los dominios, tan sólo un desplazamiento de la α -hélice B y del giro que precede a esta hélice. Esto sugiere que la unión del primer sustrato es el que costea el gasto energético del cambio conformacional.

1.6.2. DHFR: MECANISMO CINÉTICO Y CATALÍTICO.

La DHFR es una enzima muy versátil y ello se traduce en la existencia de notables diferencias desde el punto de vista cinético entre los enzimas correspondientes a distintos orígenes. Así las DHFR de procariotas, al contrario de lo que ocurre con las correspondientes a vertebrados, presentan una k_{cat} dependiente de los valores de pH (la velocidad de la reacción disminuye a medida que aumenta el pH (Stone y Morrison, 1984, Beard y col, 1989. Schweitzer y col, 1989; Andrews y col., 1989)). En esta misma línea el folato es un pobre sustrato para la DHFR de *E. coli* mientras que es procesado a una velocidad considerable por la de vertebrados (Schweitzer y col, 1989). Por último el enzima de *E. coli* presenta un comportamiento histérico lento que no ha sido detectado en los enzimas de vertebrados, y en éstos a su vez se ha descrito una histéresis

A

DIHIDROFOLATO

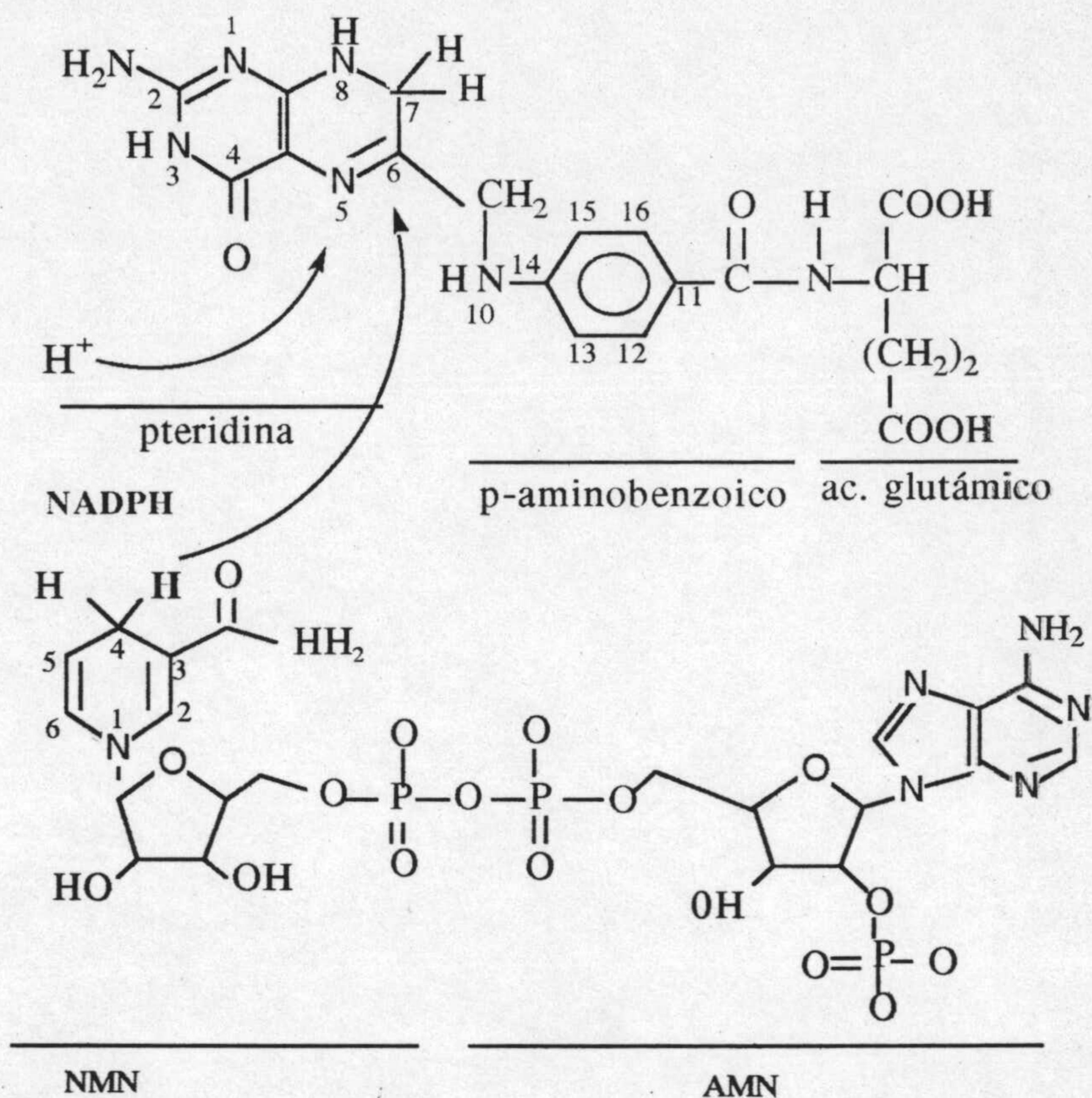
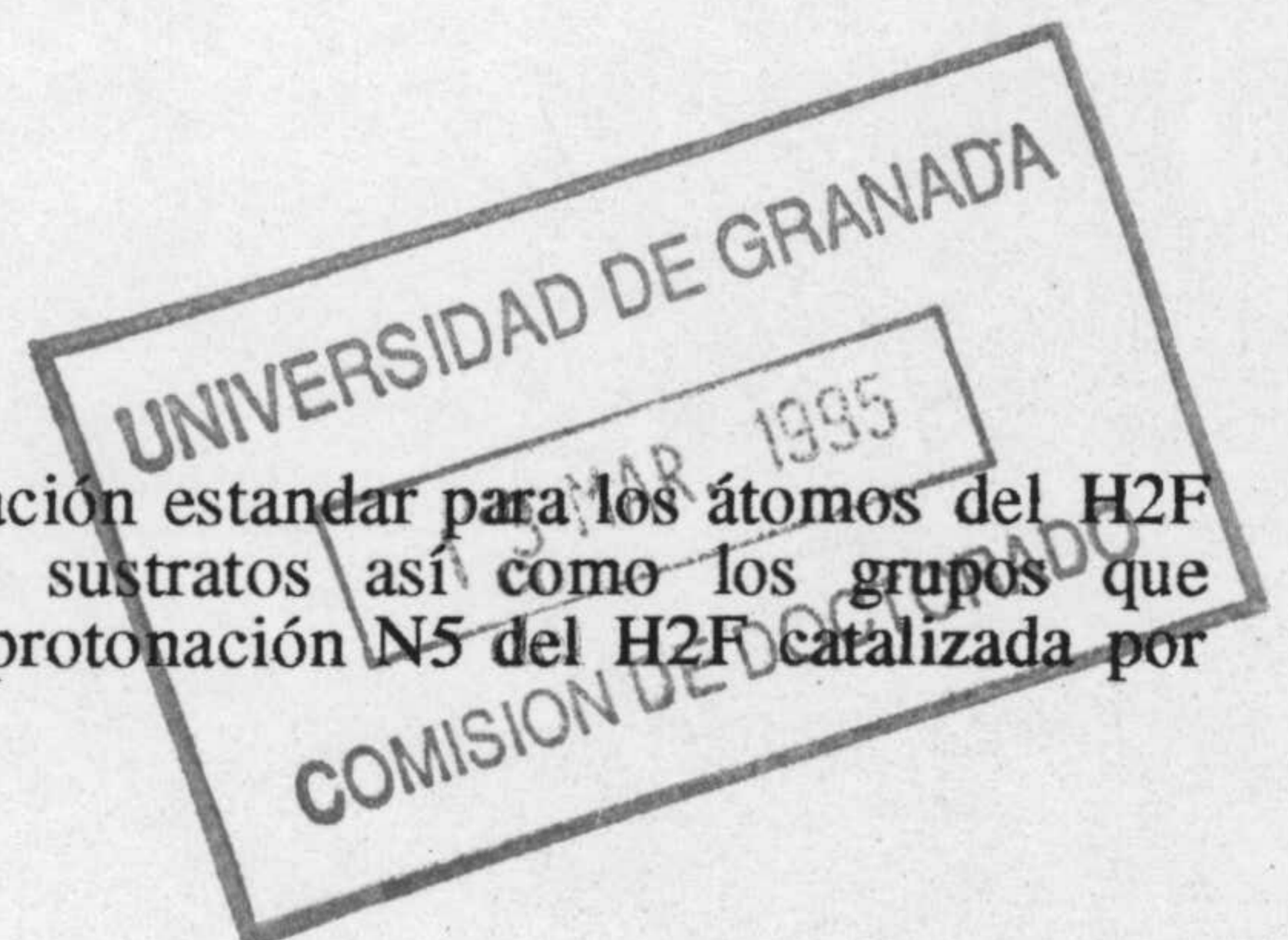


Figura I.4. Mecanismo catalítico de la DHFR. A Numeración estándar para los átomos del H₂F y NADPH. Se han indicado las partes integrantes de los sustratos así como los grupos que intervienen en la reacción. B Mecanismo propuesto para la protonación N5 del H₂F catalizada por el D27.



rápida que está ausente en las DHFRs de procariotas (Appleman y col, 1989). (Frieden (1970) acuñó el término histéresis para describir un tipo de anomalía en las curvas de progresión de la velocidad de las reacciones enzimáticas, ocasionada por procesos que implican cambios conformacionales del enzima, o de los complejos que forma el enzima con sustratos, productos o efectores).

El mecanismo cinético de la DHFR ha sido intensamente estudiado en *E. coli*, a pesar de lo cual todavía existen discrepancias. Con todo, el modelo que mejor ajusta los datos experimentales corresponde con un mecanismo en el que los sustratos se adicionan aleatoriamente, y en el que la etapa limitante de la velocidad corresponde con la liberación del producto H₄F (Penner y Frieden, 1987). Sin embargo, ciertos enzimas modificados puntualmente presentan un mecanismo en el que paso limitante de la reacción es la catálisis, en concreto un cambio conformacional asociado con la protonación del H₂F, previo a la transferencia del ión hidruro (Howell y col., 1986).

La dihidrofolato reductasa cataliza la reducción del doble enlace N₅=C₆ del anillo de la pteridina del dihidrofolato, quedando al término de la reacción los dos átomos unidos por un enlace simple, y cada uno de ellos unido a un átomo de hidrógeno (Fig. II.4). Uno de los hidrógenos necesarios procede de un ión hidruro aportado por el cofactor, mientras que el otro procede del enzima y protona el N-5 del anillo de la pteridina (Fig. I.4). De hecho, el enzima sin protonar es capaz de unir dihidrofolato pero no de catalizar la reacción, por lo que esta protonación precede y facilita la transferencia del ión hidruro (Stone y Morrison, 1984). Para el enzima de *E. coli* estudios de mutagénesis sobre el Asp27, situado en el sitio activo del enzima, indican que es el responsable de la protonación del N-5 del dihidrofolato (Howell y col, 1986). Por otro lado, la separación observada en la estructura cristalográfica (Bolin y col., 1982) sugiere que no está directamente involucrado en la protonación. Sin embargo, promueve la protonación gracias a la enolización del anillo de la pteridina mediante el paso de un protón del N-3 al O-4 a través de una de las moléculas de H₂O fijadas al sitio activo (*Morrison y Stone, 1988; Bystoff, 1990) (Figura I.4).

Por otra parte cálculos locales de densidad funcional (local density functional calculations) indican que la DHFR de *E. coli* provoca una polarización sobre el sustrato y un cambio de densidad electrónica sobre el enlace C₇=N₈ del anillo de la pteridina, disminuyendo la nube π y aumentando del carácter σ del enlace (Bajorath y col., 1991a). Estos mismos cálculos indican un aumento de la densidad electrónica en el O-4, lo que apoya que un intermediario protonado en el O-4 es mecanísticamente importante en la protonación del N-5 (Bystoff y col., 1990). El 65% de la polarización sufrida por el sustrato procede de los residuos conservados, sin embargo el 35% restante deriva del resto del holoenzima, subrayando la importancia de los restos no conservados en la catálisis.

El efecto que ejerce la DHFR de *E. coli* sobre el NADPH unido ha sido también analizado en base a los cálculos indicados en el apartado anterior (Bajorath y col., 1991b). Al igual que ocurría con el sustrato, el enzima produce una polarización a lo largo de toda la molécula, equivalente a un desplazamiento de carga de 0.7 veces la del electrón. Esta polarización se refleja en el anillo de la dihidronicotinamida en forma de una disminución de carga, mostrando que el cofactor evoluciona hacia el estado de transición en donde adquiere carga positiva (Figura I.4) En la polarización observada juegan un papel principal un motivo estructural formado por varios aminoácidos básicos, Arg44, Lys70 y Arg98. Estos aminoácidos interaccionan con la adenosina del cofactor, sobre la que aumenta la densidad de carga, y a ellos se deben el 60% de la polarización observada en el cofactor.

1.7 TIMIDILATO SINTASA.

La timidilato sintasa (TS) cataliza la conversión de dUMP y N5,10-metilentetrahidrofolato (CH₂-H₄F) en dTMP y dihidrofolato (Reacción 3). Este enzima proporciona la única vía de síntesis de novo de dTMP, y cataliza la única reacción del metabolismo en la que el CH₂-H₄F es oxidado durante la transferencia de la unidad de carbono.



La TS es un enzima esencial en casi todas las especies vivientes y es codificada incluso dentro de muchos virus, presumiblemente para incrementar la síntesis de DNA durante el ciclo celular. Dada su importancia en la síntesis de un precursor esencial del DNA la TS constituye un blanco terapéutico, y ha recibido por ello extensos estudios (revisiones en Santi y Danenberg, 1984, Dunlap y col, 1988).

1.7.1. ESTRUCTURA.

La TS se ha aislado de distintas fuentes, bacterias, bacteriófagos, levaduras, virus y vertebrados resultando en todos los casos un dímero de dos subunidades idénticas con un peso molecular de 35 KD por monómero (exceptuando los protozoos). Las secuencias primarias de las TSs conocidas indican que se cuenta entre los enzimas más conservados (Perry et al. 1990), con un periodo evolutivo de 22.9 millones de años, comparable al de los citocromos.

La estructura cristalina ha sido resuelta para el bacteriófago T4, humano, y para los procariotas *E. coli* y *L. casei*. En estos últimos organismos se dispone además de la estructura para el enzima libre y en distintas combinaciones con sustratos e inhibidores (Hardy y col, 1987, Perry y col 1990, Matthews y col., 1990a,b, Monfort y col, 1990, Finer-Moore y col, 1993).

Figura I.5. *Estructura de la TS.* Representación del esqueleto carbonado del complejo ternario formado por el dímero de la TS de *E. coli* y sus sustratos. Los dos ligandos se muestran en el sitio activo del monómero I (Montofort y col., 1990)

Todas las TS analizadas hasta la fecha son dímeros de dos subunidades idénticas relacionadas por un eje de simetría binario. Cada uno de los monómeros consta a su vez de dos dominios. El dominio mayor, común a todas las especies, agrupa 5 láminas β antiparalelas (β -i, β -v, β -iv, β -iii y β -ii) y las hélices A, B, G, H, I, J, K (Perry y col., 1990). El dominio menor es variable y en el caso del enzima de *L.casei* (Hardy y col, 1987) incluye las α -hélices C, D, E y F y una región desordenada entre las hélices α -D y α -E. En cambio *E. coli* carece de las hélices D, E, y F y el dominio menor está formado sólo por la hélice C y una región desordenada entre la hélice C y la G. La interfase entre uno monómero está constituida por las 5 láminas β (Figura I.5). De los 29 residuos que configuran la interfase la mitad pertenecen a las láminas β , y todos ellos menos dos son inaccesibles al disolvente. El resto de los aminoácidos que configuran la interfase pertenecen a giros de interconexión y son en su mayoría accesibles al disolvente..

El enzima posee dos sitios activos, uno por monómero, localizados en la superficie de una cavidad situada en el dominio mayor, en la interfase entre los monómeros. Cada uno de los sitios está limitado por 25 residuos, de los cuales quince son idénticos para 17 secuencias conocidas (Perry y col., 1990), pero sólo las cadenas laterales de 11 de los 25 residuos están involucradas directamente en la unión a sustrato (Montfort y col., 1990; Finer-Moore y col., 1990). Cuatro de los residuos que forman el sitio activo pertenecen a la otra subunidad explicando porqué el monómero es catalíticamente inactivo.

La TS no es un enzima rígido, estudios con los enzimas humano y *L. casei* indican una disminución del radio de stokes de un 3.5% después de formarse el complejo terciario (Lockshin y Danenberg, 1980), lo que sugiere un gran cambio conformacional. En efecto, estudios posteriores (Montfort y col., 1990, Finer-Moore y col., 1990 y Matthews y col., 1990ab, Kamb y col., 1992) han revelado la naturaleza de esos cambios conformacionales. La TS libre presenta una estructura relajada, en la que el sitio activo del enzima es accesible al disolvente. La unión del cofactor (CH₂-H₄F) dispara el cambio conformacional y provoca que los reactantes sean secuestrados del disolvente junto con varias moléculas de H₂O en un sitio activo cavernoso. Sustrato (dUMP) y cofactor son además orientados para facilitar la transferencia de carbono, con el anillo de la pirimidina del sustrato coplanar con el de la peridina del cofactor. Los mayores desplazamientos provocados por la unión del cofactor se reflejan extremo carboxi-terminal del enzima (~4 Å), que pasa a interactuar con él y con otros residuos del sitio activo. Por tanto el extremo carboxiterminal es necesario para que se produzcan los cambios conformacionales que secuestran y orientan los reactantes. En este sentido la delección de la valina C-terminal (V316 en *L. casei*) de la TS conduce a un enzima catalíticamente inactivo que, no obstante, es capaz de unir tanto el sustrato como el cofactor (Perry y col., 1993).

1.7.2 CINÉTICA Y CATÁLISIS.

La mayor parte de los estudios cinéticos han sido realizados sobre la TS de *Lactobacillus casei*. Este enzima en presencia de dUMP y la forma monoglutamada del cofactor exhibe un mecanismo cinético del tipo secuencial ordenado, en el que el desoxinucleótido se une primero seguido del cofactor y el H₂F es liberado antes que el dTMP (Daron y Aull, 1978). Sin embargo, cuando se utilizan formas poliglutamadas del cofactor, el orden de unión de los sustratos y de liberación de los productos se invierte (Matthews y col., 1987). Esta observación es de importancia porque en el interior de la célula los folatos se encuentran poliglutamados. (Foo y col., 1982). El enzima humano presenta también un mecanismo ordenado, pero la afinidad por folatos, monoglutamados o poliglutamados, es siempre la misma (Dev y col., 1994).

Experimentos mediante diálisis de equilibrio, RMN de ¹⁹F, y otros ensayos químicos sobre los enzimas correspondientes a *E. coli* y *L. casei* y (Revisión en Dunlap y col., 1988)

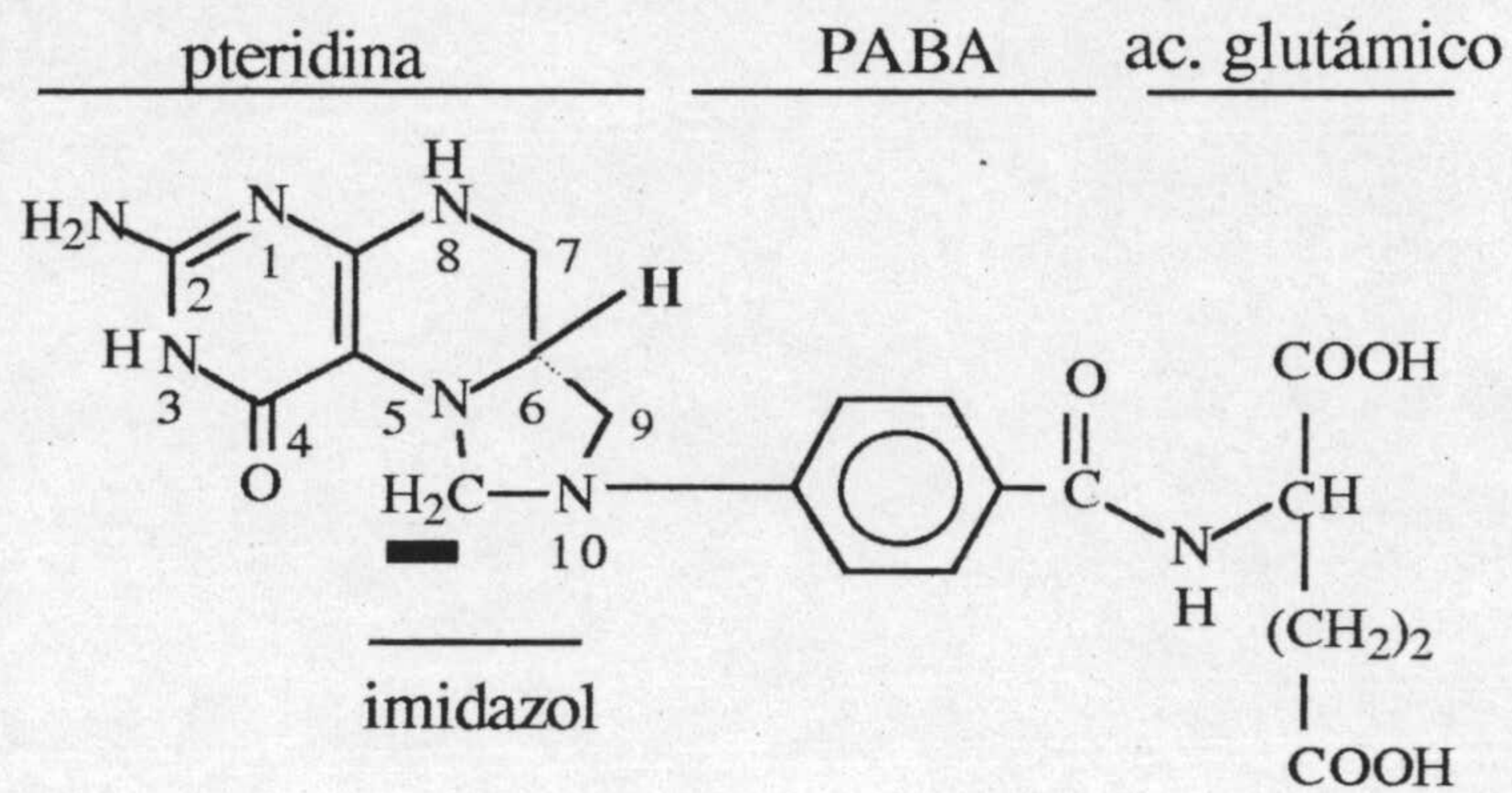
indican que los dos sitios activos reaccionan de una manera no equivalente, y lo mismo ocurre con el enzima humana donde existen evidencias de la existencia de dos sitios de unión asimétricos pero interactivos (Dev y col., 1994). Sin embargo, las estructuras cristalinas resueltas hasta la fecha no indican en ningún caso la no equivalencia de los sitios activos en la timidilato sintasa.

El mecanismo catalítico del enzima aparece reflejado en la figura I.6. La catálisis se inicia con la activación del C-5 del anillo de la pirimidina gracias al ataque nucleofílico del tiol de una cisteína del sitio activo al carbono C6. El enolato resultante (2) sufre a continuación un ataque nucleofílico del metileno del cofactor para dar el complejo ternario (3), en el que cofactor y sustrato está unidos covalentemente a través del C-5 del dUMP y el C-11 de la unidad de carbono. El protón del C-5 del anillo de la pirimidina es entonces abstraído, seguido de una β -eliminación del H4F, y una transferencia de hidruro por parte del C-6 del anillo de la pteridina al metileno transferido. Por último, la β -eliminación del enzima, ligada todavía al carbono C-6 del anillo de la pirimidina, rinde el dTMP producto de la reacción (Finer-Moore y col., 1990, Stroud y Finer-Moore, 1993).

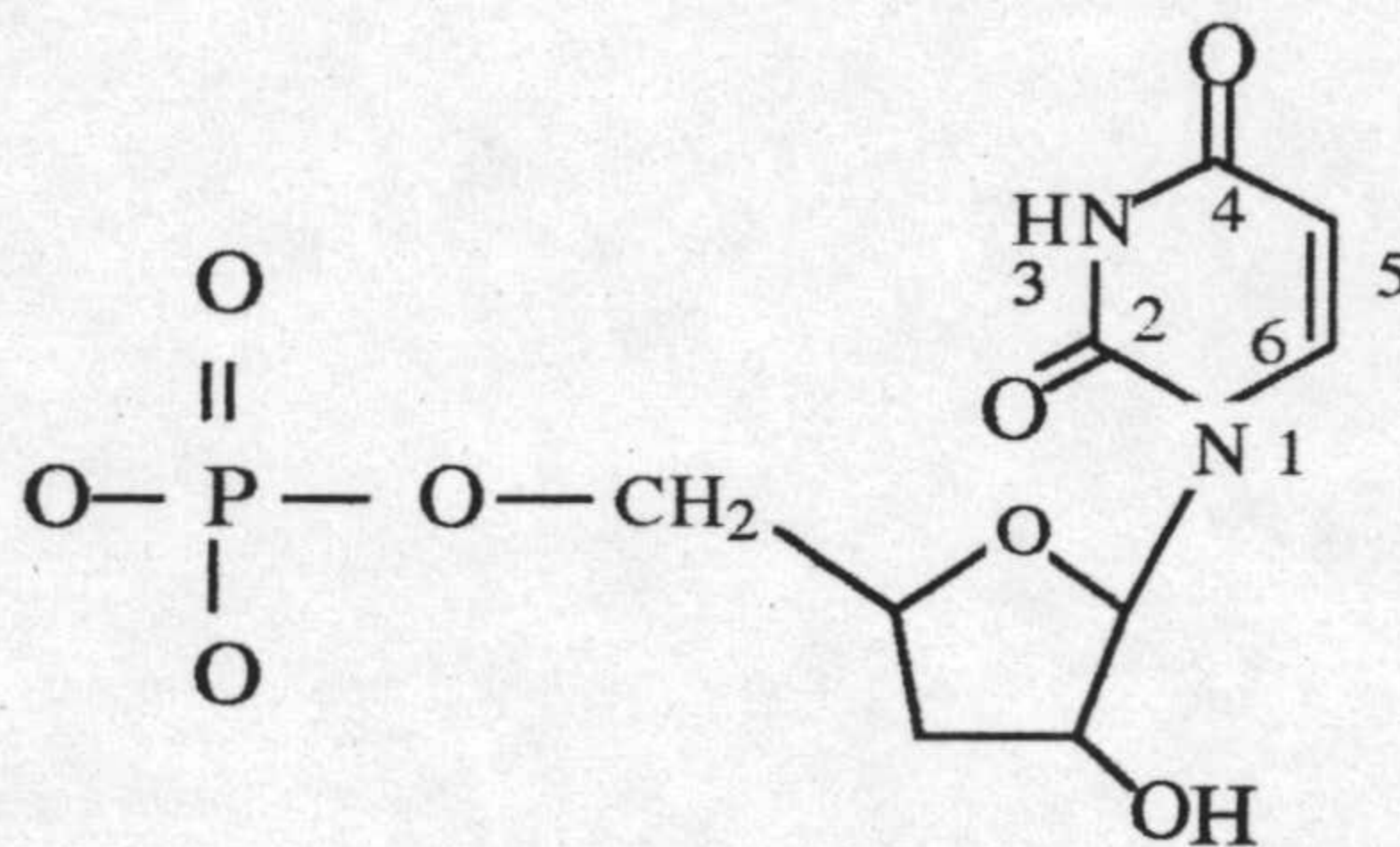
El complejo binario covalente que forman el enzima y el sustrato, E-dUMP, o el enzima y el FdUMP (un análogo del sustrato), E-FdUMP, se puede detectar en ausencia de cofactor. Sin embargo, la extensión con la que se detecta FdUMP unido covalentemente con el enzima es mucho mayor en presencia del cofactor (Moore y col., 1986). Esto apuesta por un mecanismo en el que previamente al inicio de la catálisis se produce la una unión no covalente de sustrato y cofactor (Santi y col, 1987).

A

5,10-CH₂-H₄F



dUMP



B

Figura I.6. A Numeración estandar de los átomos del lsustrato (dUMP) y del cofactor (metileno-tetrahidrofolato). Para el cofactor aparecen señaladas cada una de las partes de las que se compone. Subrrayado el metilo que se transfiere al carbono cinco del dUMP. En negrita el hidrógeno que reduce el grupo metileno transferido. B. Mecanismo propuesto para la timidilato sintasa. Las explicaciones en el texto.

Se ha aceptado que una forma activa del cofactor es la que condensa con el sustrato para formar el complejo ternario covalente y que probablemente se trata del imino ión 5-CH₂-H₄F (Benkovic y Bullard, 1973). De hecho, la estructura cristalina del complejo ternario FdUMP, cofactor y un mutante de TS de *I. casei* con una delección en la valina carboxiterminal ha permitido atrapar la forma hidroxilada de este imino ión. (Perry y col., 1993).

Junto al grupo tiol de la cys se ha propuesto que un ácido y una base general participan en la reacción de la TS. El primero de ellos tendría como misión protonar el N10 facilitando la apertura del anillo imidazólico, y la base participaría tomando un proton del C5 de la pirimidina antes de la eliminación del cofactor oxidado. Los residuos que podrían realizar este papel no se encuentran a la distancia apropiada de los sustratos en las estructuras resueltas, sin embargo, existen varias moléculas de H₂O ordenadas y conservadas en el sitio activo de moléculas que podrían desempeñar estos papeles (Finer-Moore y col., 1990, Matthews y col., 1990a,b).

I.8. DIHIDROFOLATO REDUCTASA-TIMIDILATO SINTASA DE PROTOZOOS.

La dihidrofolato reductasa (DHFR) (EC 1.5.1.3) y la timidilato sintasa (TS) (EC 2.1.1.45) catalizan reacciones secuenciales en el ciclo de síntesis de timidilato, el cual aporta a las células la única fuente de novo de 2'-desoxitimidilato para la síntesis de DNA. La TS cataliza una metilación reductiva del dUMP para dar dTMP en la que el cofactor para la reacción, el CH₂-H₄F, se oxida a H₂F. Entonces la DHFR reduce el H₂F a H₄F en una reacción que requiere de NADPH. Una tercera enzima, la serina hidroximetil transferasa (STH), regenera el CH₂-H₄F necesario para iniciar una nueva ronda de síntesis de dTMP (Figura 1.7).

Como hemos visto en los apartados anteriores tanto la timidilato sintasa como la dihidrofolato reductasa han sido extensamente estudiadas. Ambas enzimas existen como proteínas distintas en la mayor parte de los organismos estudiados (bacteriófagos, bacterias y vertebrados) en donde, como se ha citado, la TS es un dímero de dos subunidades idénticas de 35 kD, y la DHFR es un monómero de aproximadamente 20 kD (Blakey, 1984, Santi y Danenberg, 1984). En contraste, los protozoos (Ferone y Roland 1980, Ivanetich y Santi, 1990) y al menos algunas plantas (Cella y col., 1991, Lazar y col., 1993) presentan una proteína bifuncional con ambas actividades catalíticas localizadas en la misma cadena polipeptídica. El tamaño aparente de esta proteína oscila entre 110 y 140 kDa, con pesos por subunidad de 55-70 kDa. Al menos 11 especies de diversas clases y órdenes de protozoos poseen la DHFR y la TS unidas en una proteína bifuncional y hasta la fecha no se ha descrito ningún protozoo en el que esto no ocurra así.

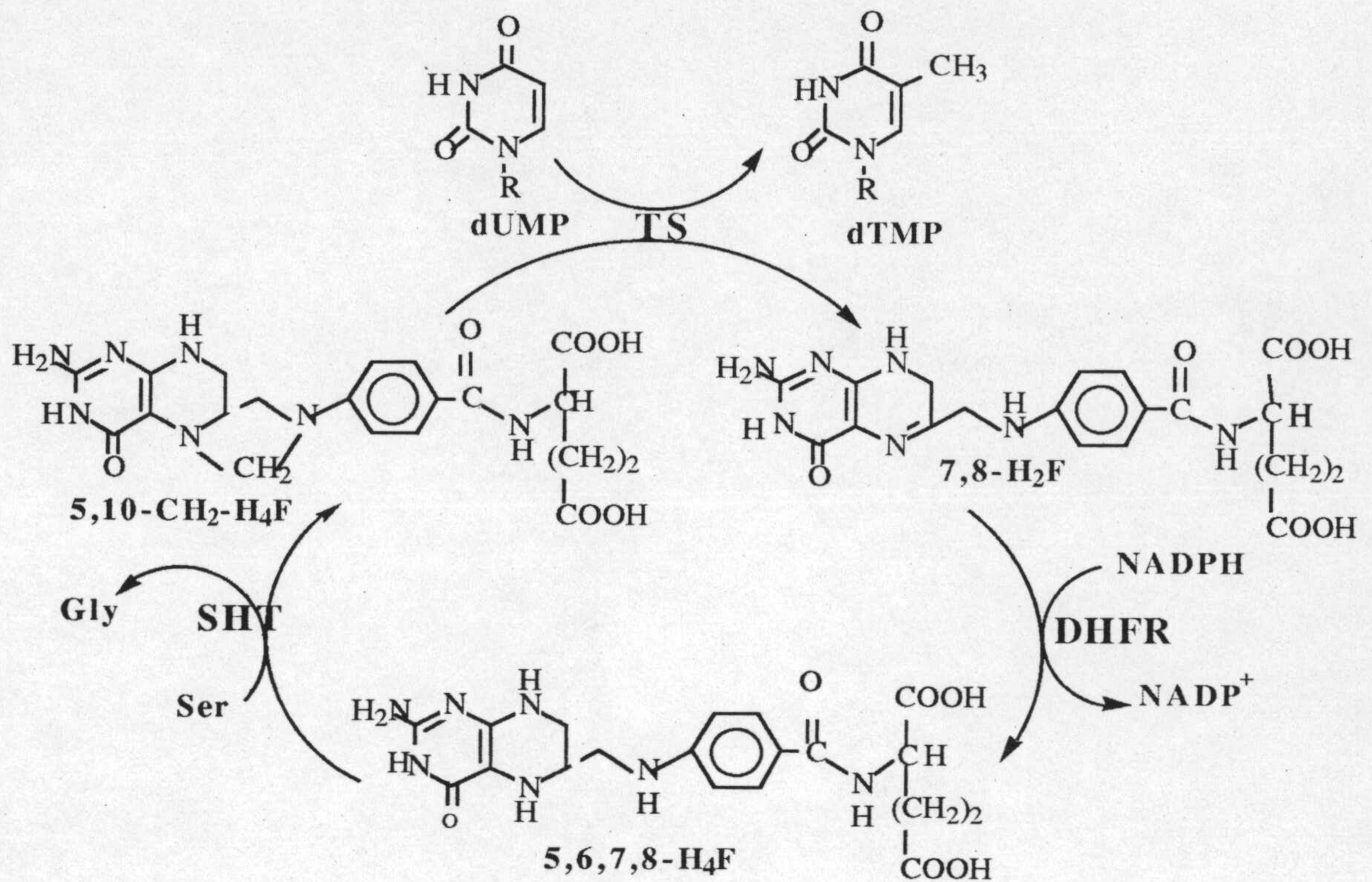


Figura I.7. Ciclo del TMP. Se indican las reacciones secuenciales de la dihidrofolato reductasa (DHFR), timidilato sintasa TS, y serina hidroximetil transferasa (STH). R, 2' desoxiribosa-5'-monofosfato.

Previo a este trabajo se conocían las secuencias codificantes para las DHFR-TS de los siguientes protozoos: *Leishmania major* (Beverley y col., 1986; Grumont y col., 1986), *Plasmodium falciparum* (Bzik y col., 1987), *Crithidia fasciculata* (Hughes y col., 1989), *Leishmania amazonensis* (Nelson y col., 199) y *Toxoplasma gondii*, (Roos, 1993). Todas ellas comparten las siguientes características: a) el extremo amino-terminal del enzima corresponde con la dihidrofolato reductasa y el carboxiterminal con la TS, b) la homología del dominio DHFR con otras proteínas homólogas es mucho menor que la homología que guarda el dominio TS con otras TSs; y c) la región que correspondería con el extremo carboxi-terminal del dominio DHFR y el extremo amino-terminal del dominio TS no guardan homología alguna con las secuencias conocidas de otras DHFRs o TSs.

Poco se conoce de la regulación de la expresión de la proteína pero es evidente que existe una regulación a lo largo de el complejo ciclo de vida de estos protozoos parásitos (Kapler y Beverley, 1989).

Figura 1.8. Estructura de la DHFR-TS de *L. major*. La figura representa el esqueleto carbonado de la DHFR-TS obtenida por Knighton y col (1994) mediante cristalografía de R-X.

1.8.1. Estructura de la dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa.

La estructura cristalina de la DHFR-TS ha sido resuelta recientemente para el enzima de *L. major* (Knighton y col., 1994). En ella destacan bien diferenciados los dominios DHFR y TS, contando cada uno de ellos con todos los motivos de la estructura secundaria que se encuentran en los enzimas monofuncionales homólogos de estructura cristalina conocida, localizándose las diferencias en las regiones que conectan esos motivos. Además ambos dominios guardan mayor similitud con las correspondientes enzimas de vertebrados que de procariotas. La estructura global indica que la proteína es un dímero y los contactos entre monómeros ocurren a nivel de dominio TS de manera similar a como ocurren en las restantes TSs.

El dominio DHFR de *L. major* cuenta con 231 residuos frente los 159 de *E. coli* y 186 de humano. Veinte y dos de estos aminoácidos se incorporan a una extensión del extremo aminoterminal que interaccionan con el dominio TS. Al igual que ocurre en vertebrados las α -hélices B, E y F están extendidas comparadas con las correspondientes hélices de las DHFRs bacterianas y además cuenta con la hélice α -E', sólo vista en las DHFRs de vertebrados (Oefner y col., 1988; Matthews y col., 1984a). Comparada con la DHFR de humano (Oefner y col., 1988), podemos distinguir varias diferencias: a) al inserción de 5 residuos en el giro que conecta

α -B y β -B. b) existe una inserción de 13 aminoácidos en el giro que conecta las láminas β -C y β -D con seis de ellos definiendo una nueva α -hélice (α -D) no observada en la estructura de otras DHFRs. c) hay una pequeña inserción de 3 residuos en una conformación de hélice 3_{10} en el giro que conecta α -F con β -F. d) la región que conecta β -F y β -G contiene cinco residuos adicionales. e) existe una discontinuidad entre las láminas β -G y β -H que en el caso de vertebrados afecta a 6 residuos mientras que para el dominio de *L. major* solo implica a dos aminoácidos. Con todo ello el dominio DHFR de *L. major* contaría con las 8 láminas β (β -A, β -B, β -C, β -D, β -E, β -F, β -G, β -H) descritas en todas las DHFRs y 6 hélices α (α -B, α -C, α -D, α -E, α -E' y α -F), siendo α -B, α -C, α -E, α -F comunes a todas las DHFRs.

En cuanto al dominio TS, la DHFR-TS de *L. major* (Knighton y col., 1994) contiene todos los elementos de la estructura terciaria de la TS de *E. coli* (Perry y col., 1990). Se distinguen así las 5 láminas β que delimitan la interfase entre los monómeros, β -B, β -C, β -D, β -E y β -F (β -i, β -v, β -iv, β -iii y β -ii respectivamente, según la nomenclatura de los enzimas de *L. casei* y *E. coli*), así como todas las hélices descritas en el enzima de *E. coli* (Perry y col., 1990): I, II, III, IV, V, VI, VII y VIII (A, B, C, G, H, I, J, K, según nomenclatura de *L. casei* y *E. coli*). Además el dominio TS de *L. major* incluye una hélice III' no descrita en otras TSs. Destaca también la extensión con una Arg, Arg275, del giro que conecta α -B y β -II. Esta arginina establece contactos con residuos del dominio DHFR, estabilizando la hélice 3_{10} .

I.8.2. DHFR-TS de *L. major*: Interacción entre dominios y canalización de sustrato.

La DHFR-TS más estudiada hasta la fecha corresponde con la de *L. major* (revisión en Garret 1984, Washien y Santi, 1987; Ivanetich y Santi, 1990), de la que se conocen muchos aspectos, algunos de los cuales podrían extrapolarse al resto de las DHFR-TSs. La DHFR-TS de *L. major* fue la primera enzima expresada en un protozoo patógeno en un sistema heterólogo (Grumont y col., 1988). El enzima expresado en *E. coli* parece ser idéntico al salvaje excepto en que el primero tiene el extremo amino libre, mientras que el enzima salvaje lo tiene bloqueado, probablemente acetilado.

Los parámetros cinéticos de las actividades individuales de la DHFR-TS bifuncional son similares a los descritos para las correspondientes proteínas monofuncionales (Meek y col., 1985) y el comportamiento cinético del enzima reproduce aspectos de las proteínas monofuncionales, tales como la histéresis de la DHFR, similar a la observada en procariotas (Appleman y col., 1992). Sin embargo, existen ciertas peculiaridades que son producto de las interacciones entre cada par de dominios del enzima bifuncional.

Table I.1. Clasificación de inhibidores enzimáticos irreversibles

Clase de inhibidor	$[I]/[E]$	Alcance de equilibrio
Clásico	$[I] \gg [E]$	Rápido
De unión fuerte	$[I] \approx [E]$	Rápido
De unión lenta	$[I] \gg [E]$	Lento
De unión fuerte y lenta	$[I] \approx [E]$	Lento

A continuación se describen algunos de los inhibidores de la DHFR.

parecen haber logrado el mismo efecto a través de la asociación de la TS y la DHFR en un complejo multienzimático (Mathews y col., 1988).

Una segunda ventaja podría ser el control coordinado. Las células necesitan al menos suficiente DHFR para que el H₂F sea reducido al mismo tiempo que se forma, por ello la producción y destrucción de DHFR y TS debe estar equilibrada para que la actividad TS sea siempre la limitante. En consecuencia, si se acepta que en la proteína bifuncional el balance de las actividades DHFR y TS están optimizadas, la cotranscripción y cotraducción proporciona *per se* un elemento de control coordinado.

I.9. INHIBIDORES DE LA DHFR.

Los inhibidores de un enzima tienen un doble interés. De una parte si se trata de una enzima blanco de acción de fármacos existe la posibilidad de utilizarlos como agentes terapéuticos, y por otra parte su uso permite extraer conclusiones a cerca del mecanismo catalítico y los residuos implicados en catálisis, reconocimiento de sustratos y selectividad enzimática. Además, de los estudios de inhibición se puede obtener en ciertos casos la información necesaria para abordar el diseño de fármacos mejorados.

La DHFR es un buen candidato para realizar estudios de inhibición. Es un importante blanco de acción de diversos agentes antimicrobianos, antifúngicos y antineoplásicos y además han sido descritos diversos fenómenos de resistencia a fármacos asociados con alteraciones en la DHFR (Revisión en Schweitzer, y col., 1990). Todas las DHFRs analizadas presentan una estructura básica común y en la mayor parte de las especies son homopolímeros de un peso molecular alrededor de los 25000 kD. Sin embargo, las diferencias entre ellas han demostrado ser suficientes como para que haya antifolatos que inhibidan específicamente determinadas DHFRs. Estas diferencias son aún más patentes en el caso de las DHFRs de protozoos, donde estas enzimas comparte la misma cadena polipeptídica que la TS, formando una DHFR-TS bifuncional. De hecho, ciertas enfermedades protozoarias tales como la malaria, la toxoplasmosis o la coccidiosis aviar han sido tratadas con éxito con antifolatos inhibidores de la DHFR (Siwaraporn y col., 1988). Pese a ello, hasta la fecha ninguno de los antifolatos ensayados ha resultado eficaz frente a las tripanosomiasis o leishmaniasis.

Desde el punto de vista cinético los inhibidores pueden clasificarse en dos grandes grupos: reversibles e irreversibles. Dentro de los primeros distinguimos a su vez distintos tipos en función la concentración de inhibidor que es inhibitoria y del tiempo requerido para el establecimiento del equilibrio entre el enzima y el inhibidor según refleja la tabla I.1 (Morrison y Walsh, 1988).

La estructura de R-X de la DHFR-TS de *L. major* (Knigton y col., 1994) muestra los contactos existentes entre las subunidades del dímero corresponden con los dominios TS. Y son muchas las evidencias que previamente indicaron que esas interacciones realmente existían. Entre otras, la conservación de los residuos correspondientes a la interfase del dímero de la TS de *L. casei* y los resultados de proteólisis limitada sobre la DHFR-TS. Estos últimos muestran que la proteólisis de uno de los dominios TS conlleva la inactivación de ambas TSs (Garvey y Santi, 1985).

La comunicación entre dominios DHFR-DHFR también deberían existir, en tanto que la unión de una molécula de MTX a uno de los dominios previene la unión al otro (Meek y col., 1985). Sin embargo, contradictoriamente la estructura de R-X de la DHFR-TS de *L. major* no refleja ningún contacto físico entre los dominios DHFR de cada subunidad.

Las interacciones del dominio TS con el DHFR son evidentes en tanto que ambas enzimas comparten la misma cadena polipeptídica. Entre las dos enzimas existe una canalización del H₂F producto de la TS hacia la DHFR, de manera que el H₂F es reducido antes de que difunda al medio (Meek y col., 1985). La estructura cristalina de la DHFR-TS no revela ningún tipo de subestructura que pueda estar implicada en la canalización. Aunque, sí muestra una peculiar distribución superficial de cargas positivas entorno a los sitios activos de la TS y la DHFR, que podría apoyar una canalización electrostática del sustrato (Knigton y col., 1994). A pesar de este fenómeno, cada actividad enzimática es autónoma como demuestra el que la completa inactivación de una de ellas, bien la DHFR o la TS, no produce la inactivación de la otra (Meek y col., 1985; Garvey y Santi, 1985).

1.8.3 Relevancia biológica de la DHFR-TS.

El origen evolutivo de la bifuncional DHFR-TS de protozoos es desconocido. No obstante, podría ser el resultado de la unión de dos genes independientes de un organismo ancestral primitivo. Esta hipótesis está sugerida por la existencia de organismos como el fago T4 y la bacteria *Bacillus subtilis* que poseen el gen de la DHFR en las cercanías y en 5' sobre el gen de la timidilato sintasa. En este caso, un simple mecanismo que destruyera el codón de terminación de la DHFR dejando un marco abierto de lectura a través de la TS, conduciría a un gen codificante para la proteína bifuncional.

Una de las posibles ventajas biológicas del enzima bifuncional podría ser la canalización del H₂F. Para la síntesis continua de dTMP es necesario reducir rápidamente el H₂F para evitar que haya una disminución en los niveles de H₄F. Puesto que el H₂F producido por la TS es reducido más rápido por la DHFR de lo que se libera en el medio, parece ser como si el enzima bifuncional estuviera optimizado para la síntesis continua de dTMP. De hecho, otros organismos

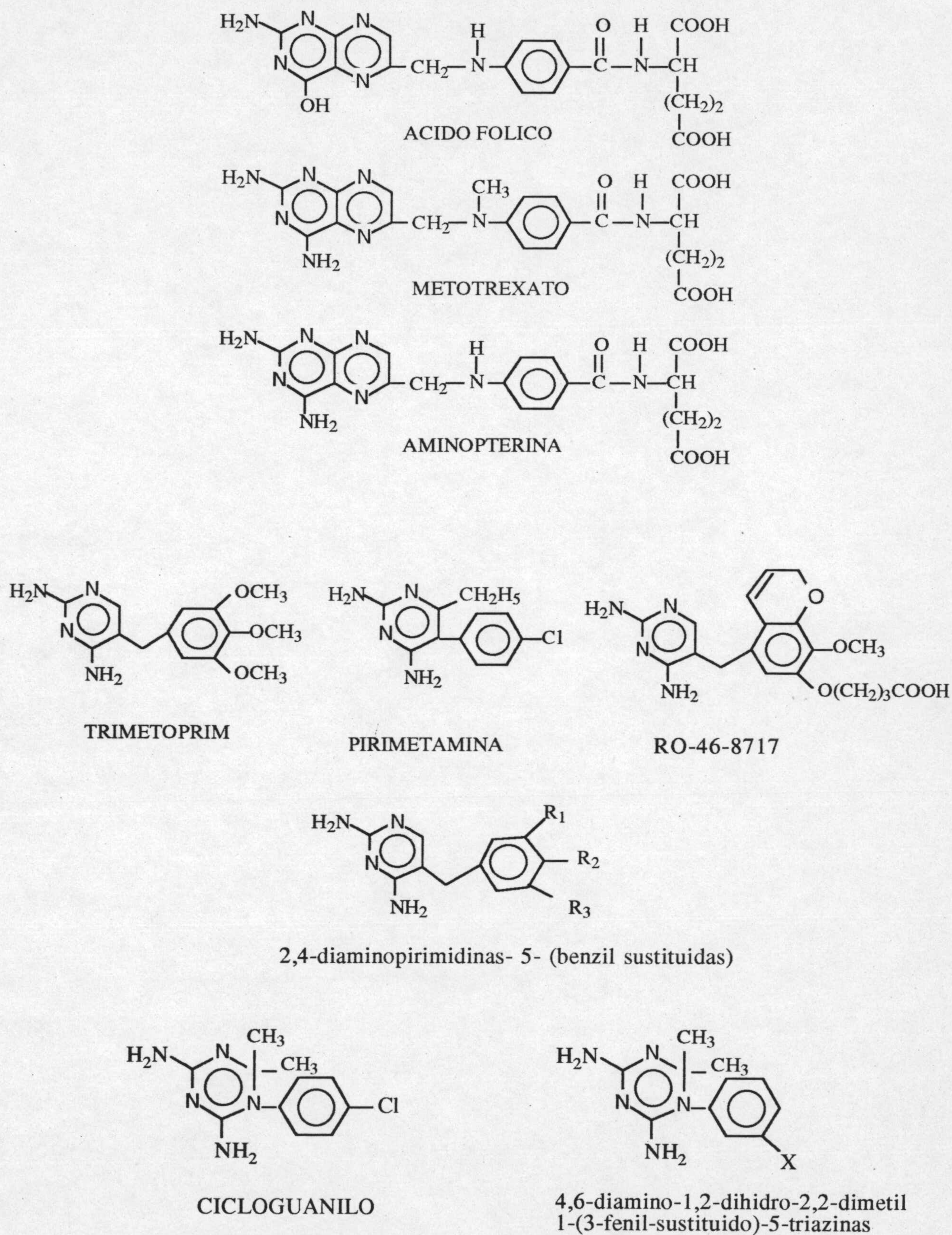


Figura I.9. Antifolatos inhibidores de la DHFR.

1.9.1. 2,4-Diaminopirimidinas sustituidas: trimetoprim, pirimetamina y RO-46-8717.

El trimetoprim (TMP), 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibenzil)pirimidina, (Brogden y col., 1982), la pirimetamina (Pyr), 2,4-diamino-5-(p-clorofenil)-6-etilpirimidina, (Loutfy y col., 1983) y el RO-46-8717 son 2,4-diaminopirimidinas y su fórmula estructural aparece indicada en la Figura I.9. Estructuralmente estos derivados se parecen a la porción pteridina del ácido dihidrofólico. TMP y PYR son ejemplos de inhibidores enzimáticos selectivos, empleándose de modo efectivo en el tratamiento de numerosas infecciones en condiciones seguras para el hospedador.

La Pyr se usa principalmente como antimalárico en la profilaxis, supresión y quimioterapia combinada de cepas de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina. Actúa mediante la inhibición de la DHFR a concentraciones mucho menores que las requeridas para producir una inhibición comparable del enzima de mamífero (IC₅₀ menor de 0.5 nM para *Plasmodium*, 700 para mamíferos y 2500 para *E. coli*. (Burchall, 1979)). Si embargo, en las áreas endémicas de *Plasmodium* se han descrito parásitos que han desarrollado resistencia a la droga en virtud de varios mecanismos (), entre los que se cuentan la existencia alteraciones puntuales en la DHFR. En concreto ciertas mutaciones en el residuo Ser108 confieren por sí solas resistencia (Cowan y col., 1988; Peterson y col., 1990; Foote y col., 1990).

El TMP fue utilizado inicialmente como un agente antibacteriano, pero combinado con otros agentes ha demostrado ser efectivo frente a varias enfermedades protozoarias. Así junto con una sulfamida se utiliza en el tratamiento de la toxoplasmosis causada por *Toxoplasma gondii*. Así mismo la neumonía causada por *Pneumocystis carinii* responde generalmente a una combinación de TMP y con sulfometoxazol.

El TMP se une aproximadamente unas 3000 veces más fuerte al enzima de *E. coli* que al enzima de vertebrados. Matthews y col (1984b) han estudiado la selectividad exhibida por el TMP frente la DHFR de *E. coli* y la de pollo, indicando que se debe a pequeñas variaciones estructurales existentes entre ambos enzimas. En el caso del enzima de procariontes el grupo trimetoxifenil del TMP ocupa un bolsillo hidrofóbico situado debajo del sitio activo. En cambio en vertebrados este grupo ocupa un bolsillo hidrofóbico situado encima del sitio activo. Se pierde así un enlace de hidrógeno que en el caso del enzima de *E. coli* se establecía entre el grupo 4-amino del inhibidor y la Ile94 (Val115 en pollo) (Matthews y col, 1985a, Matthews y col., 1985b). La razón por la que el TMP se unirá de diferente manera a ambas DHFRs se encuentra en que en el caso de vertebrados el sitio activo es entre 1 y 2 Å más amplio, ocasionando que el anillo de la pirimidina del TMP esté insertado alrededor de 1 Å más profundamente. En estas

condiciones el grupo trimetoxifenil del TMP no puede ocupar el bolsillo hidrofóbico inferior y ocupa el superior donde las interacciones de van der Waals son más favorables.

Siwaraporn y col. (1988) probaron el efecto inhibitorio de varios compuestos semejantes al TMP (2,4-diaminopirimidinas-5-benzil-sustituidas) frente al enzima de *Leishmania*, y aunque ninguno de ellos mostró ser lo suficientemente potente, varios con tan sólo ligeras modificaciones con respecto al TMP resultaron inhibidores específicos del enzima del protozoo. No es pues descabellado pensar que alguna de estas 2,4 diaminopirimidinas-5 benzil sustituidas pueda ser un potente y específico tripanocida. La figura I.9 refleja la estructura de estos compuestos entre los que se cuenta RO-46-8717 y cuyo efecto inhibitorio sobre el enzima de *T. cruzi* hemos ensayado en esta tesis doctoral.

1.9.2 Metotrexato.

El metotrexato (MTX), ácido N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil) metil]metilamino]benzoil]-L-glutámico (Fig. I.9), también llamado ametofterina, es el inhibidor de la DHFR usado más a menudo como fármaco antineoplásico y como agente antiinflamatorio e inmunosupresor (Jolivet y col., 1983). Dada la gran homología entre el MTX es una molécula mimética de las formas reducidas de los folatos por lo que en general presenta un metabolismo paralelo a éstos. Así, se internaliza en las células de mamífero mediante los mismos transportadores activos (Bertino y col., 1985a, Bertino y col., 1985b) y el interior de las células es poliglutamado junto los folatos por la acción del enzima folilpoliglutamato sintetasa. Estos poliglutamatos atraviesan difícilmente las membranas celulares, por lo que este proceso actúa como mecanismo que permite retener tanto los poliglutamatos de metotrexato como de los folatos (McGuire y col., 1983). En tripanosomátidos el metabolismo del MTX difiere bastante del descrito para humanos: no se produce la poliglutamación del MTX y además contienen una hidrolasa que lo convierte en N-10-metil-4-desoxi-4-aminopteroato de una potencia unas 190 veces inferior al MTX. Esto podría explicar en parte la baja potencia leishmanicida del MTX a pesar de su alta afinidad por el enzima DHFR-TS (Ellenberger y col., 1989b).

A pesar de la similitudes estructurales entre el H₂F y el MTX la constante de asociación para la unión del MTX a las DHFRs es entre 10⁵ y 10⁷ más fuerte que para los folatos (Blakey, 1984; Stone y Morrison, 1982). Según se ha determinado para las enzimas de *E. coli*. (Bolin y col., 1982, Bystrof y col., 1990) tanto el MTX como el H₂F se unen un mismo bolsillo hidrofóbico de unos 15 Å de profundidad. Sin embargo, la orientación relativa del anillo de la pteridina en el H₂F muestra una rotación de unos 180°, con el efecto neto, comparado con el complejo con MTX de la pérdida de un enlace de hidrógeno entre un grupo carbonílico del esqueleto proteico y una interacción iónica con el grupo carboxilo de un residuo conservado (D27).

El MTX es un inhibidor muy potente tanto de los enzimas de eucariotas como procariotas, siendo inhibitorio a concentraciones similares a la del enzima. No obstante, a pesar de ello la velocidad de asociación muy baja, por ello el MTX se clasifica entre los inhibidores de unión lenta y fuerte (Morrison y Walsh, 1988). La cinética de unión del MTX a la DHFR ha sido estudiada mediante técnicas de flujo parado y análisis de progresión indicando los resultados un sinergismo en la unión a la DHFR entre el mTX y el NADPH en el que se forma inicialmente un complejo que sufre algún tipo de cambio conformacional cuyo resultado es el incremento en la fuerza de la unión del MTX (Appleman y col., 1988b)

Los fenómenos de resistencia a fármacos relacionados con el uso del MTX lo han convertido en una herramienta para el estudio los mecanismos moleculares de resistencia a fármacos en las células de mamífero y en protozoos parásitos (Chamberlin y col., 1976; Bertino, 1981). En este sentido, se han descrito varios fenómenos implicados en la resistencia a MTX entre los que se incluyen fundamentalmente los siguientes: a) Aumento de los niveles de actividad DHFR celular como resultado de la amplificación génica (Schimke y col., 1978); b) Disminución de la afinidad de la DHFR por el MTX lo cual suele ser debido a una sustitución puntual de un aminoácido (Arrebola y col., 1994); c) Alteración en el transporte de MTX y d) Disminución de la poliglutamilación que es el mecanismo que retiene los folatos y los antagonistas de folato en el interior de la célula (Cowan y Jolivet, 1984).

1.9.3. Otros inhibidores de la DHFR.

TMP, Pyr MTX son los antifolatos más ampliamente empleados y por ello también estudiados. No obstante, otros han revelado ser interesantes desde el punto de vista de quimioterapéutico, entre los que destacamos las triazinas y la aminopterina (Figura I.9).

Entre las triazinas cabe señalar el cicloguanilo (4,6-diamino-1-(p-clorofenil)-1,2-dihidro-2,2-dimetil-s-triazina), la forma activa del antimalárico proguanilo (Carrington y col., 1951). El cicloguanilo (Cyc) es un inhibidor selectivo de la DHFR de *Plasmodium berghei* y *P. falciparum*. Como ocurre con la pyr se han descrito fenómenos de resistencia a este fármaco asociados también a cambios puntuales en la DHFR. Destacando que aquellos residuos que proporcionan resistencia a pyr son distintos de los que la proporcionan para el cyc (Foote y col., 1990). Otras triazinas derivados 3-fenil sustituidos del cyc han demostrado ser también inhibidores específicos de la DHFR de *L. major* y han arrojado luz sobre los requerimientos moleculares necesarios para una buena interacción entre enzima y ligando (Booth y col., 1987).

La aminopterina (APT), ácido N-[4-[[2,4-diamino-6-pteridinil) metil] benzoil]-L-glutámico (Erickson y col., 1972), es un compuesto relacionado con el MTX, con el que comparte varias características. Entre otras, su elevada polaridad que determina que dependa de transportadores específicos para la internalización en el interior de las células y su carácter de inhibidor de unión lenta y fuerte.

II. MATERIAL Y METODOS

II.1. MATERIAL.

II.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

II.1.1.1 Parásitos.

Todos los estudios realizados se refieren a la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

II.1.1.2. Bacterias y levaduras.

La siguiente tabla refleja el genotipo de las cepas de *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Células	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ hsdS20(rB ⁻ mB ⁻) leu supE44 ara 14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str ^r) xyl-mtl-1 recA13 mcrB.	Sambrook y col., 1989
<i>E. coli</i> xL1-Blue	F ['] ::Tn10 proA ⁺ proB ⁺ lacI ^q D(lacZ)M15/recA1 end A1 gyrA96 (Nal ^r) thi hdsR17 (rk ⁻ mk ⁺) SupE44 relA1 lac.	Bullock y col., 1987
<i>E. coli</i> JM105	F ['] traD36 lacI ^q Δ(lacZ)M15 proAB6thi rpsL(Str ^r) endA sbcB15 sbcC? hsdR4 (rk ⁻ mk ⁺) supE44 Δ(lac-proAB)	Yanish-Perron y col., 1985
<i>E. coli</i> χ2913	Δthy A572	Russell Thompson, Univ. Glasgow.
<i>E. coli</i> PA414	F, his-4, thr-1, leu-6, thi-1, lacY1, galK2, ara-1, xyl-5, mtl-1, pro-A2, ArgE3, rps-31, tsx-38, supE44I, thyA, Δfol::kan.	Ahrweiler y Frieden 1988
<i>E. coli</i> TG1 RecO	K12, Δ(lac-pro), SupE, thi, hsd D5, recO::Tn5 Kanr/F' tra D36, pro A+B+, lacI ^q , lacZ ΔM15.	P. Olliver Univ. of Cambridge
<i>E. coli</i> P2393	F ⁻ e14 ⁻ (mcrA ⁻) hsdR514 (rk ⁻ mk ⁺) supE44 supF58 lacY1 or Δ(lacIZY)6 galK2 galT22 metB1 trpR55	Ausubel y col., 1989
<i>E. coli</i> Y1090	F ⁻ Δ(lac)U169 lon-100 araD139 strA hflA150::Tn10 (pMC9; tet ^r Amp ^r).	Huynh y col., 1985

S. cerevisiae	α 1, trp1, his3, kil, 0. Línea haploide.	Martin y Sanchez 1980
---------------	---	--------------------------

II.1.2 REACTIVOS.

Los reactivos químicos empleados fueron suministrados por las casas Boehringer Mannheim, Merck, Sigma, Pharmacia, Bio-Rad, Promega y STRATAGENE, y otros fueron sintetizados según se describe en la literatura.

II.1.2.1. Preparación de dihidrofolato.

El dihidrofolato, un sustrato para el enzima DHFR puede ser sintetizado a partir del ácido fólico por reducción con ditionito sódico, según procedimiento descrito por Futterman (1957) y Blakley (1960).

En primer lugar se solubiliza ácido fólico al 1% en 1N KOH. Una vez disuelto se reduce con ascorbato potásico pH 6 y ditionito sódico. Tras agitar esta solución durante 5 minutos a temperatura ambiente, se enfría en hielo y se precipita con 2N HCl, se filtra a través de filtros de vidrio y se redisuelve el precipitado en ascorbato potásico pH 6.0. Después de una segunda precipitación se lava el precipitado 3 veces con exceso de HCl 5 mM y finalmente, se resuspende en una solución 5 mM HCl/ 50 mM β -mercaptoetanol y se reparte en en viales de inyectables en alícuotas de 1 ml. Los viales se sellan y conservan a -80°C . La concentración se determina en NaOH 0.1 N por espectrofotometría usando $\Sigma_{282}=28400$ (Blakley, 1960).

II.1.2.2. Preparación de metilen tetrahidrofolato.

El (\pm)-DL-5,10- metilentetrahidrofolato, uno de los sustratos de la timidilato sintasa, fue preparado a partir del ácido tetrahidrofólico según el procedimiento descrito por Wahba y Friedkin (1961). En ambiente de nitrógeno, 100 mg de ácido tetrahidrofólico fueron resuspendidos en 20 ml de tampón desgaseado frío (30 mM NaHCO₃, 15 mM HCHO, 100 mM β -ME, pH 9.5). La suspensión fría fue agitada rápidamente durante 3-5 min y filtrada a través de un filtro Whatman de fibra de vidrio para eliminar las partículas insolubles. Finalmente, la solución se alícuoteó en viales para inyectables, que fueron sellados en atmósfera de N₂ y conservados a -80°C . La concentración de DL-CH₂-H₄F fue determinada espectrofotométricamente a 294 nm ($\Sigma_{294}= 32000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 7.0)(Blakley, 1969).

II.1.3. TAMPONES Y SOLUCIONES.

Fenol: Se utiliza fenol saturado en agua o en Tris-ClH 0.1 M pH 7.5, con un 1% de hidroxiquinoleina.

Coroformo: Consistía en una mezcla de cloroformo y una alcohol isoamílico en proporción 24:1.

Denhardt's 50 x: 1% BSA, 1% Ficoll 400 y 1% polivinilpirrolidona.

LET: Tris-ClH 0.01 M, pH 7.5; EDTA 0.5 M, β -ME 7.5% (Carle y Olson, 1984).

Mezcla de inhibidores de proteasas: 1-10 fenantrolina 1mM, benzamidina 1 mM, fluoruro de fenilsulfonil metano (PMSF) 50 μ M, leupeptina 20 μ g/ml, "crude soybean trypsin inhibitor" 50 μ g/ml, aprotinina 50 μ g/ml.

MOPS 10x: MOPS 0.4 M, AcONa 0.1 M, EDTA 10 mM; pH 7.0.

NDS: Tris 0.01 M, EDTA 0.5 M, N-lauril sarcosina 1%; pH 9.5 (Carle y Olson, 1984).

PBS (phosphate buffered saline): NaCl 0.14 M, KCl 2.6 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, Na_2HPO_4 10 mM.

RT-PCR 5x: Tris-ClH 0.1 M, Cl_2Mg 12.5 mM, Cl_2K 0.25 M, BSA 0.5 mg/ml; pH 8.3.

SM: ClNa 0.1 M, Tris-ClH 50 mM, pH 7.5; SO_4Mg 10 mM.

Solución DEPC tratada: El DEPC es un reactivo que se une al grupo amino de las proteínas inactivándolas irreversiblemente. Para tratar una solución acuosa con DEPC se mezcla éste hasta una concentración final entre 0.1 % y el 0.2%. Se agita y se deja reposar la solución varias horas. Finalmente el DEPC se inactiva autoclavando la solución. En el caso de soluciones basadas en Tris el tratamiento no es efectivo porque los grupos aminos de éste reaccionan con el DEPC.

Solución de hibridación: Formamida 50%, 5x Denhart's, 5x SSC, DNA de esperma de salmón 1%, EDTA 5mM.

SSC 20x: NaCl 3 M, citrato sódico 0.3 M; pH 7.0.

TAE 10x: Tris acetato 0.4 m, EDTA 10 mM; pH 8.0.

TDE 10x: Tes 0.5 M, DTT 50 mM, EDTA 10 mM; pH 7.4 (Meek y col., 1985).

Tampón de carga 6x: 0.25% azul de bromofenol, 0.25 % xylene cianol, 30% glicerol.

TBE 10x: Tris 0.89 M, ácido bórico 0.89 M, EDTA 20 mM; pH 8.0.

TE: Tris-HCl 10 mM, pH 7.4; EDTA 1 mM.

TELT: ClLi 2.5 mM, Tris-CLH 50mM,pH 8.0; EDTA 62.5 mM, Triton X-100 4% p/v (He y col., 1990).

TES DHFR 2x: TES 0.1 M, EDTA 2 mM, β -ME 0.15 M; pH 7.0 (Mek y col, 1985).

TES TS 2x: TES 0.1 M, EDTA 2 mM, β -ME 0.15 M, Cl_2Mg 50 mM, HCHO 13 mM; pH 7.4 (Meek y col, 1985).

TSS 2x: 50% PEG 3350 40%, 50 % LB 0.1 M en Cl_2Mg , DMSO 10% (Chung, 1989).

Composición de todos los tampones en Sambrook y col (1989), excepto cuando se indica otra referencia.

II.1.4. MEDIOS DE CULTIVO.

Los reactivos empleados para la elaboración de los medios fueron suministrados por Difco, excepto los aminácidos, antibióticos, timidina, IPTG y X-Gal que fueron proporcionados por Sigma. Todos los medios fueron esterilizados autoclavando, excepto cuando se indica.

II.1.4.1. Para parásitos.

Medio LIT: NaCl 4 g; KCl 0.4 g; Na₂HPO₄ 7H₂O 15 gr; glucosa 2 g; infusión de hígado 3 g; Triptosa 5 g; hemoglobina 2%; agua hasta un litro.

El medio fue esterilizado mediante filtración en membranas de 0.2 µm de diámetro (Sistema de filtración de VacuCap™ de Gelman Sciences).

II.1.4.2. Para bacterias.

LB (Luria Bertani) líquido: Bactotripton 10 %, extracto de levadura 5 g y ClNa 5 % en agua destilada.

LB-agar: Medio LB líquido y agar 15% p/v.

NZ: NZ amina 10 %, NaCl 5 %, extracto levadura 5% y 2% MgSO₄.7H₂O en agua destilada.

NZ-agar: Medio NZ líquido y agar 15% p/v.

NZ top agar: Medio NZ líquido y agar 7% p/v.

Todos en Sambrook y col. (1989).

Medio mínimo para la complementación de TS: Para la preparación de 1 litro de medio se mezclaron 415 ml de bacto-agar al 3.6%, autoclavado y enfriado a sobrefusión, con 250 ml de una solución de sales 4 veces concentrada y autoclavada, de modo que la concentración final de las mismas fuese 5.4 g/l K₂HPO₄; 2 g/l KH₂PO₄; 0.5 g/l Na-Citrato.2H₂O; 0.1 g/l MgSO₄; 1g/l (NH₄)₂SO₄. A esta mezcla se le añadieron 250 ml de una solución de casaminoácidos al 12% esterilizada por filtración, 5 ml de glucosa al 40% autoclavada y 5 ml de una solución de aminoácidos, esterilizada por filtración, conteniendo 5 mg/ml de cada uno de los siguientes aminoácidos: prolina, metionina, arginina, leucina, histidina y treonina (Belfort y col., 1983).

I.1.4.3. Para levaduras.

Medio YPD: Extracto de levadura 1%; peptona 2%; dextrosa 2%, en agua destilada (Sambrook y col, 1989).

II.1.5. VECTORES.

A continuación se detallan los vectores utilizados durante el desarrollo de esta tesis junto con su uso y tamaño.

Vector	Tamaño	Descripción	Referencia
pUC18 y pUC19	2686 pb	Vector de clonaje	Viera y Messing, 1983
pBSKS	2988 pb	Vector de clonaje	Stratagene
M13mp18 y mp19	7250 pb	Clonaje y secuenciación en hebra simple	Messing, 1983
pKK223.3	4585 pb	Vector de expresión	Pharmacia

II.1.6. PATRONES DE PESOS MOLECULARES PARA ELECTROFORESIS.

II.1.6.1. Electroforesis de proteínas.

Como marcadores para proteínas de bajo peso molecular se usó el "Electrophoresis Calibration Kit" de Pharmacia consistente en una mezcla de las siguientes proteínas: Fosforilasa b, 94.000 D; Seroalbúmina bovina, 67.000 D; Ovoalbúmina, 43.000 D; Anhidrasa carbónica, 30.000 D; Inhibidor de tripsina, 20.000 D; α -Lactalbúmina, 14.000 D.

II.1.6.2. Electroforesis de DNA.

Marcadores de alto peso molecular. Se utilizaron los fragmentos resultantes de la digestión del DNA del fago λ con el enzima de restricción HindIII, cuyos tamaños son: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 165 pb respectivamente.

Marcadores de bajo peso molecular. Fragmentos de DNA del fago ϕ X174 digerido con el enzima HaeIII: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pb, respectivamente.

II.1.7. OLIGOS.

Los siguiente tabla muestra los oligos diseñados durante el transcurso de la tesis así como su destino.

NOMBRE	SECUENCIA	DESTINO
ON1	5'GGAATTCRTNTAYGGNTTYCARTGG3'*	PCR
ON2	5'GGGATCCCGCNATRTTRAANGGNAC3'*	PCR
ON3 (11050)	5'TTGAATTCATGTCGCTGTTTAA3'*	PCR
ON4 (11022)	5'GTAAGCTTCTAAACCGCCAT3'*	PCR
ON5 (16215)	5'GTCTGCAGCTAGTTGCGTGG3'*	PCR
ON6 (17333)	5'TTGAATTCATGAGAGAGGAG3'*	PCR
SL (331)	5'CGCTATTATTGATACAGTTTCTG3'***	RT-PCR
RevSI (552)	5'CCGTGCTCGTCGACCGCTACA3'***	RT-PCR
RevRI (611)	5'ATGGAATTCGCACAAGTGAGA3'***	RT-PCR
11023	5'GGCAATGTTGAACGGGAC3'*	Secuencia
11024	5'GAAAAACTTCATGTCCTC3'*	Secuencia
11025	5'AAGCTCATCCCACGCAAC3'*	Secuencia
11026	5'GTAGACCGTCTCAATGC3'*	Secuencia
11434	5'GCTTAGATACTGCTCCT3'*	Secuencia
12354	5'TCGCGCCGTTTTCTTGAC3'*	Secuencia
12355	5'GTCAAGAAAACGGCGCGA3'*	Secuencia
13462	5'TTATTTGTA ACTCTTGT3'*	Secuencia
13463	5'GACAAGAGTTACAAATAA3'*	Secuencia
14457	5'CCTCCCATCTCCATGAAG3'*	Secuencia
656	5'GCTCTCATGACTGAATGG3'*	Secuencia

R indica una base purínica e Y representa una base pirimidínica.

* Sintetizados en el Biomolecular Resource Center, Universidad de California, San Francisco.

** Sintetizados en el Instituto de Parasitología y Biomedicina. C.S.I.C. Granada.

II.1.8. INSTRUMENTACION Y SOFTWARE.

II.1.8.1. Instrumentación.

A continuación se detalla el instrumental y el software que se empleó en el siguiente trabajo.

II.1.8.1.1. Para el cultivo de células.

Cabinas estériles de flujo laminar vertical AV-10 de Telstar S. A., Cytair125 y Supcris Model. A de Equipments Scientifiques et Industriels. S. A. Flufrance.

Incubador con agitación orbital para cultivo de parásitos, Lab-Line® Orbit environ-shaker. Lab-Line Instruments Inc.

Incubador Edelstahl RostFrei. Memmert.

Microscopios de objetivo invertido Leitz (Labovert) y Olympus CK2.

Incubador con agitación orbital para el cultivo de bacterias: Controlled Environment Incubator Shaker. New Brunswick Scientific Co. Inc.

II.1.8.1.2. Para eletroforesis.

Minicubetas para electroforesis horizontal convencional de Sigma, para DNA.

Cubeta de electroforesis DNA Sub-Cell[®] de Bio-Rad, para DNA.

Sistema para electroforeis CHEF de LKB -Bromma con controlador de pulsos (2015-Pulsaphor Plus Control Unit) y sistema de refrigeración (2219 Multitemp II Thermostatic Circulator).

Sistemas de electroforesis vertical Protean II cell de Bio-Rad, para proteínas.

Sistema para mini-electroforesis Mini-PROTEAN II electrophoresis cell de Bio-Rad y Sigma.

Cubeta para secuenciación de BRL Modelo S2.

Fuentes de alimentación de 250, 500 y 4000 volt: PS250-2, PS500-2 y PS4000-2, respectivamente, de Sigma.

II.1.8.1.3. Centrífugas.

Centrífugas refrigeradas RC5C de Sorvall y Beckman J2-MC con rotores ss-34, GSA, HB-4 y JA-20, JA-14 y JS13.1.

Centrífugas de mesa Beckman GPR y Kubota KS-8000.

II.1.8.4. Baños.

Baños termostatzados con y sin agitación: Unitronic 320 OR de Afora S. A. y Precistern de P Selecta.

II.1.8.1.5. Otros

Secador de geles: Slab Gel Dryer SGD 4050 de Savant.

Evaporador: AS160 Automatic Speed Vac© de Savant.

Video densitómetro Modelo 620 de Bio-Rad laboratories en interface con un ordenador PC compatible AT 286 de Inves.

Contador de centelleo 1209 Rackbeta Liquid Scintillation Counter de LKB-Wallac.

Termociclador para PCR de Perkin-Elmer y Stratege, modelos respectivamente.

Sonicador Vibra Cell de Sonics and Materials Inc.

Agitador orbital Gyrotory® Shaker-Model G2, New Brunswick Scientific Co. Inc.

Para la determinación de todos los parámetros cinéticos del estado estacionario se usaron un espectrofotómetro de haz simple Beckman DU-40 al que se acopló un módulo de software Soft-Pac® Module (Kinetics) y un espectrofotómetro de diodos Hewlett Packard 8452A en interface con un ordenador personal, Compaq PC modelo Deskpro 286N.

FPLC LKB 500 de farmacia.

HP scan.

Sistema de electroporación ECM 600® de BTX.

II.1.8.2. software

El análisis de los datos obtenidos se realizó en ordenadores Macintosh, Classic, Classic II LCII, LC III y Quadra 650 dotados del sistema operativo 7.1. El software empleado fue el siguiente:

Kaleidagraph© ,Version 3.0., (1991). Abelbeck Software.

EnzymeKinetics©, Version 1.01 (1990) J. Stanislawski. Trinity Software.

Gene Construction Kit© Versión 1.03.1. (1990) B. Gross, A. Pytte y P. Rice. Textco, Inc.

DNA strider©, Version 1.1 C. Marck. Service de Biochimie -Departement de Biologie. Institut de Recherche Fondamentale. Commissariat a l'Energie Atomique. France.

Microsoft Excel®, Version 4.0 (1992) Microsoft Corporation.

Gel Fragment Sizer®, Version 1.4 (1989) de D. G. Gilbert. DogStar Software Bloomington, Indiana and Biology Dept. Indiana University.

Microsoft Word®, Version 5.1 (1991) Microsoft Corporation.

MacDraw® pro, Versión 1.5.1 (1992) MKL Collins. Institute of Cancer Research.

PowerPoint®, Versión 3.0b (US) (1993) Microsoft Corporation

Se usó además el siguiente software para PC IBM compatible:

1-D Analyst Software, version 2.01 para transferencia de datos desde el Video Densitómetro al ordenador PC compatible.

HP 89542A UV-Visible General Scanning Software.

HP 89532K UV-Visible General Kinetic Software.

#

II.2. METODOS.

Hemos excluido de esta tesis una descripción detallada de los protocolos de uso rutinario en el campo de la biología molecular. Una descripción exhaustiva de estos procedimientos se encuentra en manuales como el de Sambrook y col. (1989), y los editados por Ausubel y col., (1987-1994) en "Current Protocols in Molecular Biology".

II.2.1. CULTIVO DE CELULAS.

II.2.1.1 Cultivo de parásitos.

El cultivo de las formas epimastigotas de *T. cruzi* se realizó en medio LIT suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado, a una temperatura de 28 °C y con una agitación suave.

Los cultivos se realizaron en frascos estériles de cultivo celular de 25 cm² (Costar), en un volumen de 5-10 ml. Las células fueron mantenidas en estado de crecimiento logarítmico mediante la continua resiembra de los parásitos en medio fresco a una concentración de 4.10⁶ parásitos/ml.

La curva de crecimiento del parásito se determinó contando cada día el n° de células hasta que el cultivo entraba en fase estacionaria. Las células fueron contadas en una cámara

hemocitométrica de Neubauer usando alícuotas del medio de cultivo diluidos al 50% en una solución de formaldehído y PBS al 2%.

II.2.1.2. Cultivo de bacterias.

Los cultivos rutinarios de bacterias en medio líquido se hicieron con agitación a 37°C en medio LB sin ampicilina o con ella (100 µg/ml) en el caso de tratarse de células transformadas con plásmidos con marcadores de resistencia al antibiótico. Las bacterias también se cultivaron en medio semisólido de LB-agar con o sin antibiótico según fuera conveniente.

Las bacterias fueron conservadas a -80°C en medio LB con un 15% de glicerol.

II.2.1.3. Cultivo de levaduras.

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en la preparación de marcadores de DNA cromosómico fueron cultivadas en medio YPD a 28 °C con agitación.

II.2.2. MANIPULACION DE BACTERIAS.

II 2.2.1. preparación de células competentes.

Existen diversos métodos que modifican la membrana de las bacterias facilitando la posterior introducción de construcciones de DNA, nosotros utilizamos varios de ellos:

II.2.2.1.1. Método del Cl_2Ca .

Según este método descrito por Hanahan (1983) las células bacterianas son recogidas en fase logarítmica de crecimiento ($D.O.590 = 0.375-0.4$), mantenidas en hielo, y tratadas sucesivamente con Cl_2Mg 0.1 M y con $CaCl_2$ 0.1 M a una temperatura que nunca debe exceder los 4 °C. Finalmente las células son conservadas a -80°C en glicerol al 15%, sin pérdida apreciable de competencia.

II.2.2.1.2. Método del PEG.

Las células crecidas hasta a una densidad óptica entre 0.3 y 0.4 son colectadas y enfriadas en hielo. A continuación son diluidas en 1 volumen de 2x TSS, también en hielo. Las células pueden ser entonces congeladas en hielo seco y reservadas a -80 °C, o directamente transformadas por el procedimiento que se describe seguidamente (Chung, 1989).

II.2.2.2. Transformación de bacterias competentes.

Seguimos el procedimiento descrito por Hanahan en 1983 para la transformación de *E. coli* con plásmidos circulares con un origen de replicación y un marcador de resistencia a antibiótico. Se toman 100 µl de las células competentes y se incuban en hielo durante 30 min con 10-100 ng del DNA plasmídico. Seguidamente se somete a las bacterias a un breve choque térmico (45 s a 42 °C,) con el fin de facilitar la transformación. A continuación la mezcla se incuba 2 min. en hielo y se permite la recuperación de las células incubándolas en un medio no selectivo (300-500 µl de medio LB) a 37 °C con agitación. Finalmente se siembra en placas con 100 µg/ml de ampicilina.

II.2.2.3. Preparación de extractos crudos de bacterias para la determinación de actividad.

Durante esta tesis se desarrollaron varios sistemas de expresión para proteínas con actividad enzimática con los que se transformaron diferentes tipos de células hospedadoras. La bondad de la expresión en las colonias transformantes fue examinada mediante la medida de la actividad de las proteínas expresadas.

Estos ensayos cinéticos preliminares se hicieron sobre extractos crudos solubles de bacterias. Estos se prepararon por sonicación en hielo de las células resuspendidas en TE durante 120 s con ciclos de sonicado del 50%. Seguidamente las células fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 15 min a 4°C y recogidos los sobrenadantes.

Los extractos crudos se obtuvieron de cultivos frescos de células en fase estacionaria crecidas en medio LB con amp 100 mg/ml. Las células fueron colectadas centrifugando 15 min a 3000 g. Cuando los sistemas de expresión fueron usados para transformar *E. coli* JM105 y TG1 recO, ambas lacI^q, la expresión fue analizada después de inducir con IPTG. Para ello las células fueron crecidas hasta una D.O. entre 0.5-0.7 y entonces se adicionó IPTG hasta una concentración de 1 mM incubándose durante 3 horas más, tras lo cual fueron precipitadas y se procedió normalmente.

II.2.2.4. Infección de bacterias con el fago lisogénico M13.

M13 es un fago filamentoso de DNA circular de hebra simple que no mata a las células infectadas. Las bacterias son infectadas de forma crónica secretando al medio partículas del fago. La replicación de M13 en el interior de las células infectadas conlleva la adopción por parte de su material genético de una forma replicativa (FR) en doble hebra, que es funcionalmente análoga al DNA plasmídico. Por ello, la biología de M13 permite combinar los

procedimientos derivados de la transformación con plásmidos con los derivados del uso de fagos.

La transformación de células competentes con DNA de M13 de doble hebra se hizo de igual modo que con DNA plasmídico: una incubación en hielo seguida de un choque térmico y la recuperación a 37°C. Para la selección en medio sólido de las células transformadas éstas se mezclaron con otras sin transformar en fase logarítmica (D.O.= 1), NZ top agar fundido, X-gal (0.03% final) e IPTG (0.05 mM final) y se extendieron sobre placas de medio NZ sin antibiótico. Los transformantes positivos se distinguen de los negativos por el color de las "placas bacterianas" que aparecen tras la incubación a 37°C, azules las que contienen plásmido sin inserto y blancas aquellas que incorporan el fragmento clonado en el polilinker del vector.

Por otro lado los sobrenadantes de células portadoras de M13 son fuentes relativamente puras de partículas de M13 maduras, con lo cual la adición de bacterias en fase logarítmica de crecimiento proporciona una fuente fresca de células susceptibles de infectarse con la concomitante amplificación del número de partículas de fago individuales.

II.2.3 SELECCION DE FAGOS DE INTERES.

Durante la realización de este trabajo hemos trabajado con dos genotemas de las formas amastigotas de *T. cruzi*; una de DNA genómico y otra de cDNA (Gonzalez y col, 1990) ambas cedidas por el Dr. Antonio Gonzalez Aguilar. La primera de ellas estaba construida sobre los brazos del fago λ EMBL3 y la segunda sobre los brazos del fago λ gt11.

El procedimiento descrito abajo se siguió con ambas genotecas y permite identificar clones de fagos que portan fragmentos de DNA de *T. cruzi* que son de nuestro interés. Consta de dos partes bien diferenciadas: por una parte la obtención de placas de lisis con los fagos (plaqueo), y por otra la selección de los fagos de interés mediante su transferencia a nitrocelulosa e hibridación con una sonda determinada. Una descripción detallada del protocolo se encuentra en los Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., 1989-1994)

II.2.3.1. Plaqueo de bacteriófagos: obtención de placas de lisis.

Una dilución de los fagos en SM (II.2.2.4-5) se incubó a RT (temperatura ambiente) durante 20 min con el mismo volumen de un cultivo de la cepa apropiada de *E. coli* (P2392 para λ EMBL3, e Y1090 para λ gt11) crecida hasta la fase logarítmica de crecimiento (D.O.= 1.0), precipitada y resuspendida en la mitad del volumen de SO₄Mg 10 mM. Seguidamente los fagos se mezclaron con NZ-top agar y se vertieron en placas de NZ-agar equilibradas a 37 °C. Las colonias de lisis se observaron tras incubar las placas durante la noche. Los fagos positivos

eran recogidos de las calvas de lisis con pipetas pasteur estériles y vertidos en 1 ml de SM, de donde eran diluidos y sometidos a un nuevo ciclo de selección con el fin de aislar los clones positivos de otros contaminantes que no eran positivos. Siguiendo este procedimiento se plaquearon 10^5 fagos de cada una de las genotecas. La discriminación de los clones positivos de las placas de lisis se hizo transfiriendo a filtros de nitrocelulosa e hibridando con sondas específicas.

II.2.3.2. Tráferencia de los fagos a filtros de nitrocelulosa e hibridación.

Sobre las placas de lisis se colocó un filtro de nitrocelulosa y se orientó el filtro mediante punciones con una aguja gruesa y marcando con un rotulador el lugar de estas punciones en la base de la placa. El filtro se mantuvo sobre los fagos 1 min y sirviendonos de las marcas se obtuvo un réplica idéntica que fue también orientada pinchando con la aguja en los lugares señalados previamente bajo la placa. Los filtros fueron entonces tratados secuencialmente en NaOH 0.5 N, ClNa 1.5 M, 5 min; Tris-ClH 1M pH 7.5, ClNa 1.5 M, 5 min; y SSC20x, 20 min. Las incubaciones se hicieron en bandejas con papeles watman 3 MM empapados con las soluciones indicadas y cuidando que los fagos quedaran en la parte superior de los filtros.

Los filtros así obtenidos se secaron a RT y posteriormente el DNA de los fagos fue fijado incubando en un horno a 80 °C durante 2 horas. Los filtros fueron hibridados (II.2.14.) utilizando sondas radiactivas específicas marcadas por "random primer" (II.2.10) y expuestos a películas autoradiográficas (II.2.14).

Una vez revelados los filtros, se consideraron como positivos los fagos que hibridaban en las dos réplicas obtenidas de cada placa. Las marcas practicadas en los filtros y placas permitían identificar los clones positivos.

II.2.5. AISLAMIENTO DE DNA.

II.2.5.1. Aislamiento de DNA de epimastigotes de *T. cruzi*.

Para la extracción de DNA de las formas epimastigotas de *T. cruzi* se siguió el método descrito por Garvey y col., (1985). Los parásitos crecidos hasta la fase estacionaria ($8 \cdot 10^7$ parásitos/ml) se precipitan (2500 rpm, 10 min.) y se lavan dos veces con PBS. A continuación las células se lisan en una solución Tris-ClH 0.2 M, pH 8.0; EDTA, 0.1 M; SDS, 0.5% y proteinasa K, 100 µg/ml, a 37 °C durante 4 horas. Seguidamente se hace una extracción fenólica y un tratamiento con RNAsa A de la fase acuosa. Por último se realiza una nueva

extracción con Fenol-sevag, y una precipitación etanólica de la fase acuosa (Sambrook y col., 1989). El DNA se resuspende en agua desionizada.

II.2.4.2. Aislamiento de DNA plasmídico.

El DNA plasmídico puede ser separado del DNA cromosómico bacteriano gracias a que posee distintas propiedades físicas: es más compacto y se dispone en una forma circular cerrada superhelicoidal. El DNA cromosómico suele precipitar junto con las proteínas en la centrifugación subsiguiente a una lisis celular suave, quedando el DNA plasmídico en solución.

II.2.4.2.1. En pequeña escala ("Minipreps").

En este apartado se describen las "minipreps" empleadas durante el desarrollo de la tesis, aunque existen muchas otras más (Sambrook y col., 1989).

II.2.4.2.1.1. Miniprep de Litio

Las células tras ser centrifugadas son resuspendidas y lisadas en 100 μ l de solución TELT. Las proteínas junto con el DNA cromosómico son extraídos con 1 volumen de fenol-sevag y el DNA del sobrenadante es precipitado con 200 μ l de etanol absoluto. Finalmente el DNA es resuspendido en agua desionizada con RNAsa A, 20 μ g/ml (He y col., 1990).

II.2.4.2.1.2. Magic Miniprep[®]

El DNA plasmídico procedente de 1.5 ml de células son lisadas en una solución de composición SDS 1%, NaOH 0.2 N y el DNA cromosómico precipitado junto con las proteínas con AcOK. El DNA plasmídico es entonces retenido en una resina, lavado y finalmente eluido con agua (Promega, Biological Research Products).

II.2.4.2.2. Obtención de DNA plasmídico a gran escala ("Maxipreps").

Los siguientes procedimientos fueron empleados:

II.2.4.2.2.1. Aislamiento de DNA por Gradiente en CICs.

El DNA plasmídico puede ser separado en un gradiente de CICs. La densidad del DNA es de 1.7 (dependiendo de su contenido en G+C). Sin embargo, La unión a

agentes intercalantes tales como el bromuro de etidio, reduce su densidad. El DNA circular cerrado une menos BrEt que el DNA lineal debido a restricciones topológicas. Por tanto, la densidad del DNA plasmídico circular cerrado será mayor que la de otras formas de DNA de doble hebra en concentraciones saturantes de BrEt. Estas diferencias de densidad son utilizadas para purificar DNA plasmídico en un gradiente de densidad de ClCs (Radloff y col., 1967). Una descripción detallada en Current Protocols in Molecular Biology.

II.2.4.2.2. Magic Maxiprep[®].

Procedimiento semejante a la Magic-miniprep[®] pero se parte entre 100 y 500 ml de cultivo. Se siguió el protocolo indicado por la casa comercial (Promega, Biological Research Products).

II.2.4.3. Aislamiento de DNA de M13.

El aislamiento del DNA de M13 en la forma replicativa se hizo siguiendo los métodos de aislamiento de DNA plasmídico.

El aislamiento de DNA de hebra simple de los bacteriófagos M13mp18 y mp19 se siguió el procedimiento descrito por Messing (1983). Los fagos procedentes de un sobrenadante de un cultivo de células portadoras de M13 son concentrados mediante precipitación con polietilenglicol y extraídos con fenol para separar las proteínas del DNA. Este procedimiento produce genoma de fago circular cerrado de hebra sencilla, que puede ser empleado como DNA molde en la secuenciación por el método de Sanger. Las formas replicativas de doble hebra circular cerrada de M13 fueron aisladas de cultivos de células portadoras de M13, de forma totalmente análoga a la extracción de DNA plasmídico.

II.2.4.4. Aislamiento de DNA de bacteriófagos.

El aislamiento de DNA de los bacteriófagos λ EMBL3 y λ gt11 implicó en primer lugar la obtención de un lisado líquido de bacterias a partir de los cuales se purificó el DNA del fago.

II.2.4.4.1. Preparación de un lisado líquido de bacterias con el fago λ EMBL3.

Se incubó una mezcla conteniendo 0.1 ml de células P2392 en fase estacionaria, 0.1 ml de fagos diluidos en medio SM, y 0.1 ml de 10 mM Cl₂Mg/Cl₂Ca (1:1), durante 15 min a 37 °C. Esta mezcla se transfirió a continuación a 50 ml de medio NZ (II.1.4.2) y se incubó con agitación a 37 °C hasta que el medio se clarificó como consecuencia de la lisis de las células.

Finalmente se agregaron unas gotas de cloroformo para completar la lisis de células y el sobrenadante obtenido tras centrifugar a 3000g durante 10 min fue almacenado a 4 °C con unas gotas de cloroformo constituyendo una fuente relativamente pura de fagos.

II.2.4.4.2. Preparación de un lisado líquido de bacterias con λ gt11.

Un cultivo de *E. coli* Y1090 crecido hasta una D.O de 0.1-0.2 en LB suplementado con 10 mM SO₄Mg se inoculó con una dilución del fago en SM o bien con colonias de lisis aisladas de una placa. El cultivo se incubó a 42 °C con agitación hasta que la lisis fue evidente. Un control de células crecidas sin fagos es útil para decidir cuando la lisis ha ocurrido. A continuación incubamos los fagos 2 min a 37 °C con unas gotas de cloroformo para lisar todas las células. El sobrenadante obtenido tras centrifugar 10 min a 3000g contiene los fagos que se almacenan a 4 °C con unas gotas de cloroformo.

II.2.4.4.3 Aislamiento de DNA de lisados de bacteriófagos.

Se partió de volúmenes de 50 ml de lisados líquidos de fagos. Estos fueron incubados durante una hora a 37 °C con DNAsa y RNAsa a unas concentraciones de 1 µg/ml y 5 µg/ml, respectivamente. A continuación los fagos fueron centrifugados a 27000 rpm durante una hora y media y tras ser resuspendidos en 200 µl de Tris-ClH 50 mM, pH 8.0, fueron desproteinizados mediante 2 extracciones fenólicas de 20 min cada una. Los restos de fenol fueron eliminados mediante una extracción clorofórmica con mezcla-sevag y el DNA fue precipitado con 1/10 volúmenes de AcONa 3 M, pH 5.2, y dos volúmenes de etanol absoluto. El DNA fue lavado con etanol al 70%, secado, y resuspendido en DDW.

II.2.5. AISLAMIENTO DE RNA DE *T.cruzi*.

II.2.5.1. Aislamiento de RNA total.

El RNA es un molécula que se degrada muy fácilmente a causa de ribonucleasas contaminantes, por ello las precauciones deben extremarse: todas las soluciones deben de ser tratadas con DEPC, estar autoclavadas y hay que utilizar en todo momento guantes.

El RNA citoplasmático se extrajo a partir de epimastigotes de *T.cruzi* en fase logarítmica de crecimiento ($4 \cdot 10^7$ parásitos/ml), siguiendo el procedimiento descrito por (). Los parásitos se recogieron centrifugando 15 minutos a 3500 rpm e inmediatamente fueron resuspendidos en una solución desnaturizante que contiene tiocionato de guanidina 4 M; citrato sódico 25 mM, pH 7.0; β -ME 0.1 M; y lauril sarcosina 0.5% (1 ml solución desnaturizante/ 10^9 parásitos). A continuación se agregaron 0.4 volúmenes de AcONa 2M,

pH 4.0, y se realizó una extracción fenólica con 1 volumen de fenol saturado con agua y 0.8 volúmenes de mezcla-sevag, previa incubación de la mezcla en hielo durante 15 min. El RNA se precipitó con 1 volumen de isopropanol, se resuspendió en 1.2 ml de solución desnaturante y de nuevo se precipitó con 1.2 ml de isopropanol. El RNA precipitado se lavó con etanol al 70% incubando durante 15 min a temperatura ambiente. Por último el RNA se disolvió en DDW al 1% en DEPC en un baño a 65 °C. El RNA se conservó bajo etanol a -80 °C o alicuotado en DDW con DEPC.

II.2.5.2. Purificación de la fracción poliadenilada del RNA citoplasmático.

La poliadenilación post-transcripcional de los RNA mensajeros permite su separación del resto de los RNA citoplasmáticos utilizando columnas de oligo(dT)-celulosa (Boehringer). El RNA total se resuspendió a 65 °C en un tampón de unión que consiste en NaCl 0.5 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA 1 mM y SDS 0.2%. La columna se lavó entonces con 10 volúmenes de solución de unión, seguido de 5 volúmenes de una solución de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; ClNa 0.1 M, EDTA 0.1 mM y SDS 0.1 %). Finalmente la fracción poliadenilada se eluyó de la columna con tampón de elución consistente en Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM y SDS 0.05%. Esta fracción se precipitó con 2.2 volúmenes de etanol y 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5.2. La fracción poliadenilada así obtenida se conservó a -80 °C, bien bajo etanol o alicuotada en DDW tratada con DEPC.

II.2.6. CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS.

La concentración tanto del DNA como del RNA se puede valorar espectrofotométricamente a 260 y 280 nm.

Para el DNA una unidad de D.0.260 equivale a 50 µg/ml.

Para el RNA una unidad de D.0.260 equivale a 40 µg/ml.

El ratio D.0.260/D.0.280 debe estar entre 1.8 y 2 en las preparaciones puras de ácidos nucleicos (Sambrook y col, 1989).

II.2.7. MANIPULACION ENZIMATICA DEL DNA.

Los enzimas que aparecen en este apartado fueron empleados especialmente para el clonado de fragmentos de DNA, lo que no excluye que fueran empleadas para otros fines.

II.2.7.1 Digestiones con endonucleasas de restricción.

Las digestiones de DNA se hicieron según las condiciones indicadas por los casos comerciales. En general se realizaron en un volumen final de 20-50 µl, empleando de 1 a 10 U

de enzima por cada μg de DNA. Los enzimas fueron suministrados por Boehringer, Promega y Pharmacia.

II.2.7.2. Tratamiento del DNA con la Klenow.

La klenow fue utilizada para producir extremos romos para lo cual nos servimos de su actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$, además de la polimerasa $5' \rightarrow 3'$. El enzima fue suministrada por Boehringer y la reacción se llevó a cabo en un volumen de 20-50 μl bajo las condiciones indicadas por el fabricante.

II.2.7.3. Tratamiento del DNA con fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina hidroliza el grupo fosfato en 5' del DNA y en virtud de esta actividad fue utilizada para defosforilar vectores cortados con una dos enzimas de restricción. Se minimiza así el fondo correspondiente al vector religado en los experimentos de transformación con mezclas de ligamiento. Se empleó la CIP suministrada por Boehringer, siguiendo las indicaciones del fabricante.

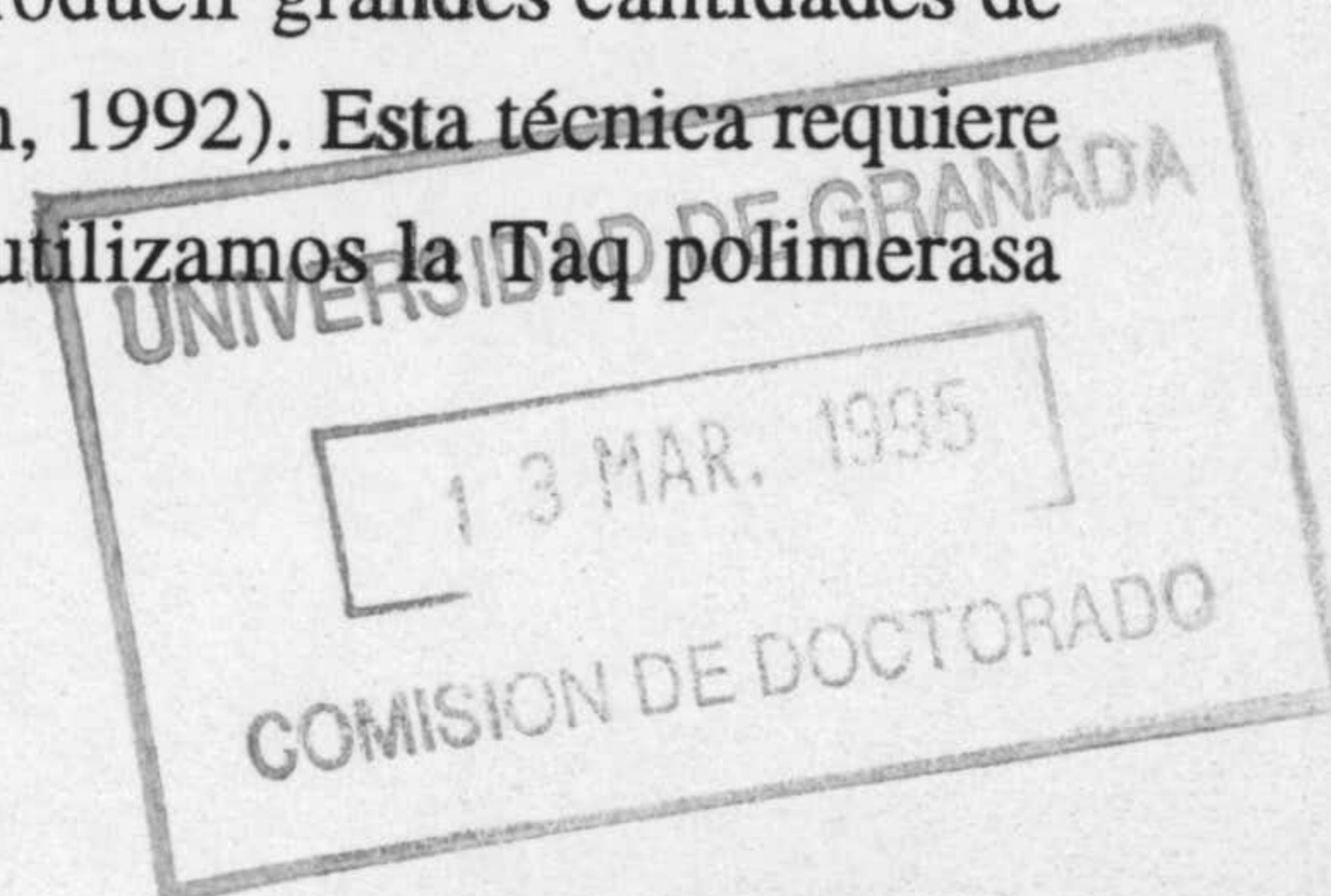
II.2.7.4. Reacción de ligamiento

La reacción de ligamiento permite introducir fragmentos de DNA en vectores con extremos compatibles. El enzima empleado fue la T4 ligasa, la cual cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos yuxtapuestos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo de un DNA de doble hebra. El enzima puede unir tanto extremos romos como extremos cohesivos. El enzima fue suministrado por Boehringer y la reacción se realizó en un volumen de 20 μl en las condiciones descritas por la firma, aunque el tampón de reacción suministrado por el fabricante se suplemento con 5 mM de ATP. La cantidad de inserto y vector debe ser optimizada en cada caso pero por lo general se emplearon 1 pmol de vector y 10 pmol de inserto.

Las reacciones de ligamiento se hicieron a temperatura ambiente durante 2 horas o durante toda la noche a 16 $^{\circ}\text{C}$. Las mezclas de ligamiento fueron utilizadas para transformar células *E. coli*.

II.2.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite producir grandes cantidades de un DNA específico a partir de un DNA plantilla (Arheim y Erlich, 1992). Esta técnica requiere el uso de una DNA polimerasa termoestable. En nuestro caso utilizamos la Taq polimerasa aislada de *Thermus aquaticus* y suministrada por Boehringer.



Las PCRs se llevaron a cabo bajo aceite mineral en un volumen de 50 μ l. Las mezclas de reacción contenían: dNTPs, 400 μ M cada uno; los oligonucleótidos sentido y antisentido, 75 pmol de cada uno; entre 5 y 500 ng de DNA (plasmídico y genómico, respectivamente) y 2.5 unidades de Taq polimerasa. La mezcla de reacción contenía también una concentración variable de ClMg entre 2 mM y 4mM, que fue optimizada en cada caso.

Los parámetros de la PCR que fueron optimizadas en especial en lo referente a la temperatura de acoplamiento de los cebadores. En general consistieron en 35 ciclos de tres etapas: desnaturalización: 94 °C, 0.5-1min; acoplamiento de cebadores: 45-65 °C, 1-1.5 min; y extensión: 72°C, 1-2 min.

II.2.9. REACCION DE RT-PCR.

Mediante la reacción de RT-PCR podemos amplificar fragmentos correspondientes a un transcrito de RNA. El procedimiento implica en primer lugar la síntesis del cDNA de interés empleando para ello un oligo específico antisentido que sirve de cebador a la retrotranscriptasa. El cDNA es a continuación amplificado mediante PCR sumando al oligo anterior otro en orientación sentido y en 5' sobre el primero.

La retrotranscripción se hizo en un volumen de 30 μ l en tampón RT-PCR 1x conteniendo 330 μ M de cada uno de lo dNTP; 1 μ g de RNA poli A⁺; 90 pmol del primer antisentido (Rev-SI); 20 unidades de RNAsin (proteína inhibidora de las ribonucleasas); y 20 unidades de retrotranscriptasa. El RNA fue calentado a 100 °C durante 2' y enfriado en hielo previamente a su uso. La incubación se hizo a 42 °C durante 1/2 hora y la reacción fue parada incubando durante 10 min a 100 °C. La retrotranscriptasa usada fue AMV y junto con el RNAsin fueron suministrados por Boehringer.

A continuación 10 μ l de la reacción de retranscripción fueron sometidos directamente a amplificación mediante PCR, según se indica:

RT-PCR	10 μ l
SL (40 pmol/ μ l)	2 μ l
Rev-SI (45 pmol/ μ l)	1 μ l
dNTP (2.5 mM)	8 μ l
RT-PCR 5x	18 μ l
Taq (2.5 u/ μ l)	1 μ l
H2O csp	100 μ l

Las condiciones del PCR en este caso fueron: 5 min a 94 °C (1 ciclo); 1 min a 94 °C, 1 min 30 s a 65 °C, 2 min a 72 °C (35 ciclos); y 10 min a 72 °C (1 ciclo). El producto de PCR fue visualizado en geles de agarosa.

II.2.10. MARCAJE RADIOACTIVO DEL DNA.

El marcaje radiactivo con [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (Amersham corp.) del DNA empleado como sonda en los experimentos de hibridación se realizó mediante el procedimiento de "random priming" (Feinberg y Vogelstein, 1983). Este método se basa en la hibridización del DNA a marcar con una mezcla de hexanucleótidos que actúan como cebadores de la Klenow en la síntesis de DNA. La longitud de los fragmentos de DNA a marcar no influye en la reacción y además permite el marcaje de pequeñas cantidades de DNA (10 ng).

La reacción se realizó en un volumen de 20 μl conteniendo 50-200 ng de DNA, 0.025 mM dNTPs (excepto dCTP), hexanucleótidos, 50 μCi de [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP y 2 U de polimerasa. El DNA marcado fue aislado mediante extracción fenólica y precipitación con tRNA, LiCl y etanol absoluto o bien mediante cromatografía en una columna de 1 ml de Sephadex G-50 (Sambrook y col, 1989).

El DNA marcado se obtenía en un volumen final de 100 μl y se usaba 1 μl para determinar el número de cpm en un contador de centelleo.

II.2.11. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS

II.2.11.1 Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa.

Los fragmentos de DNA de cadena doble se separan por tamaño mediante electroforesis sumergida en geles horizontales de agarosa de 10 x 14 cm. El porcentaje de agarosa utilizado varía entre el 0,8 y el 2% dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Los geles fueron preparados en tampón TAE 1X y el desarrollo de la electroforesis se hizo el mismo tampón a un potencial entre 50 y 100 V durante 1 a 4 horas. El DNA en el gel puede ser visualizado mediante el examen directo al ultravioleta del gel teñido con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio, un colorante fluorescente intercalante. Como marcadores de peso molecular se utilizó el DNA del fago λ digerido con HindII, y el DNA del fago ΦX174 digerido con HaeIII.

El tamaño de los fragmentos de DNA fue determinado a partir de los marcadores de peso molecular empleando el programa de Macintosh Gel DNA Fragment Sizer[®].

II.2.11.2. Electroforesis de RNA en geles horizontales de agarosa-formaldehido.

Para separar los distintos RNA por tamaño, se someten a electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes, para evitar que posibles estructuras secundarias del RNA afecten a su migración. Las electroforesis se realizaron en geles al 1% en agarosa, MOPS 1x y 2 M de formaldehido. La composición del tampón de corrido es la misma que la del tampón utilizado para preparar el gel, omitiendo el formaldehido. Para preparar las muestras, el RNA se desnaturizó calentando 10 minutos a 65 °C en una mezcla con formaldehido 2M, formamida 50%, y MOPS 1x. Después de la desnaturización se añadió tampón de carga 6x (1x concentración final) y bromuro de etidio 10 mg/ml (1 mg/ml concentración final). Las electroforesis del RNA se realizaron entre 100- 120 voltios. Como patrones de peso molecular se tomaron los RNA ribosómicos de *T. cruzi* ().

II.2.11.3. Electroforesis en campo pulsado del DNA.

La técnica de electroforesis en campo pulsado (Schwartz y col., 1984) permite resolver moléculas de DNA de hasta 2000 kb en una matriz de gel de agarosa cambiando periódicamente la dirección del campo eléctrico aplicado. La inercia de las moléculas a orientarse en la dirección del campo eléctrico es mayor cuando mayor es su masa, por ello la migración del DNA sufre un retardo diferencial, directamente proporcional a su masa.

Una de las técnicas de electroforesis en campo pulsado es la que emplea un circuito con los electrodos agrupados en forma hexagonal denominada "Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) electrophoresis", (Chu y col., 1986) en la cual se generan campos electricos homogéneos que producen patrones rectos de bandas facilitando la hibridación y el análisis densitométrico.

II.2.11.3.1. Preparación de muestras para CHEF.

Los bloques de agarosa que contenían el DNA total de fueron preparados mediante el procedimiento descrito por Garvey y Santi, (1986): 80 millones de células lavadas con PBS y resuspendidas en 0.3 ml de PBS se mezclaron con igual volumen de agarosa de bajo punto de fusión fundida (Bio-Rad) al 1.2% en PBS y se distribuyeron en los moldes. Una vez solidificados, los bloques fueron incubados a 50°C durante dos días en una solución 0.5 M EDTA pH 9, 1% de N-lauroil-sarcosina y 0.1% de Proteínasa K, y posteriormente lavados y conservados en una solución 0.2 M EDTA pH 8.

Como marcador de electroforesis se usó el DNA de una cepa haploide de *Saccharomyces cerevisiae* S13, cedida por la Dra. Inés Martín del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de Granada. La preparación de los bloques de levadura se hizo según el procedimiento estándar descrito por Carle y Olson, (1984), en el cual las células tratadas con liticasa y embebidas en bloques de agarosa de bajo punto de fusión al 0.625%, son lisadas primeramente con tampón LET a 37°C durante 16 horas y seguidamente con tampón NDS con 1mg/ml de Proteínasa K a 50°C durante toda la noche.

II.2.11.3.2. CHEF electroforesis.

Los cromosomas de *T. cruzi* fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% en un tampón que contenía 0.1 M Tris, 0.1 M ácido bórico, 0.01 M EDTA y 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Las condiciones de la electroforesis fueron: 40 horas a 170 V con pulsos de tiempo de 240 s. El gel resultante fué a continuación transferido a un filtro de nylon (II.2.13) e hibridado (II.2.14).

II.2.12. AISLAMIENTO DE DNA DE GELES DE AGAROSA.

Los fragmentos de DNA procedentes de la digestión o de la amplificación por PCR fueron recuperados de los geles de agarosa mediante electroelución (Wienand y col., 1978) o mediante el procedimiento de Gene Clean[®] (AMS).

II.2.12.1. Electroelución.

La banda de gel con el fragmento de DNA se deposita en uno de los pocillos de un concentrador de muestra electroforético ISCO cup cerrado con una membrana de diálisis. La corriente dirige el DNA hacia el otro pocillo del concentrador situado en el polo positivo. De este pocillo se recupera el DNA y se precipita con acetato sódico y etanol.

II.2.12.2. GeneClean[®].

Se siguió el método detallado por la fábrica en el kit comercial (GeneClean[®] kit (BIO101)). Básicamente el procedimiento consiste en disolver primero el gel en una solución saturada de INa y posteriormente ligarlo a una resina inorgánica de sílice (Glass Milk[®]). El DNA unido es lavado para eliminar impurezas y finalmente eluido de la resina con agua o tampón de baja fuerza iónica.

II 2.13. TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS DE GELES DE AGAROSA A MEMBRANAS DE NYLON.

II.2.13.1. Transferencia del DNA a filtros de nylon ("Southern blot").

El DNA separado mediante electroforesis en gel de agarosa fue en ocasiones transferido a filtros de nylon (Hybond-N®, Amersham) mediante la técnica de "Southern blot" (Soouthern, 1975). La transferencia se hizo por capilaridad colocando el filtro de nylon sobre el gel y empleando SSC 20x como fase móvil. Previamente los geles fueron sometidos a varios tratamientos para facilitar la transferencia: el DNA fue depurinizado parcialmente durante 20 minutos en una solución de HCl 0.25 M; desnaturalizado e hidrolizado en una solución de NaOH 0.5 M y ClNa 1.5 M durante 1 hora y finalmente neutralizado en Tris-ClH 0.5 M, ClNa 1.5 M durante 1-4 horas. Finalizada la transferencia el filtro fue lavado en SSC2x y el DNA fijado por exposición a luz U.V. (360nm) durante 5 min.

II.2.13.2. Transferencia de RNA a membranas de nylon ("Northen blot").

La transferencia de los geles conteniendo RNA se a membranas de nylon se hizo también por capilaridad empleando SSC 20x como fase móvil. Sin embargo, el gel fue tratado 15 min con NaOH 50 mM, 30 min con Tris-ClH 0.1 M pH 7.5 y finalmente 20 min con SSC 20x. Finalizada la transferencia se lavó el filtro y se fijo el RNA tal como se ha descrito para el DNA.

II.2.14. HIBRIDACIÓN CON SONDAS RADIATIVAS DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS TRANSFERIDOS A MEMBRANAS .

El DNA fijado a filtros de nylon o nitrocelulosa fue hibridado de forma específica con sondas marcadas por el método de "random priming" (II.2.10). Las membranas se prehibridaron a 42 °C durante 3-6 horas en solución de hibridación (II.1.3.2). Seguidamente se renovó la solución y los filtros se hibridaron durante toda la noche con 10⁶ cpm de sonda desnaturalizada por ml de solución de hibridación. Para eliminar toda la sonda unida de forma inespecífica los filtros fueron lavados 2 veces a 42°C durante 20 min con una solución consistente en SSC 2x, SDS 0.1%, secados al aire y expuestos con películas de autoradiografía X-OMAT® AR (Kodak) utilizando pantallas amplificadoras de DuPont a -80°C. El revelado se realizó tras una exposición que varió entre 1 hora y 2 semanas en un revelador automático .

II.2.15. SECUENCIACIÓN.

La secuenciación del DNA se realizó por el método enzimático de terminación de cadena descrito por Sanger y col. (1977). El método se basa en la parada de la síntesis de un

DNA naciente mediante el empleo junto los nucleótidos (dNTP) de otros (ddNTP, 2',3'-didesoxinucleótidos), que carecen del OH 3' necesario para la elongación del DNA. La síntesis se inicia exclusivamente a partir del extremo 3' de un oligonucleótido empleado como cebador y termina cuando se incorpora el análogo ddNTP. El empleo de los dNTPs junto a los ddNTPs permite que no todas las moléculas de DNA aborten en la misma base. Adicionalmente, la realización de cuatro reacciones independientes con cada uno de los ddNTP proporcionan la información de la secuencia completa.

El enzima empleado fue una variante de la T7 polimerasa comercializada como Sequenase® (U.S. Biochemicals) y seguimos el protocolo descrito por la firma. Para seguir la reacción empleamos el nucleótido marcado [$\alpha^{35}\text{S}$]dATP (1355 Ci/mmol, Amersham corp.). Como cebadores de secuenciación se utilizaron diversos oligonucleótidos sintéticos así como los cebadores universales reverso y universal.

La electroforesis de alta resolución para separar los fragmentos de DNA resultantes de las reacciones de secuenciación se realizaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida cuya composición fue la siguiente: 5% poliacrilamida, 0,2% bisacrilamida, 41% urea, 0.035% persulfato amónico, 4 mM TEMED en tampón TBE 1x. El desarrollo se hizo en TBE 1x a una potencia constante de 60W en una cubeta de secuenciación de BRL.

Tras la electroforesis el gel se adhirió a papel Whatmann 3MM y se secó en vacío a 80 °C durante una hora. La exposición se realizó a temperatura ambiente con películas autorradiográfica que fueron reveladas tras 1-7 días.

II.2.16. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS: SDS-PAGE.

La separación de proteínas de acuerdo a su masa se llevo a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Este método de separación de proteínas se basa en la carga neta negativa que adquieren las proteínas a unirse al SDS, unión que será cuantitativamente mayor cuanto más larga sea la cadena peptídica. La electroforesis se lleva a cabo en geles discontinuos que constan de un gel superior de composición constante y uno inferior, cuyo porcentaje de acrilamida/bis-acrilamida varía en función del tamaño de las proteínas a separar.

La composición del gel superior ("stacking") fue de 125 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 0.2% persulfato amónico, 4% acrilamida, 0,1% bisacrilamida y 0,15% (v/v) TEMED. La composición del gel inferior fue 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.05% persulfato amónico, 0.1% SDS, 0.2% TEMED. La proporción de acrilamida-bisacrilamida (%-%) en estos geles fue del 10-0.26 o del 12.5-0.33 según el tamaño de las proteínas que se resolvían.

Las muestras fueron preparadas mezclando en una proporción 1:1 la muestra de interés con un tampón de composición Tris-ClH 0.135 M, pH 6.8; SDS 6%, glicerol 20%, β -ME 10%, bromofenol blue 0.02%; e hirviéndola 3 min antes de ser cargadas en el gel.

La electroforesis se realizó a una corriente constante de 20 mA. Se emplearon proteínas de bajo peso molecular de Bio-Rad como marcadores. Los geles fueron fijados y teñidos con una solución de Azul Coomasie R-250 al 2% en 25% MetOH-10% AcOH y desteñidos con una solución de 25% metanol-10% ácido acético y secados entre láminas de celofán (Cellophane Membrane Backing® de Bio-Rad).

II.2.17. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

La concentración de proteínas se determinó usando el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), basado en la proporcionalidad de la unión de un colorante, el Comasie Brilliant Blue, a la proteínas. La unión de este colorante es observable a la λ de 590 nm. La concentración de las proteínas de las muestras problemas fue obtenida por comparación con una curva patron construida con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA).

II.2.18. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN MTX-SEFAROSA.

El MTX es un antifolato específico de la DHFR por ello la cromatografía de afinidad en MTX-sefarosa resulta ideal para la purificación de las proteínas recombinantes correspondientes a la DHFR-TS de *T. cruzi* y al dominio DHFR. La purificación se realizó en las condiciones descritas previamente para el enzima de *L. major* (Grumont y col, 1988; Meek y col. 1985). Las células transformadas con los plásmidos de expresión correspondientes fueron cultivadas a 37°C hasta saturación en medio LB con ampicilina 100 μ g/ml, recogidas mediante centrifugación (6000 rpm, 10 min) y resuspendidas en 2 volúmenes (unos 20ml) de un tampón de composición TES 50 mM, β -ME 75 mM, EDTA 1mM, pH 7.0 que contenía una mezcla de 6 inhibidores de proteasas (II.1.3.2). Las células fueron entonces sonicadas a 0 °C usando un vástago estándar de 3/4-in durante 1 min con ciclos del 50%. La operación se repitió 5 veces con intervalos de reposo de 1 min. Los sonicados fueron centrifugados a 15000 rpm durante 1 h a 4°C para recoger sólo la fracción de proteínas solubles.

Los extractos conteniendo hasta un total de 500 mg de proteínas fueron aplicados a columnas de 4 ml de MTX-Sefarosa CL-6B (1.0 x 5 cm), equilibradas previamente con fosfato potásico 10 mM, pH 7.0. El extracto fue recircularizado a través de la columna a un flujo de 0.3 ml/min a 4 °C hasta que no se detectó actividad enzimática en el flujo circulante. Seguidamente la columna fue lavada con unos 8 volúmenes fosfato potásico 10 mM pH 7.0,

KCl 1 M; seguido de 6 volúmenes de fosfato potásico 10 mM, pH 7.0. La proteína fue finalmente eluida en tampón TES 50 mM pH 7.4, DTT 5 mM; EDTA 1 mM, 0.5 M ClK, 1 mM dihidrofolato. La elución se hizo después equilibrar la columna con 6 ml (1.5 volúmenes) de esta solución.

Se recogieron fracciones de 0.5 ml y aquellas con actividades DHFR-TS (4-5 ml) fueron mezcladas y desalinizadas y el H₂F eliminado mediante filtración a través de una columna de Sephadex G15. Finalmente la proteínas fueron concentradas en un microconcentrador de proteínas (Centricon-10[®] microconcentrador de Amicon).

II.2.19. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO ANIONICO EN MONO Q.

Cuando la cromatografía de afinidad en la columna de MTX-sefarosa no resultó suficiente para la purificación de los enzimas recombinantes recurrimos a una cromatografía adicional de intercambio aninónico en una columna mono Q HR5/5 (Pharmacia) segun las condiciones descritas por Siwaraporn y col. (1990). La cromatografía se realizó en un FPLC y se empleó un colector FRAC 200 de Pharmacia para coleccionar los picos.

Brévemente, la proteína desalada y concentrada procedente de la cromatografía de afinidad era aplicada a al monoQ equilibrada previamente con 5 ml de una solución de Tris-ClH 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, β -ME 5 mM a un flujo de 0.2 ml/min. A continuación se aplicó un gradiente bifásico de ClNa, primero hasta 0.2 M (30ml) y seguidamente hasta 1 M (10 ml) en el tampón en el que fue equilibrada la columna. Se midió la actividad en los picos colectados y las fracciones que contenían actividad fueron mezcladas y concentradas como se describe en el apartado anterior.

II.2.20. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR.

La cromatografía de exclusión molecular se realizó en una columna de Superosa-12 HR 10/30 (Pharmacia) y nos permitió por una parte, purificar proteínas que no lo habían sido en la primera cromatografía de afinidad y por otra determinar el peso molecular del dominio DHFR en condiciones no desnaturizantes. En todos los casos la columna se equilibró con al menos dos volúmenes (50 ml) de fosfato potásico 50 mM pH 7.0, ClNa 0.15 M y el flujo fue de 0.5 ml/min. La cromatografía se realizó en un FPLC de Pharmacia.

La recta de calibración para el cálculo de pms se hizo empleando una mezcla de las siguientes proteínas (Pharmacia): Albúmina de Suero Bovino (67000 D), 8 mg/ml ; Ovoalbúmina (43000 D), 4 mg/ml; Quimotripsinógeno (25000 D) 2.5 mg/ml, Ribonucleasa (13700 D) 1 mg/ml. Además se incluyó azul dextrano ($2 \cdot 10^6$ D) 2.2 mg/ml para señalar el

frente de elución. De esta mezcla se inyectaron 100 µl en la columna. Para la determinación del pm del dominio se utilizaron las mismas condiciones, inyectándose en la columna 120 µg de proteína en un volumen de 100 µl con 2.2 mg/ml de azul dextrano. La proteína del dominio fue recuperada y la actividad ensayada.

II.2.21. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

El peso molecular de las proteínas recombinantes fue determinado mediante espectrometría de masas en el servicio de espectrometría de masas de la School of Pharmacy de la Universidad de California San Francisco (UCSF Mass spectrometry Facility (A. L. Burlingame, Director) financiado por The Biomedical Research Technology Program of the National Center for Research Resources, NIH NCRR BRTP 01614).

II.2.22 ENSAYOS CINÉTICOS

II.2.22.1 Ensayo espectrofotométrico de la dihidrofolato reductasa.

La DHFR cataliza la reducción dependiente de NADPH del dihidrofolato a tetrahidrofolato. La actividad DHFR se determinó espectrofotométricamente a 25°C (Hillcoat y col, 1967), midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la desaparición del NADPH. En nuestro ensayo, una unidad de actividad enzimática equivale a un nmol de dihidrofolato reducido por minuto y ml y la actividad enzimática específica se refiere al número de nanomoles de H₂F reducidos por minuto y por miligramo de proteína.

La medida de la actividad se realizó en cubetas de cuarzo de 1 ml en los que se mezclaron los siguientes reactivos:

<u>Reactivos</u>	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
2x TES DHFR	500 µl	50 mM TES, 1 mM EDTA, 75 mM β-ME
2 mM NADPH	50 µl	100 µM
20 mg/ml BSA	50 µl	1 mg/ml
1.2 mM H ₂ F	50 µl	60 µM
Enzima	5-50 µl	1-10 U
DDW csp	1 ml	

La reacción se inició con H₂F o con NADPH tras equilibrar a 25 °C y determinar la línea base. Se monitorizó la variación de D. O a 340 nm por minuto ($\Delta D.O.^{340}/\text{min}$) y se determinó la actividad DHFR usando $\Sigma_{340}=12300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hillcoat y col, 1967) a partir la ecuación M.1.:

$$\text{DHFR (nmol/min ml)} = \frac{\Delta \text{D.O.}^{340} \times 10^9 (\text{nmol/mol}) \times 10^{-3} (\text{l/ml})}{12300 (\text{l/mol} \cdot \text{cm}) \times \text{tiempo (min)} \times 1 (\text{cm})} \quad \text{Ec. M.1.}$$

II.2.22.2. Ensayo espectrofotométrico de la timidilato sintasa.

La timidilato sintasa cataliza la metilación reductiva del desoxiuridin-monofosfato (dUMP) a desoxitimidin monofosfato (dTMP) con la conversión concomitante $\text{CH}_2\text{-H}_4\text{F}$ en $7,8\text{-H}_2\text{F}$. En un ensayo espectrofotométrico de la actividad TS, se monitoriza el incremento en la absorbancia a 340 nm debida a la conversión de $\text{CH}_2\text{-H}_4\text{F}$ a H_2F usando $\Sigma_{340} = 6400 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Wahba y Friedkin, 1961). Una unidad de actividad enzimática TS equivale a 1 nmol de dTMP producido por minuto y ml (Meek y col., 1985).

Para la medida de la actividad se mezclaron los siguientes componentes en una cubeta de cuarzo de 1 ml:

<u>Reactivos</u>	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
2x TES TS	500 μl	50 mM TES, 1 mM EDTA, 75 mM β -ME, 25 mM MgCl_2 , 6.5 mM HCHO
5 mM dUMP	25 μl	125 μM
20 mg/ml BSA	50 μl	1 mg/ml
7 mM (6R,S)- $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folato}$	50 μl	175 μM en la forma 6R
Enzima	5-50 μl	5-30 U
DDW csp	1 ml	

Se mezclaron bien todos los componentes, excepto el iniciador de la reacción, se dejaron equilibrar a 25°C , y se determinó la línea base. La reacción se inició con dUTP o con enzima, se monitorizó el $\Delta \text{D.O.}^{340}/\text{min}$ y se calculó la actividad TS usando $\Sigma_{340} = 6400 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ aplicando la ecuación 2:

$$\text{TS (nmol/min ml)} = \frac{\Delta \text{D.O.}^{340} \times 10^9 (\text{nmol/mol}) \times 10^{-3} (\text{l/ml})}{6400 (\text{l/mol} \cdot \text{cm}) \times \text{tiempo (min)} \times 1 (\text{cm})} \quad \text{Ec. 2.}$$

II.2.22.3. Determinación de las constantes de Michaelis-Menten (K_m).

Los valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) para los sustratos del enzima bifuncional, H₂F, NADPH, dUMP y CH₂-H₄F fueron determinados a partir de la regresiones no lineales de las velocidades iniciales y la concentración de sustrato a la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 3)

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ec. 3.}$$

Donde v es velocidad inicial, V_{\max} es la velocidad máxima de reacción, $[S]$ es concentración de sustrato limitante y K_m es la constante de Michaelis-Menten.

Las velocidades iniciales fueron obtenidas de ensayos espectrofotométricos bajos las condiciones descritas en II.2.22.1 y II.2.22.2 en los que uno de los sustratos se mantenía a concentraciones saturantes y se variaba la concentración del sustrato del que se pretendía obtener la K_m . La concentración de enzima empleada en los ensayos cinéticos fue la necesaria para producir a concentraciones saturantes de ambos sustratos un $\Delta D.O.$ entre 0.03-0.04. Ello implicó el empleo de las siguientes concentraciones finales de enzima:

- De 0.64 nM y 0.84 nM respectivamente para la K_m del H₂F y del NADPH del enzima enzima bifuncional
- De ≈ 25 nM para las K_m s del dUMP y CH₂-H₄F del enzima bifuncional.
- De ≈ 5 nM para las K_m del H₂F y del NADPH del dominio recombinante DHFR.

La concentración de los sustratos fue determinada espectrofotométricamente cada vez que se determinó la K_m correspondiente usando los siguientes coeficientes de extinción molar:

$\Sigma_{282} = 28000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el H₂F (Blakley, 1960; Stone y col. 1984)

$\Sigma_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el NADPH (Penner y Frieden, 1985)

$\Sigma_{262} = 9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el dUMP (pH 2) (CRC Handbook of Biochemistry)

$\Sigma_{294} = 32000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el (6R,S)-CH₂-H₄F a pH 9.

II.2.22.4. Determinación de la constante catalítica (k_{cat}).

Cuando la concentración de sustrato es mucho mayor que la K_m , la constante catalítica o número de recambio (k_{cat}) viene definida por la ecuación 4, donde $[E]$ representa la concentración de enzima.

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E]$$

Ec. 4.

A partir de esta ecuación se puede calcular la k_{cat} conociendo la concentración de enzima y su p_m . La V_{\max} se obtiene junto K_m de las curvas de progresión para el cálculo de las K_m s.

II.2.22.5. Cálculo de la constante de inhibición (K_i) para inhibidores del tipo competitivo, TMP, PYR y RO-46-8717.

Inhibidores competitivos son aquellos que comparten con el sustrato el mismo sitio de unión al enzima. En estos casos la constante de inhibición fue determinada a partir de la concentración de inhibidor que disminuye la actividad enzimática a la mitad, I_{50} , mediante la ecuación 5 (Siwaraporn y col 1988).

$$I_{50} = (1 + [S]/K_m)K_i$$

Ec. 5.

$[S]$ se refiere a la concentración del sustrato con el que está compitiendo el inhibidor, K_m es la constante de Michaelis de ese mismo sustrato, y K_i es la constante de inhibición para el inhibidor ensayado.

I_{50} fue obtenida por extrapolación en un representación de la inhibición sufrida por el enzima expresada como 1 menos el ratio de la velocidad del enzima con y sin inhibidor ($1 - v_i/v_o$), frente a la concentración de inhibidor.

Los ensayos cinéticos para la obtención de las velocidades fueron similares a los descritos en II.2.22.1, sólo la concentración de H_2F fue disminuida a $\sim 15 \mu M$ y fueron añadidas diferentes concentraciones del inhibidor (Una descripción más detallada en Resultados). Las concentraciones de enzima en los ensayos fueron de 1 nM para el enzima bifuncional y 2.5 para el dominio DHFR.

II.2.22.6. Determinación la K_i del MTX.

Se llaman inhibidores de unión lenta o de tipo "slow-binding" a aquellos compuestos para los que el proceso de unión, es decir, el establecimiento del equilibrio entre enzima, inhibidor, y complejo enzima-inhibidor, ocurre lentamente con respecto a la escala de tiempo del estado estacionario.

La inhibición con metotrexato fue analizada en base a ensayos en los que se mantenía la concentración de los dos sustratos, NADPH y H_2F , en concentraciones saturantes (II.2.22.1)

y la concentración de MTX era variada entre 0-20 nM. Las reacciones fueron iniciadas con enzima, 0.85 nM de DHFR-TS bifuncional y 2.5 nM del dominio DHFR.

II.2.23. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE DISOCIACIÓN DE MTX DEL COMPLEJO TERNARIO MTX-NADPH-ENZIMA.

Se siguió el procedimiento descrito en Meek y col (1985). En primer lugar se obtuvo el complejo ternario radiactivo [³H]MTX-NADPH-enzima, incubando 20 min el enzima con [³H]MTX y NADPH 0.1 mM en tampón TDE 1x. En el caso del enzima bifuncional la concentración de MTX tritiado fue 0.1 μM y para el dominio DHFR fue 0.9 μM, incluyendo además en el tampón un 8% de PEG. La concentración de proteína en los experimentos fue de 16.9 nM y de 200 nM respectivamente para el enzima bifuncional y el dominio DHFR. Seguidamente tomamos alícuotas de 100 μl e incubamos cada una de ellas con MTX frío (0.1 mM concentración final) durante tiempos crecientes, al término de los cuales el complejo ternario fue separado del MTX no unido filtrando en pequeñas columnas de Sephadex G-15 (Garret y col, 1984). A continuación se determinó la radiactividad del complejo ternario en un contador de centelleo y se examinó como disminuía la radiactividad frente al tiempo de incubación con el MTX frío. Como control negativo tomamos la radiactividad correspondiente a una alícuota incubada con MTX frío durante 45 min y filtrada inmediatamente tras la adición de MTX tritiado. Para incluir en los cálculos la eficacia del contador de centelleo determinamos las cpm de una cantidad conocida de MTX tritiado.

III. OBJETIVOS.

- 1-. Clonar y secuenciar el gen codificante de la DHFR-TS de *T. cruzi*.
- 2-. Analizar la expresión, números de copias y localización cromosómica del gen de la DHFR-TS.
- 3-. Determinar el sitio de adición del mini-exon.
- 4-. Diseñar un sistema de expresión heterólogo que nos permita aislar obtener cantidades apreciables de proteína y purificación de la misma.
- 5-. Iniciar la caracterización cinética del enzima recombinante: Determinación de las K_m s para los sustratos y las k_{cat} para las dos actividades enzimáticas.
- 6-. Iniciar los estudios de inhibición con varios antifolatos inhibidores de la actividad DHFR: Determinación de las constantes de inhibición.
- 7-. Análisis de la inhibición provocada por el MTX.
- 8-. Expresión de los dominios DHFR y TS como proteínas individuales catalíticamente activos. Este objetivo sólo lo conseguimos para el caso del dominio DHFR.
- 9-. Purificación del dominio DHFR recombinante.
- 10-. Caracterización cinética del dominio DHFR: Determinación de los parámetros cinéticos.
- 11-. Análisis de la inhibición del dominio DHFR por los inhibidores ensayados para el enzima bifuncional: Comparación de los resultados obtenidos.

cuales sólo el fragmento de 3.5 kb hibridó con la sonda (Fig. IV.3). Por su parte, la digestión doble Sall-EcoRI originó varios fragmentos y sólo uno de 1.9 kb fue positivo. Más adelante, cuando se secuenció este fragmento se comprobó que contenía la secuencia completa codificante para la DHFR-TS, excepto unos 100 pb correspondientes al extremo 5' del gen que quedaron en el fragmento adyacente de 2.5 kb. El mapa de restricción del clon pPRTS-1 con los enzimas Sall, EcoRI y SacI aparece reflejado la figura IV.4.

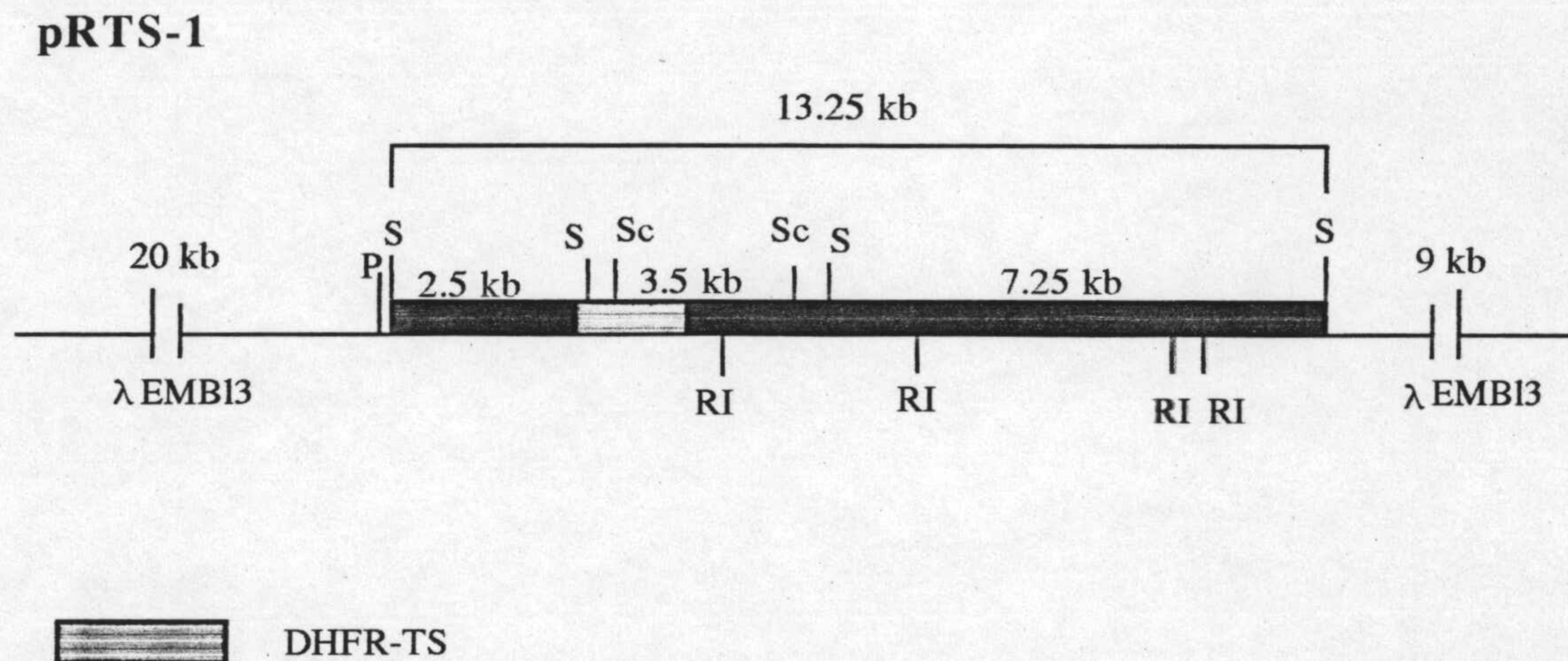


Figura IV.4. Mapa de restricción del clon pRTS-1. En rojo la región codificante para la DHFR-TS. RI, EcoRI; S, Sall; Sc, SacI; P, PstI.

IV.3 CLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA DHFR-TS.

Con el fin de secuenciar el gen de la DHFR-TS de *T. cruzi* los fragmentos Sall-EcoRI de 1.9 kb, y Sall-Sall de 2.5 kb, fueron clonados en pUC18, dando los plásmidos pTC1.9 y pTC2.5 respectivamente. Así mismo pTC1.9 fue digerido con distintas enzimas de restricción con la intención de obtener pequeños fragmentos codificantes que una vez clonados pudieran ser secuenciados mediante el empleo de cebadores universales. De especial interés fue la digestión con SphI. Esta cortó dos veces dentro del inserto de pTC1.9 originando un fragmento SphI-SphI de 0.9 kb que fue clonado en pUC18 para dar pTC0.9. Por otra parte la digestión doble EcoRI, SphI originó un fragmento de 0.7 kb que también fue clonado dando pTC0.7. La figura IV.5 muestra los plásmidos con los fragmentos que componen el gen de la DHFR-TS.

facilitar el posterior clonaje del producto de PCR, al conjunto de los cebadores ON1, y ON2 se les añadió en su extremo 5' sitios de restricción, EcoRI y BamHI respectivamente.

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando como plantilla DNA genómico de *T. cruzi*, y siguiendo las condiciones descritas en material y métodos. Cuando visualizamos el resultado de la PCR en un gel de agarosa al 2%, comprobamos que eran varios los fragmentos con el tamaño teórico apropiado que habían sido amplificados (Fig. II.2.A). Sin embargo, tan sólo una banda de 300 pb hibridó con la sonda codificante para el gen de la DHFR-TS de *L. major* (Fig. II.2). El DNA correspondiente fue aislado del gel de agarosa, clonado en M13mp18 y propagado en *E. coli* HB101. La secuenciación del DNA confirmó la identidad del amplificado e indicó que el tamaño exacto del amplificado era de 284 pb (Fig.IV.6).

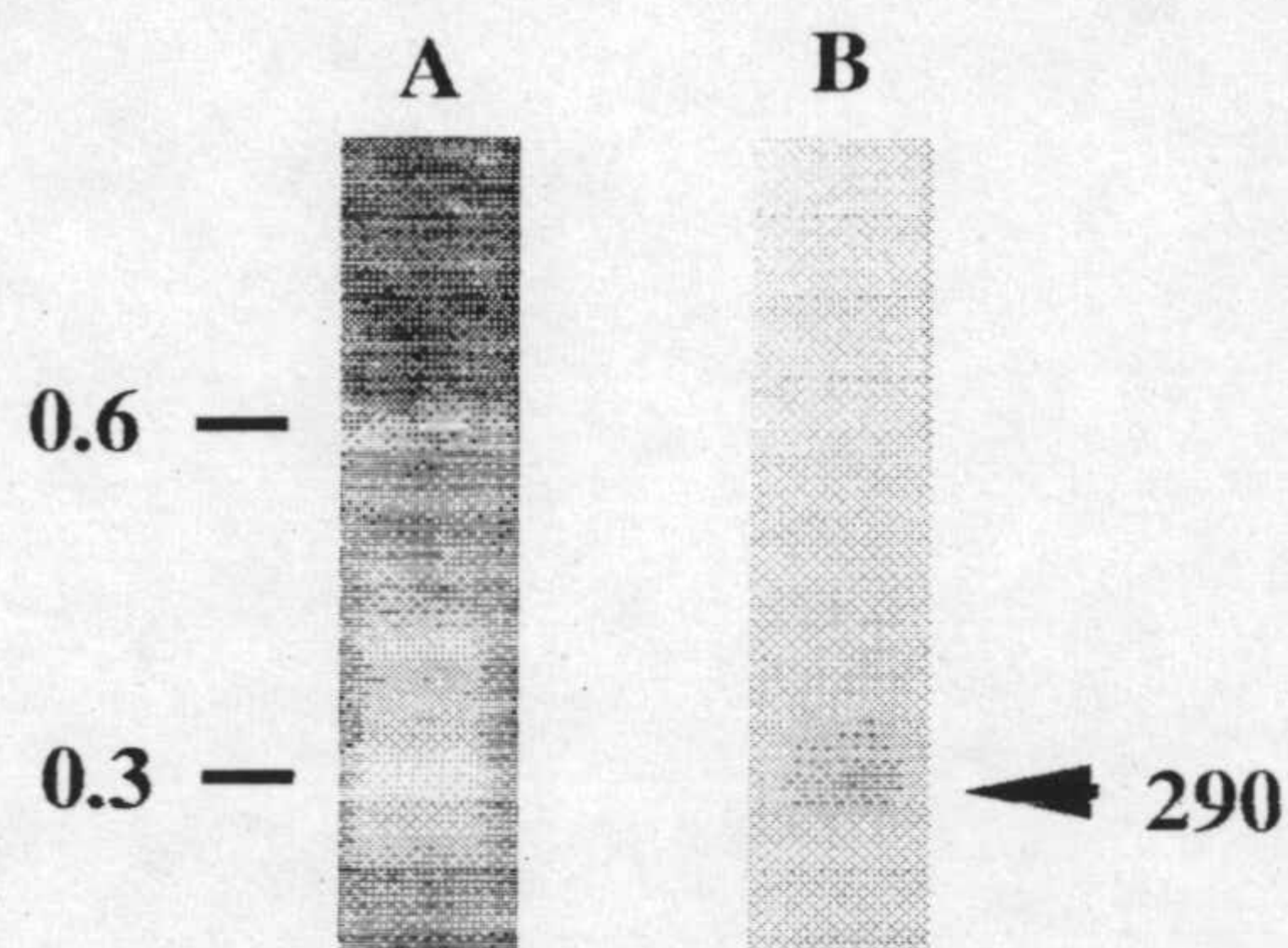


Figura IV.2. Obtención por PCR de la sonda codificante para la DHFR-TS de *T. cruzi*. **A** Resultado de la PCR en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Se observan los fragmentos amplificados con un tamaño teórico apropiado. **B** Autorradiografía correspondiente al mismo gel, transferido e hibridado con la DHFR-TS de *L. major*. La flecha indica el tamaño de la banda que hibridó.

IV.2.AISLAMIENTO DEL GEN DE LA DHFR-TS DE *T. CRUZI*.

Una de los métodos recurridos para el aislamiento de un gen se basa en acudir a una genoteca, bien de cDNA o de DNA genómico. Las primeras contienen tan sólo secuencias codificantes puesto que están construidas a partir de RNAm y las segundas contienen DNA total. En una buena genoteca debe estar representado todo el material genético del organismo en cuestión. Por lo general se construyen de manera que el DNA está distribuido en pequeños fragmentos de DNA, insertados en el material genético de fagos. Si se dispone de la sonda adecuada es posible distinguir unos fagos de otros en virtud de la identificación del inserto de DNA foráneo que contienen.

En estas condiciones, una vez que disponíamos de una sonda específica procedimos a la localización del gen de la DHFR-TS de *T. cruzi* en una genoteca de DNA genómico construida sobre los brazos del fago λ EMBL3 y cedida por el Dr. Antonio Gonzalez Aguilar. De los aproximadamente 10^5 que fagos fueron plaquados, transferidos a filtros de nitrocelulosa e hibridados con la sonda de 300 pb (II.2.3) 21 resultaron positivos. Todos los ellos fueron conservados, y seis fueron sometidos a dos ciclos adicionales de selección con el fin de eliminar clones no positivos acompañantes (Ver en material y métodos el apartado II.2.3. de selección de fagos de interés).

Uno de los seis clones positivos, pPRTS-1, fue mapeado mediante el empleo de enzimas de restricción. Para ello, el DNA del fago pRTS-1 aislado de un lisado líquido sobre células *E. coli* P2393 (II.2.4.4) fué digerido con los enzimas Sall, EcoRI, y la mezcla de ambas. Estas enzimas fueron escogidos porque no cortan el DNA de los brazos de λ EMBL3. Además Sall permite conocer cual es el tamaño del inserto, puesto que la genoteca estaba construida de tal manera que los fragmentos de DNA se insertan entre dos dianas Sall. El resultado de las digestiones fue visualizado en un gel de agarosa, y éste fue transferido e hibridado con la sonda de PCR marcada radiactivamente (Fig. IV.3).

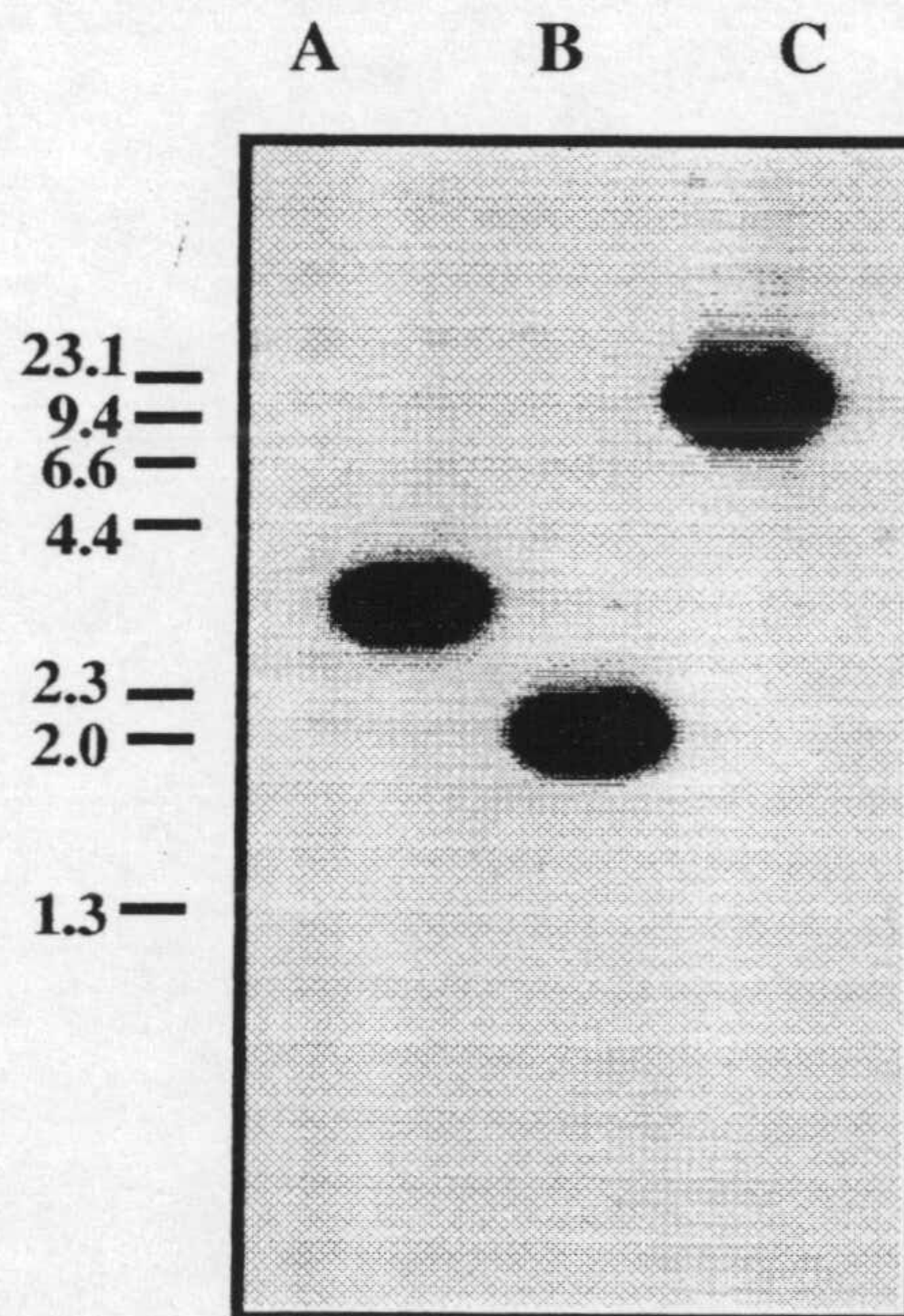


Figura IV.3. Autorradiografía correspondiente a las digestiones con endonucleasas restricción sobre el clon pRTS-1, transferidas a nylon e hibridadas con la sonda de 300 pb. A) Digestión con Sall; B) digestión doble Sall-EcoRI; C) digestión con EcoRI.

El análisis de las digestiones con los enzimas Sall y EcoRI indicó que el clon portaba un inserto de 13.25 kb y que incluía la secuencia completa codificante para el gen de la DHFR-TS.

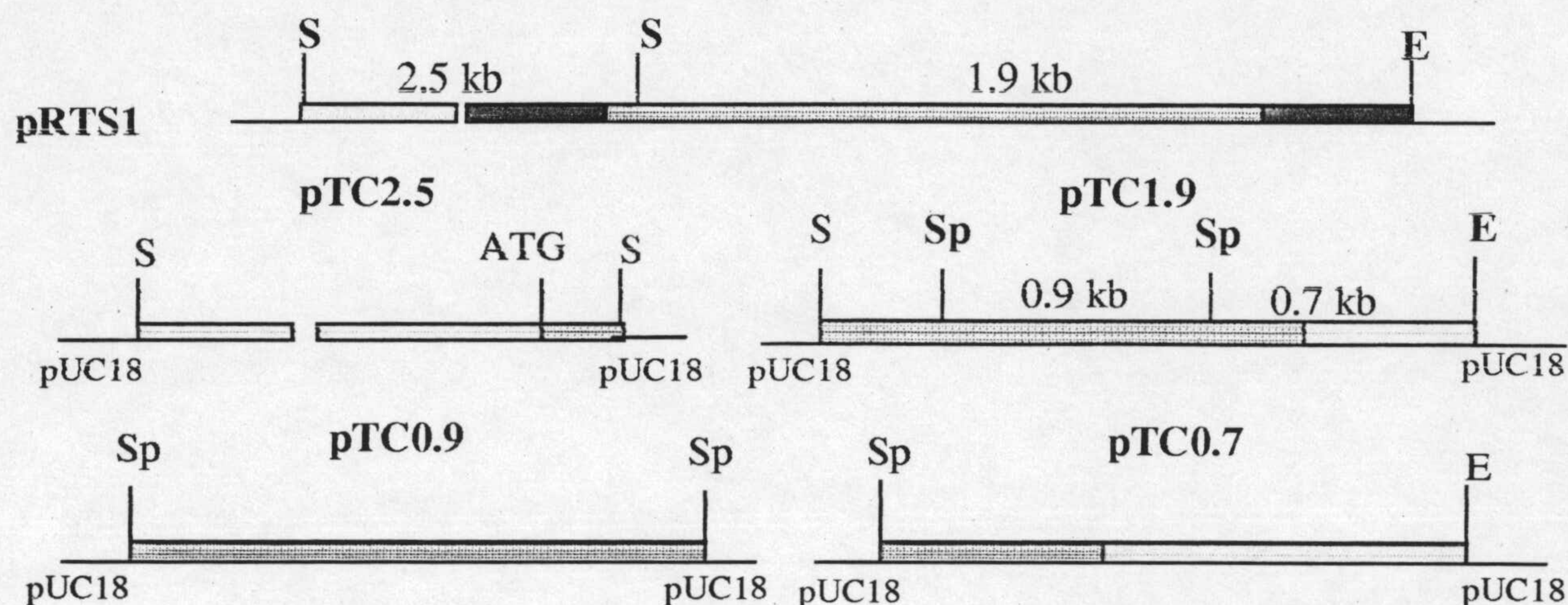


Figura IV.5. Esquema con los subclones que contenían fragmentos codificantes para DHFR-TS. Los plásmidos que se encuentra debajo de otro indican que se obtuvieron a partir de él. En rojo se representa el gen de la DHFR-TS .

El DNA correspondiente a los subclones anteriores fué utilizado como plantilla para la secuenciación en hebra doble del gen de la DHFR-TS. Adicionalmente un inserto EcoRI-PstI de 4.4 kb procedente del clon genómico (Fig.II.4) fue clonado en M13mp18 y M13mp19 para su secuenciación en hebra simple. En ambos casos se siguió el método enzimático descrito por Sanger (II.2.15). Para ello empleamos cebadores universales y otros sintéticos internos a la secuencia de la DHFR-TS.

Aproximadamente secuenciamos 2400 pb entre las que encontramos un marco abierto de lectura de 1563 pb que por homología con el enzima de *L. major* (Grumont y col., 1986) correspondía con la DHFR-TS. El marco abierto de lectura codifica para un polipeptido de 521 aas y un pm estimado de 58829 D (DNA strider© 1.1). La secuencia codificante para el gen se muestra en la figura IV.6 junto con los oligonucleótidos sintéticos empleados en la determinación de la secuencia.

Figura IV.6. *Secuencia codificante del gen de la DHFR-TS de T. cruzi.* La figura representa los 2400 pb secuenciados que incluían el gen de la DHFR-TS de T. cruzi. La numeración tiene como origen el codon de iniciación. Los oligonucleótidos empleados en la secuencia aparecen bajo la secuencia específica sobre la que apareaban. En **negrita y azul** se refleja el dinucleótido AG aceptor del mini-exon.

IV.4 AISLAMIENTO DEL cDNA DE LA DHFR-TS.

Además de la genoteca de DNA genómico, disponíamos en nuestro laboratorio de una genoteca de cDNA de *T. cruzi* generada a partir de los mRNA mensajeros de las formas amastigotas de los parásitos (Gonzalez y col, 1990). La genoteca estaba construida sobre los brazos del fago λ gt11, con los fragmentos de cDNA insertados en una diana EcoRI, de manera que un corte con este enzima liberaba el inserto.

La selección de los clones portadores del cDNA correspondiente al mensajero de la DHFR-TS se hizo de acuerdo al procedimiento descrito en material y métodos, utilizando como sonda el gen completo de la DHFR-TS de *T. cruzi*. Cien mil fagos fueron plaqueados, de los cuales dos resultaron positivos. Ambos fueron purificados tras dos selecciones adicionales y nombrados como pcPR-1 y pcPR-2. A continuación procedimos a analizar la identidad de los insertos de los clones aislados. Para ello el DNA obtenido de lisados líquidos fue digerido con los enzimas EcoRI y Sall, transferido a nylon e hibridado con la sonda correspondiente al gen completo de la DHFR-TS de *T. cruzi* (Fig. IV.7).

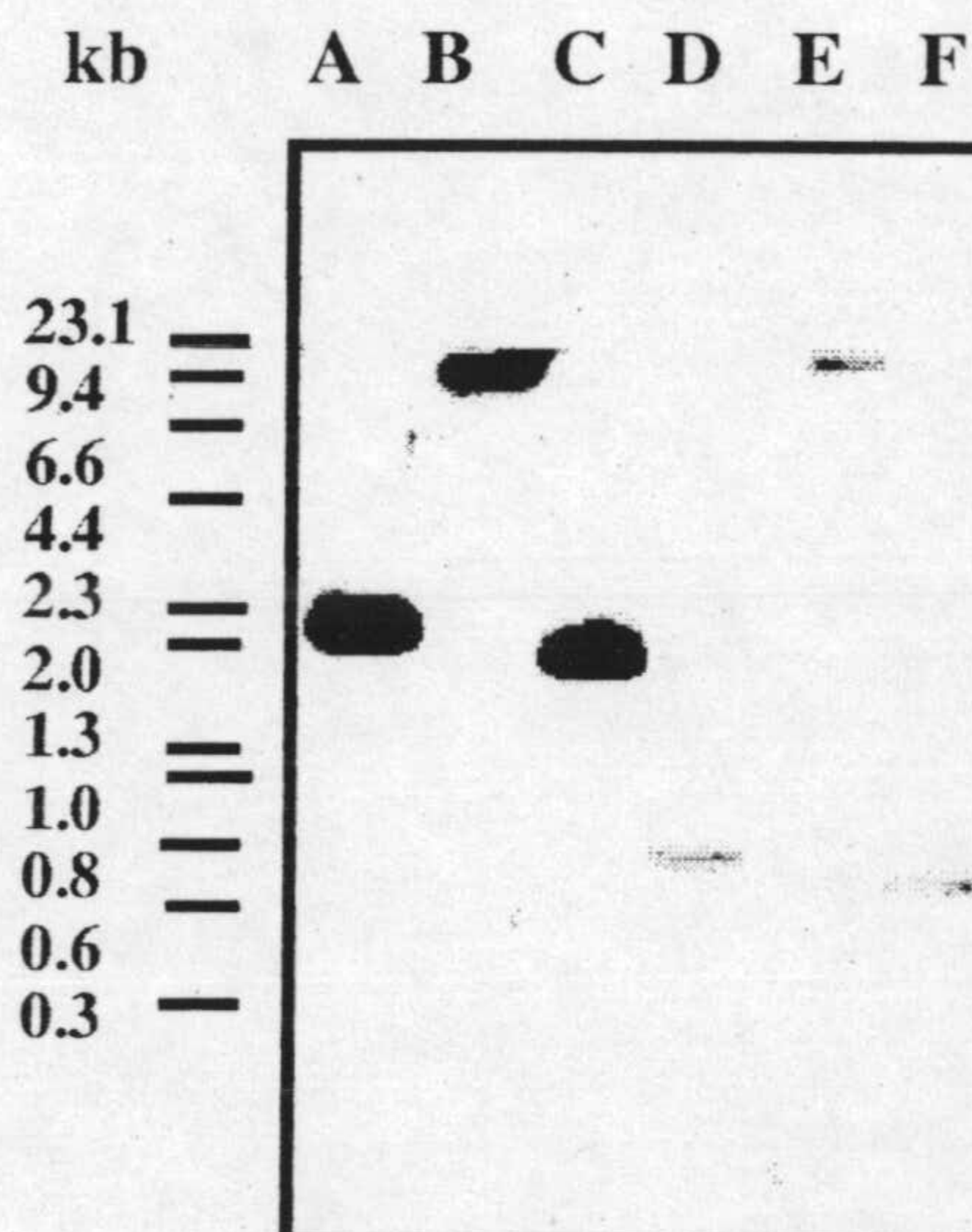


Figura IV.7. Autorradiografía correspondiente a las digestiones Sall y EcoRI sobre los clones de cDNA, pcRT-1 y pcRT-2.. A) pcPR-1 digerido con EcoRI; B) pcPR-1 digerido con Sall; C) pcRT-1 digerido con Sall + EcoRI; los carriles D, E, F corresponden con las mismas digestiones sobre el DNA del clon pcRT-2.

La digestiones EcoRI indicaron que el tamaño del inserto del clon pcPR-1 era de 1.9 kb y de 0.75 kb el del clon pcPR-2. Por otra parte, las digestiones dobles EcoRI-Sall revelaron que ambos clones poseían el extremo 5' de la secuencia codificante para la DHR-TS (Sall cortaba los insertos de cDNA), y que, de acuerdo con el tamaño, el clon pcPR-1 debía contener el gen de la

DHFR-TS completo. El mapa de restricción correspondiente a la digestión Sall aparece reflejado en la figura IV.8.

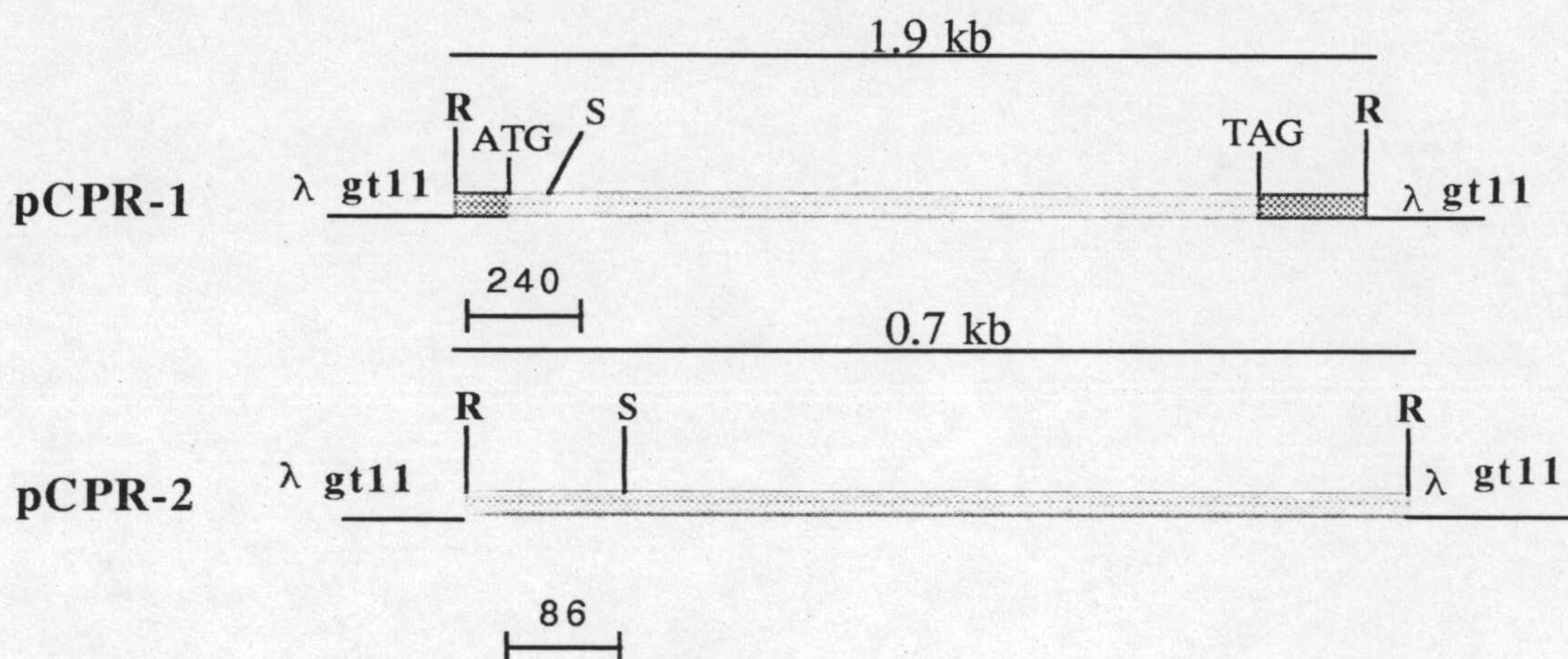


Figura IV.8. Mapa de restricción de los clones de cDNA *pcPR-1* y *pcPR-2*. E, EcoRI; S, Sall. El número bajo los insertos corresponde con la escala en pb.

El inserto del clon *pcPR-1* fue clonado en pUC18 dando el plásmido *pcTC1.9E*, que fue mapeado con enzimas de restricción y secuenciado en ambas direcciones no existiendo diferencias con respecto a la secuencia genómica. Adicionalmente la secuencia reveló que el tamaño exacto del inserto era de 1891 pb y que efectivamente incluía la región codificante completa del gen de la DHFR-TS de *T. cruzi*. Desafortunadamente el inserto carecía tanto del mini-exon como de la cola de poliA, por ello no nos fue posible determinar cuales eran los sitios de aceptor del miniexón y de poliadenilación. Sin embargo, la correspondencia entre la secuencia genómica y la obtenida a partir del cDNA demostraba inequívocamente que no había secuencias intergénicas no traducidas.

IV.5. LOCALIZACION CROMOSOMICA Y ORGANIZACION GENOMICA DEL GEN DE LA DHFR-TS DE *T. CRUZI*.

IV.5.1. Determinación del número de copias.

La distribución de un gen en una genoma puede obedecer a distintas organizaciones. Puede estar repetido en tandem, con una secuencia intergénica entre copia y copia que también se repite; puede encontrarse repetido, pero separado por secuencias intergénicas variables; y por último, puede encontrarse en copia única. Los patrones de digestión del DNA genómico

originados por endonucleasas de restricción con un solo punto de corte en el gen permiten distinguir cual es la organización de un gen en particular. Para genes repetidos en tandem, cada endonucleasa divide el gen en fragmentos que son siempre del mismo tamaño -o múltiplos de un tamaño unidad- para cada una de las enzimas empleadas. En el caso de que el gen esté repetido pero no en tandem, las endonucleasas distribuyen el gen en más de dos fragmentos de distintos tamaños, y distintos a su vez para cada enzima de restricción empleada. Por último, cuando el gen es de copia las enzimas de restricción dividen siempre el gen en dos fragmentos cuyos tamaños son característicos de la endonucleasa empleada. En este caso las digestiones con endonucleasas que no tengan punto de corte dentro de la secuencia codificante limitan el gen a un sólo fragmento cuyo tamaño depende el enzima empleado.

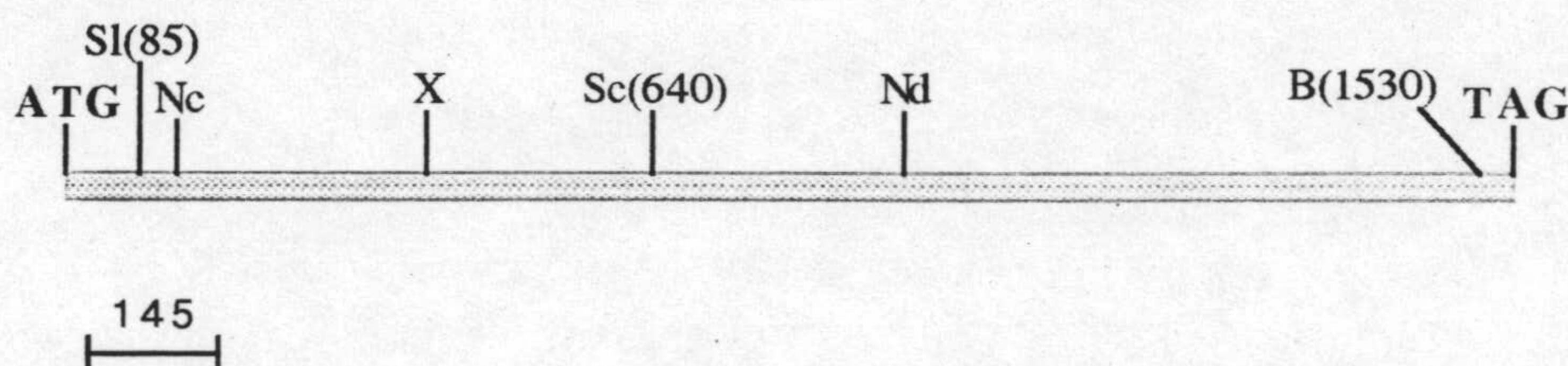


Figura IV.9. Mapa de restricción del DNA codificante de la DHFR-TS de *T. cruzi*. Sólo se representan algunas de las dianas correspondientes a enzimas de restricción que sólo cortan una vez dentro del gen. En negrita aparecen los sitios de iniciación y terminación del gen. S1, SallI; Nc, NcoI; X, XhoI; Sc, SacI; Nd, NdeI; B, BstXI. Entre paréntesis aparece el punto de corte de los enzimas empleados en la determinación del número de copias del gen.

Siguiendo este esquema seleccionamos los enzimas BstXI, EcoRI, SacI y Sall a partir del mapa restricción del gen de la DHFR-TS de *T. cruzi* reflejado en la figura IV.9 . BstXI, SacI y Sall cortaban tan sólo una vez dentro de la secuencia codificante, y EcoRI no tenía diana dentro del gen.

El DNA genómico de las formas epimastigotas de *T. cruzi* fue digerido con estas enzimas, incluyendo las digestiones dobles Sall-EcoRI y SacI-EcoRI. Los productos de estas digestiones fueron desarrollados en un gel de agarosa, transferidos, e hibridados con una sonda Sall-BstxI de 1453 pb correspondiente a la secuencia codificante de la DHFR-TS de *T. cruzi*. En todos los caso hubo hibridación con tan sólo una o dos bandas, lo que sugería que el gen es de copia única (Fig. IV.10).

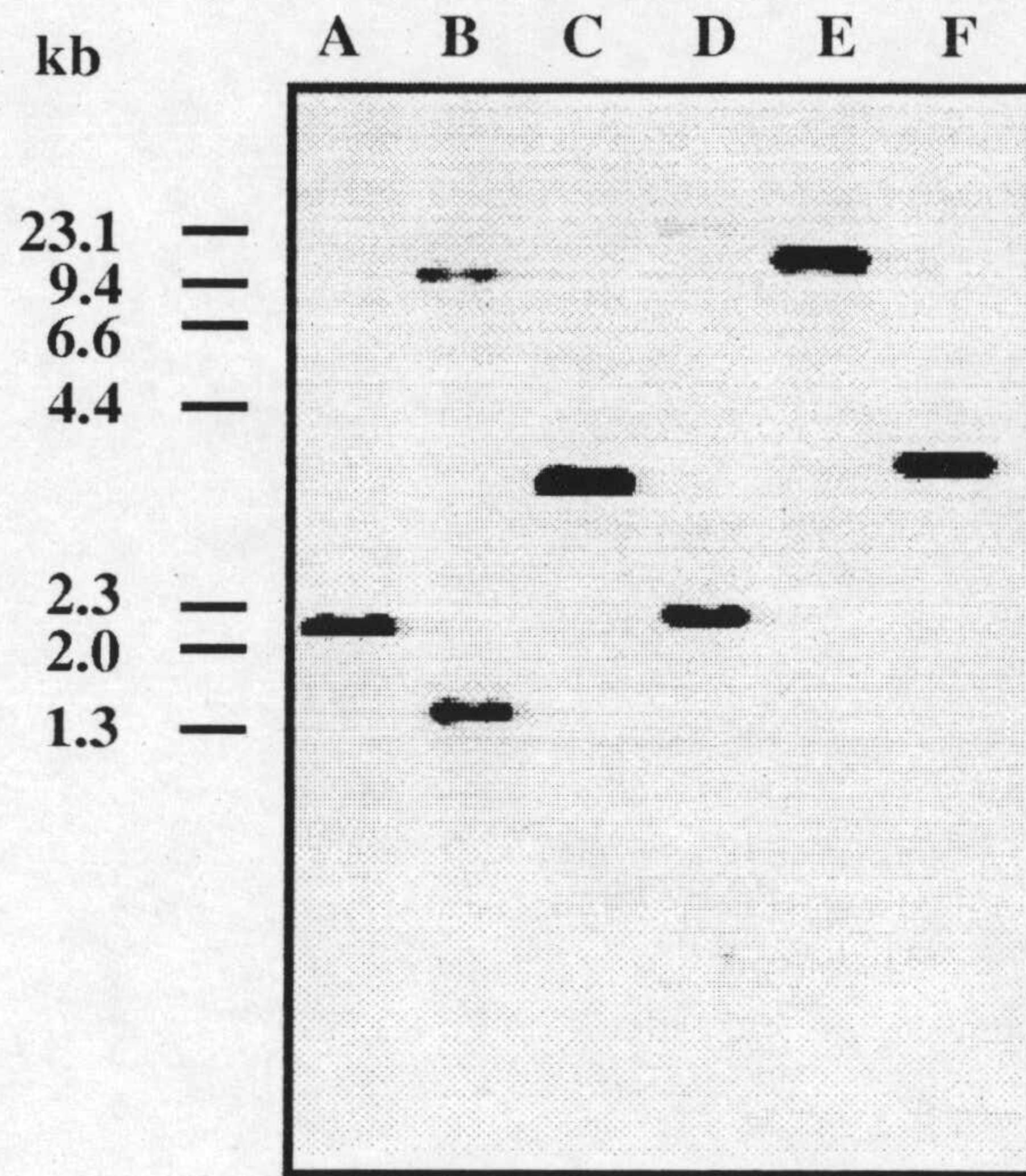


Figura IV.10. Análisis del DNA genómico de *T. cruzi* digerido con diferentes endonucleasas. Autorradiografía correspondiente a varias digestiones de DNA genómico de *T. cruzi* desarrollado en un gel de agarosa, transferido e hibridado con un fragmento Sall-BstXI que contiene 1453 pb de la secuencia codificante de la DHFR-TS de *T. cruzi*. A) digestión con Sall + EcoRI; B) digestión con SacI + EcoRI; C) digestión con Sall; D) digestión SacI; E) digestión con EcoRI; F) digestión con BstXI.

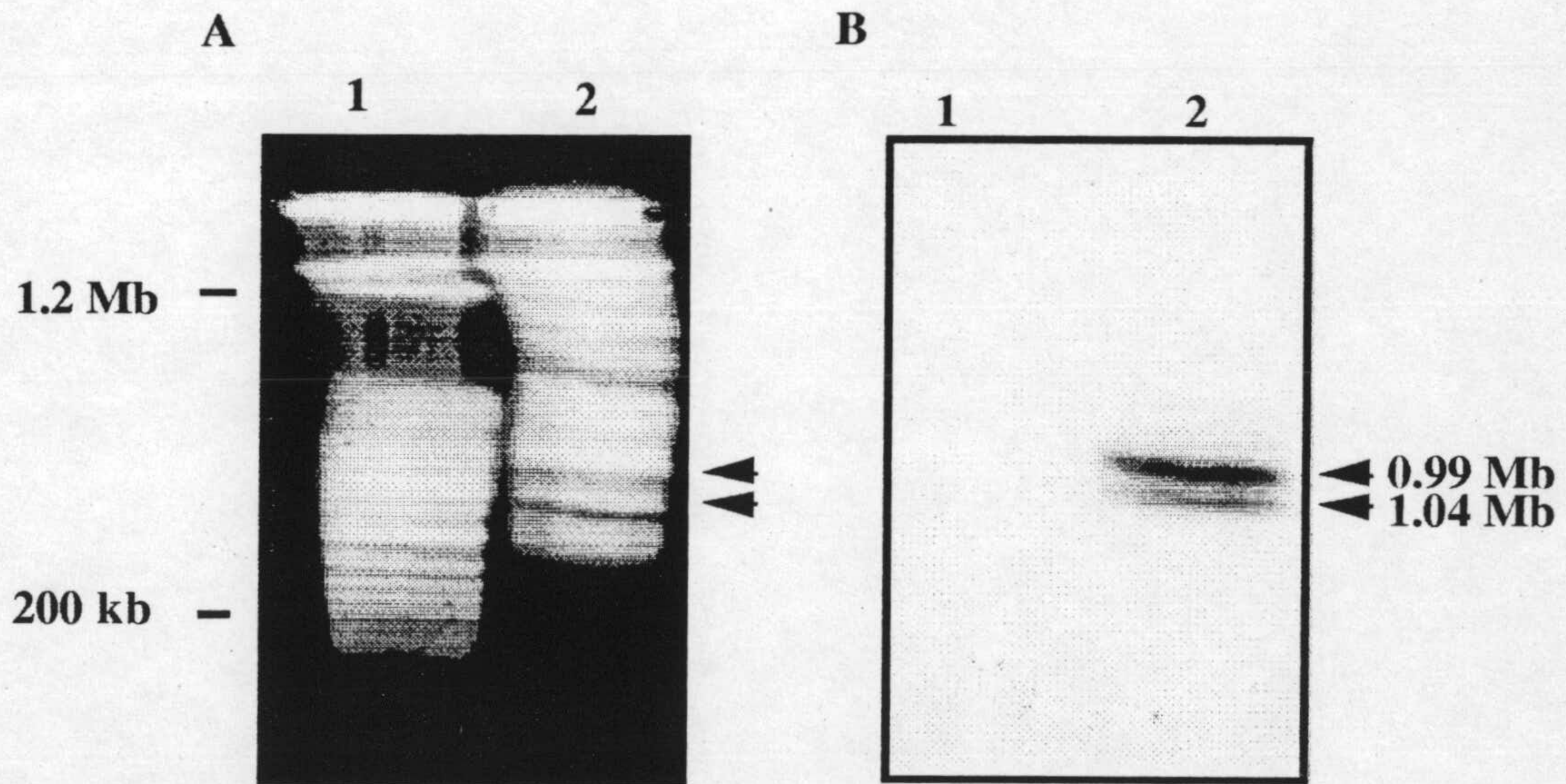


Figura IV. 11. Localización cromosómica del gen de la DHFR-TS de *T. cruzi*. A Cromosomas de *T. cruzi* separados por CHEF y teñidos con con bromuro de etidio. 1) cromosomas de *S. cerevisiae* como marcadores de peso molecular; 2) cromosomas de *T. cruzi*. B Autorradiografía correspondiente al gel del panel A, transferido a nylon, e hibridado con el fragmento Sall-BstXI. Las flechas señalan el pM de las bandas de DNA que hibridaron con la sonda de la DHFR-TS.

II.5.2 Localización cromosómica del gen de la DHFR-TS de *T. cruzi*.

Una vez determinado el número de copias del gen de la DHFR-TS de *T. cruzi* quisimos saber cual era su la localización cromosómica. Para ello, valiéndonos de la tecnica de electroforesis en campo pulsante (CHEF), separamos los cromosomas de *T. cruzi* de acuerdo con la condiciones descritas en material y métodos (II.2.11.3), y el gel resultante lo transferimos a nylon y lo hibridamos con la sonda SalI-BstXI de 1453 pb. Como se muestra en la figura IV.13 dos bandas de aproximadamente 0.99 y 1.04 Mb hibridaron con la sonda.

II.6. TRANSCRIPCION DEL GEN DE LA DHFR-TS DE *T. CRUZI*.

La fracción poliadenilada del RNA total de las formas epimastigotas de *T. cruzi* correspondiente al RNAm fue purificado en una columna de poliT (II.2.5), desarrollado en un gel desnaturizante de agarosa con formaldehido, transferido a un filtro de nylon, e hibridado con una sonda marcada radiactivamente que codificaba para el gen completo de la DHFR-TS de *T. cruzi* (técnica conocida como 'northern blot'). El resultado reveló la presencia de tan sólo un transcrito para el gen de la DHFR-TS de *T. cruzi* de aproximadamente 2.3 kb (Fig. IV.12).

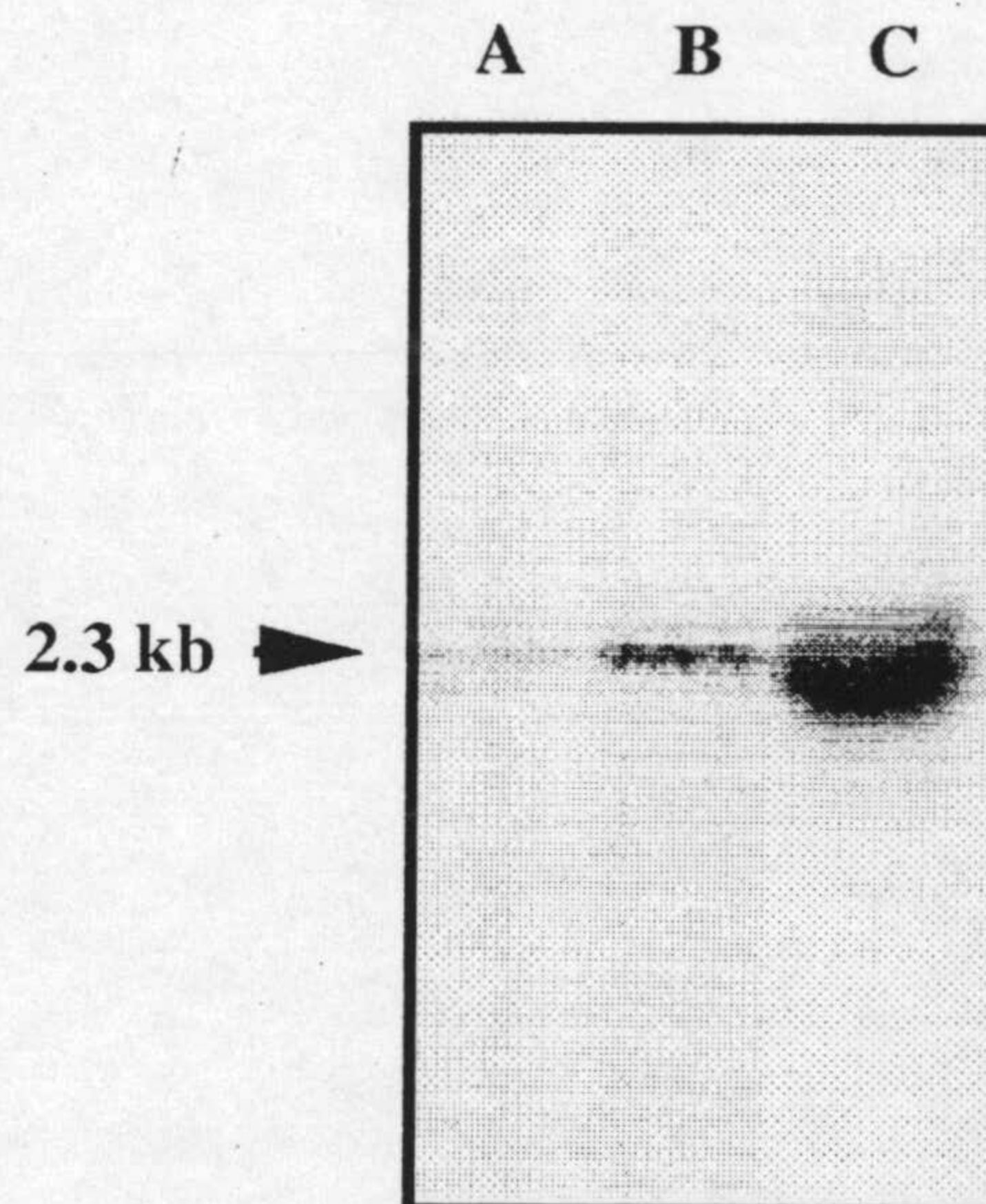


Figura IV.12. Análisis de la transcripción del gen de la DHFR-TS de *T. cruzi*. Autorradiografía correspondiente a la fracción poliadenilada del RNA (poliA⁺) de las formas epimastigotas de *T. cruzi*, transferido a nylon e hibridado con la secuencia completa del gen de la DHFR-TS. A) 0.5 µg poliA⁺; B) 1 µg poliA⁺; C) 15 µg poliA⁺. La flecha indica el tamaño del transcrito de la DHFR-TS de *T. cruzi*.

II.7. DETERMINACION DEL SITIO ACEPTOR DEL MINI-EXON.

Tal y como hemos indicado en la introducción todos los RNAm de tripanosomátidos descritos hasta la fecha contienen en su extremo 5' un secuencia conocida como mini-exon o "spliced leader" específica de cada especie y que se añade al transcrito primario durante su maduración.

Para la localización del sitio aceptor de miniexón seguimos la estrategia representada en la figura IV.13.

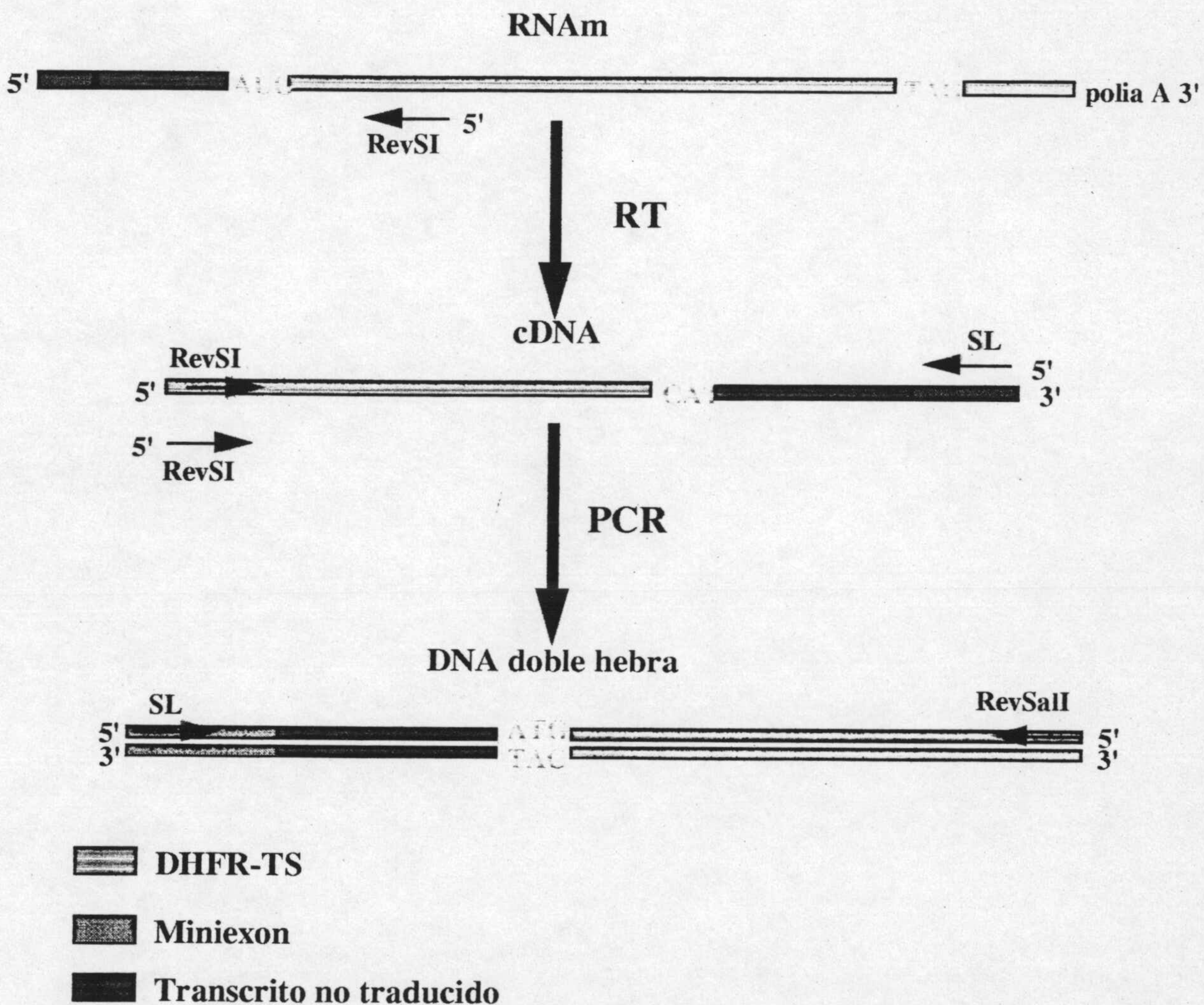


Figura IV.13. Estrategia seguida en la localización del sitio de aceptor del mini-exon. El rojo la secuencia codificante de la DHFR-TS, en la que se han señalado los codones de iniciación y el de terminación. RT, reacción de la retrotranscriptasa; PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

En primer lugar obtuvimos el cDNA copia del extremo 5' del transcrito de la DHFR-TS mediante la reacción catalizada por la transcriptasa inversa. Como plantilla utilizamos la fracción poliadenilada del RNA de *T. cruzi*. y como cebador empleamos el oligonucleótido antisentido

RevSI, que apareaba en la secuencia codificante de la DHFR-TS. La reacción se realizó con la retranscriptasa AMV en la condiciones descritas en material y métodos (II.2.9).

A continuación amplificamos el cDNA producto de la transcripción inversa mediante una PCR. Para ello utilizamos como cebadores el SL, con la secuencia del mini-exon, y el oligonucleótido antisentido RevSI. En estas condiciones la PCR amplificó varios fragmentos dentro de los límites del tamaño esperado (Fig. IV.14.A). Para eliminar los productos de PCR inespecíficos realizamos una reamplificación empleando de nuevo como cebador sentido el SL, y como cebador antisentido RevRI, interno también a la secuencia de la DHFR-TS pero que apareaba corriente arriba con respecto donde lo hacía el usado en la primera PCR. En un gel de agarosa observamos la amplificación de dos productos de 200 y 400 pb aproximadamente (Fig.IV.14B). Trasferimos el gel con los productos de PCR a nylon e hibridamos con una sonda sonda de 190 pb, 85 correspondientes al extremo 5' del gen y el resto a la región no traducida situada corriente arriba. Tan sólo el DNA correspondiente a la banda de 200 pb hibridó. Esta banda fue clonada en pBSKS⁻ y secuenciada, indicando el resultado que se trataba del gen de la DHFR-TS y que el acceptor del 'spliced leader' se encuentra 163 pb corriente arriba del codon de iniciación (Fig.IV.6)

IV.8. EXPRESION DE LA DHFR-TS RECOMBINANTE DE *T. CRUZI*

Para expresar la proteína correspondiente a la DHFR-TS de *T. cruzi* amplificamos en primer lugar el la secuencia codificante a partir del clon genómico original, pRTS-1. Como cebadores se emplearon los oligonucleótidos ON3 y ON4. ON3, apareaba en el extremo 5' de la hebra codificante y contiene el codon de iniciación del enzima seguido corriente arriba por un sitio de restricción EcoRI. Por otra parte, ON4 apareaba en el extremo 3' de la cadena no codificante y contiene en 5' un sitio de restricción HindIV. La reacción de PCR se realizó bajo las condiciones descritas en material y métodos usando 400 ngr de DNA plantilla y rindió una única banda de aproximadamente 1500 pb.

La banda fue cortada y el DNA correspondiente fue aislado mediante geneclon y clonado en el vector de expresión pKK223.3 el cual contiene el promotor tac y un sitio de unión a ribosoma situado en 5' sobre el sitio EcoRI. La construcción así obtenida, pKTCTD, fue en principio propagada en *E. coli* HB101 y La correcta identidad de la construcción fue verificada mediante restricción enzimática y mediante secuenciación.

Una vez comprobada la autenticidad del plásmido, pKTCTD fue empleado para transformar las cepas bacterianas JM105, χ 2913 Thy⁻ y PA414 DHFR⁻ y Thy⁻. En las dos últimas la construcción complementó la deficiencia en TS y ambas cepas fueron capaces de crecer en un medio sin timidina (Belfort y col, 1983).

La expresión de la proteína recombinante fue analizada sobre los extractos crudos solubles de las células transformadas con el plásmido pKTCTD, mediante ensayos espectrofotométricos y en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. En el caso de las células JM105, lacI^q, el análisis de la expresión se hizo tras inducir con IPTG. Para ello las células eran crecidas hasta una densidad optica entre 0.5-0.7, momento en el que se le adicionaba IPTG hasta un aconcentración final de 1 mM, tras lo cual eran crecidas durante 3 horas más antes de ser colectadas. Los ensayos cinéticos indicaron que la actividad DHFR era alta, variando los valores entre 150 U_{mg}⁻¹ en la cepa PA414 y 500 U_{mg}⁻¹ en JM105. En cambio los valores de actividad TS sólo pudieron medirse cuando utilizábamos χ 2913, mientras que en JM105 y PA414 la actividad era no detectable (Tabla I). El análisis de extractos crudos en geles desnaturalizantes de poliacrilamida reveló la presencia de una banda, que no se detectaba en los controles de células transformadas tan sólo con el vector pKK223.3, y que expresión de una proteína de tamaño similar a la DHFR-TS de *Leishmania major* tal y como se observa la figura IV.14 correspondiente a extracto soluble de χ 2913. El análisis densitométrico de esa banda en los extractos solubles de las cepas mencionadas arriba, indicó que la proteína representa entre el 1 y el 2% del total de las proteínas solubles, excepto en PA414 donde no llegaba al 1% (tabla I). En extractos totales de χ 2913 detectamos cuerpos de inclusión con un peso molecular similar a la DHFR-TS, estimando que en esa cepa la DHFR-TS de *T. cruzi* representa el 3-4% del total de las proteínas celulares.



Figura IV.14. Análisis de la expresión de la DHFR-TS de *T. cruzi* en χ 2913. SDS-PAGE 10% teñido con comasie R-250. Extractos solubles de proteínas. A) Marcadores de pM; B) 1 μ g DHFR-TS *L. major* C) 10 μ g χ 2913 -pKK222.3; D) 20 μ g χ 2913 transformada con PE1; E, F, G, H, I, J) 20 μ g 6 transformantes de χ 2913 -pKTCTD. PE1 plásmido de expresión de la DHFR-TS de *L. major* contruido en pKK223.3 (Grumont y col., 1988).

Tabla I. Expresión de la DHFR-TS de *T. cruzi* en varias células hospedadoras..

Organismo	Plasmido	% Proteína ^a	Activi espec (U/mg)		
			DHFR	TS	DHFR/TS
JM105	pKTcTD	1-2	~500	--	
PA414	pKTcTD	<1	150-200	--	
χ2913	pKTcTD	1-2	350-495	15 - 20	~21

^a El porcentaje de proteína recombinante ha sido obtenido a partir de análisis densitométrico en SDS-PAGE con los extractos solubles de las muestras de interés.

IV.9. PURIFICACION DE LA DHFR-TS RECOMBINANTE DE *T. CRUZI*.

El análisis de la expresión en distintas cepas bacterianas indicó que χ2913 era la cepa idónea para abordar la purificación del enzima recombinante puesto que sólo en ella pudimos detectar actividad TS. Por ello la DHFR-TS de *T. cruzi* fue purificada a homogeneidad a partir de extractos solubles de *E. coli* χ2913 transformadas con la construcción pKTCTD. La purificación se realizó en un sólo paso mediante cromatografía de afinidad en columnas de MTX-sefarosa según se describe en el apartado correspondiente de material y métodos (II.2.18).

El rendimiento de la purificación osciló alrededor del 41%, permitiendo obtener aproximadamente 3 mg de proteína aparentemente pura a partir de 2 litros de cultivo (Tabla II). Al contrario de lo que ocurre con el enzima bifuncional de *I. major* (Grumont y col, 1988) no observamos productos de degradación correspondientes a la TS, ni en los extractos crudos, ni en el enzima purificado. Adicionalmente, durante la purificación no hubo pérdida de actividad como consecuencia de la inactivación de los enzimas, conservándose el ratio entre la actividad DHFR y TS en extractos crudos y en el enzima purificado. La proteína purificada se visualizó en forma de una sola banda de 55 kD en un gel desnaturizante de poliacrilamida tal y como muestra la figura IV. 15

Una vez purificada la proteína microsecuenciamos el extremo aminoterminal comprobando que el resultado coincidía con el deducido a partir de la secuencia codificante del gen.

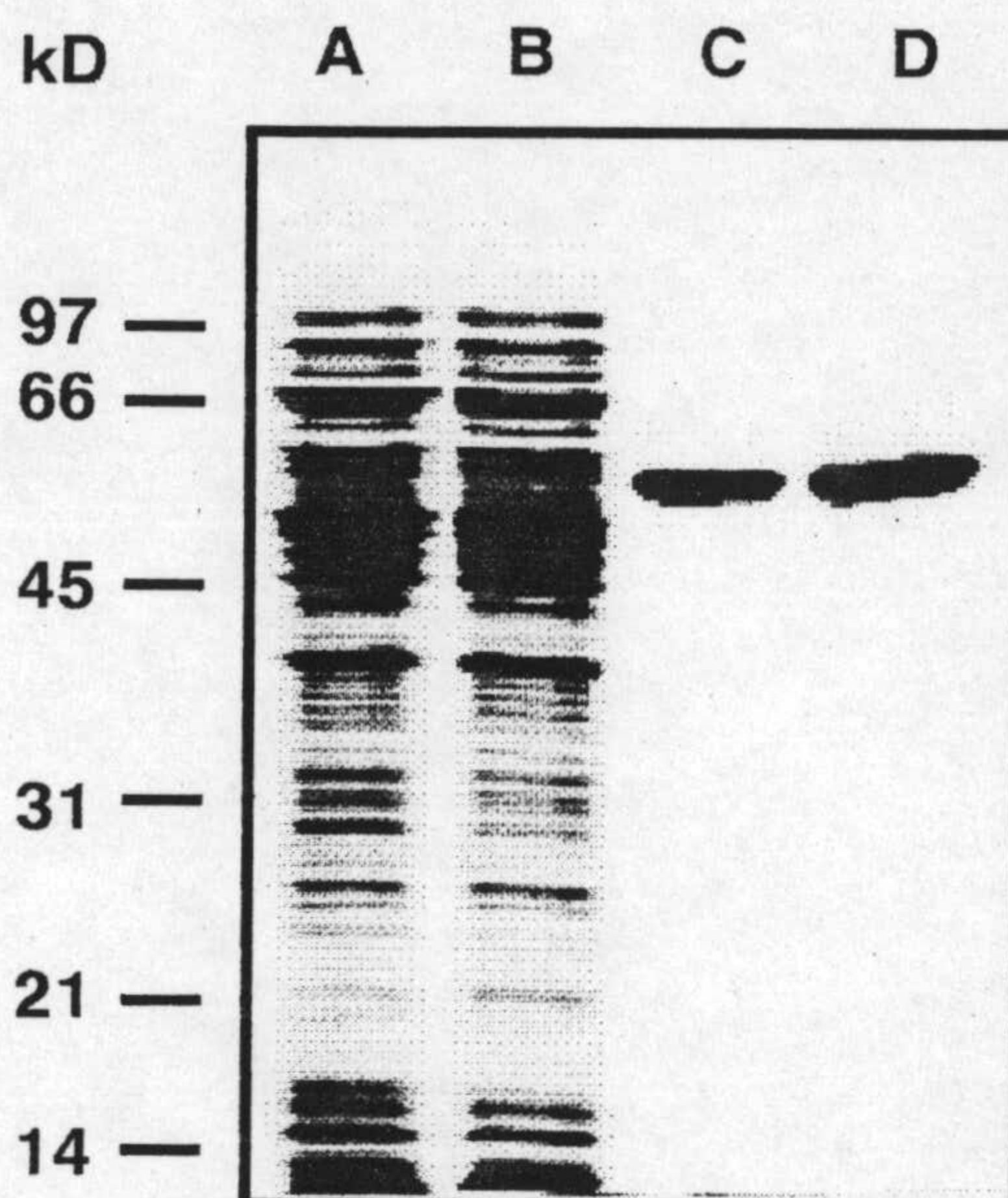


Figura IV.15. Purificación de la DHFR-TS recombinante de *T. cruzi* expresada en *E. coli* χ 2913. SDS-PAGE teñido con Coomassie R250 10% A) 20 μ g de extracto crudo soluble; B) 20 μ g extracto recirculado varias veces por la columna de MTX-sefarosa; C) 1 μ g de DHFR-TS purificada; (D) 2 μ g de DHFR-TS purificada.

Tabla II. Purificación de la DHFR-TS recombinante de *T. cruzi*.

Proteína total ^a	DHFR		TS		Rend. ^b	
	act. esp. (mg)	Unid. totales (U/mg)	act. esp (U/mg)	Unid. totales		
Extracto crudo	700	350	245000	16	11200	—
MTX-Sefarosa	~3	33500	100500	1700	5100	~41%

^a A partir de 2 litros de cultivo.

^b Basado en la actividad DHFR.

La actividad específica DHFR del enzima purificado osciló alrededor de 34000 U μ g⁻¹, mientras que la de la TS fue sensiblemente menor con valores entorno las 1700 U μ g⁻¹. Estos Valores que correspondían a ensayos en los que el enzima se diluía previamente en tampon TDE 1x.

IV.10. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LA DHFR-TS DE *T. CRUZI*.

IV.10.1. Determinación del pm de la DHFR-TS de *T. cruzi*.

El pm de la DHFR-TS determinado a partir de geles desnaturalizantes de poliacrilamida fue de 55 kD (Gel Fragment Sizer[©]), sensiblemente inferior al predicho a partir de la secuencia de aminoácidos que era de 58829 D (DNA strider[©]). Aunque la diferencia entra dentro del error experimental de la técnica también determinamos el pm molecular por espectrometría de masas. La enzima purificada fue liofilizada y enviada al Mass Spectrometry Facility de la Universidad de California en San Francisco, donde su pm molecular fue determinado por espectrometría de mas resultando un valor de pm 58820 ± 20 D, lo cual si correspondía con el valor teórico.

IV.10.2. Estabilidad de la DHFR-TS de *T. cruzi*.

La DHFR-TS de *T. cruzi* fue un enzima muy estable. La liofilización y la conservación a vacío durante largos periodos de tiempo no tuvieron efecto negativo sobre la enzima. Además es posible conservar el enzima a -80 °C sin que la actividad se vea afectada, incluso tras sucesivas congelaciones y descongelaciones. Especialmente resistente fue el dominio DHFR no observandose pérdida alguna de actividad tras mantener dos años a -80 °C. En este mismo periodo la actividad TS se redujo a cuarta parte, aunque en cinco meses de incubación a esta T^a no hubo pérdida apreciable de actividad. Tan sólo cuando la concentración de la proteína era inferior a 0.015 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se producía una desestabilización, que se reflejaba en que la actividad DHFR era menor cuanto mayor era el tiempo en el que se la mantenía diluida. Sin embargo, cuando se incluyó PEG o glicerol en un 8 % en el tampón de dilución no se observó disminución en la actividad DHFR incluso varias horas después de haber realizado la dilución.

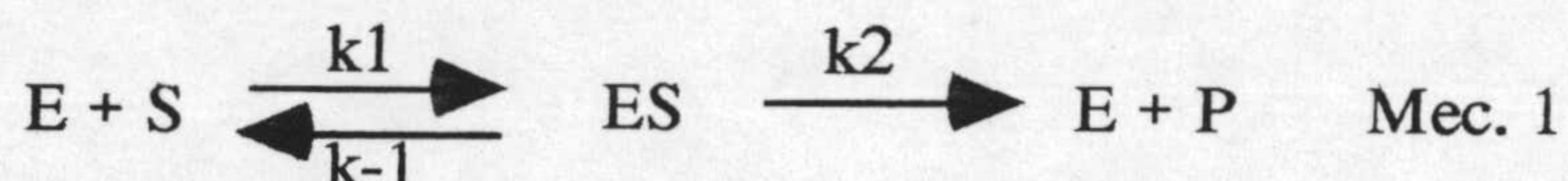
En cuanto la actividad TS, las diluciones con las que trabajamos para medir actividad no fueron suficientes para producir disminución en la actividad TS. Sin embargo, la actividad del enzima fue mucho menor si en el tampón de dilución no se incluía un agente reductor como el DDT. Por ello la diluciones y conservación del enzima se hicieron en tampón TDE 1x que incluía DDT 5 mM.

IV.11. CARACTERIZACION CINETICA DEL ENZIMA RECOMBINANTE DHFR-TS DE *T. CRUZI*:: K_m s y k_{cat} .

IV.11.1. Dependencia de las actividades DHFR y TS del enzima bifuncional de *T. cruzi* con respecto al pH.

IV.11.2. Determinación de las K_m s y k_{cat} s de la DHFR-TS de *T. cruzi*.

La DHFR-TS de *T. cruzi* posee las actividades DHFR y TS localizadas en la misma cadena polipeptídica. Tanto la DHFR como la TS exhibieron un comportamiento hiperbólico de la velocidad de reacción frente la concentración de cada uno de sus sustratos. Estas enzimas presentan pues una cinética de Michaelis-Menten que pudo ser analizada en base al siguiente mecanismo



Donde E, S, ES y P representan: enzima libre, sustrato, enzima-sustrato y producto, respectivamente. Si no hay acumulación neta del complejo enzima-sustrato, entonces son aplicables las condiciones del estado estacionario, $d[ES]/dt = 0$, y la velocidad es proporcional a la concentración del complejo ES:

$$v = k_2[ES] \quad (1).$$

Bajo estas asunciones es posible deducir la ecuación 2 de Michaelis-Menten que corresponde con la ecuación de una hipérbola:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2) \quad \text{Ecuación de Michaelis-Menten.}$$

Y la constante de Michaelis-Menten se define como:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3)$$

En la practica los ensayos cinéticos tanta para la DHFR como para la TS fueron realizados en las condiciones descritas en material y métodos (II.2.22.3) manteniendo uno de los sustratos a concentración saturante y midiendo la velocidad inicial de reacción frente a concentraciones variables del otro sustrato. El ajuste no lineal de estos datos a la ecuación de Michaelis-Menten proporcionó las K_m s para cada uno de lo sustratos junto con las velocidades máximas. Las k_{cat} para ambos enzimas fueron obtenidos a partir de la ecuación 4.

$$V_{max} = k_{cat}[E]. \quad (4)$$

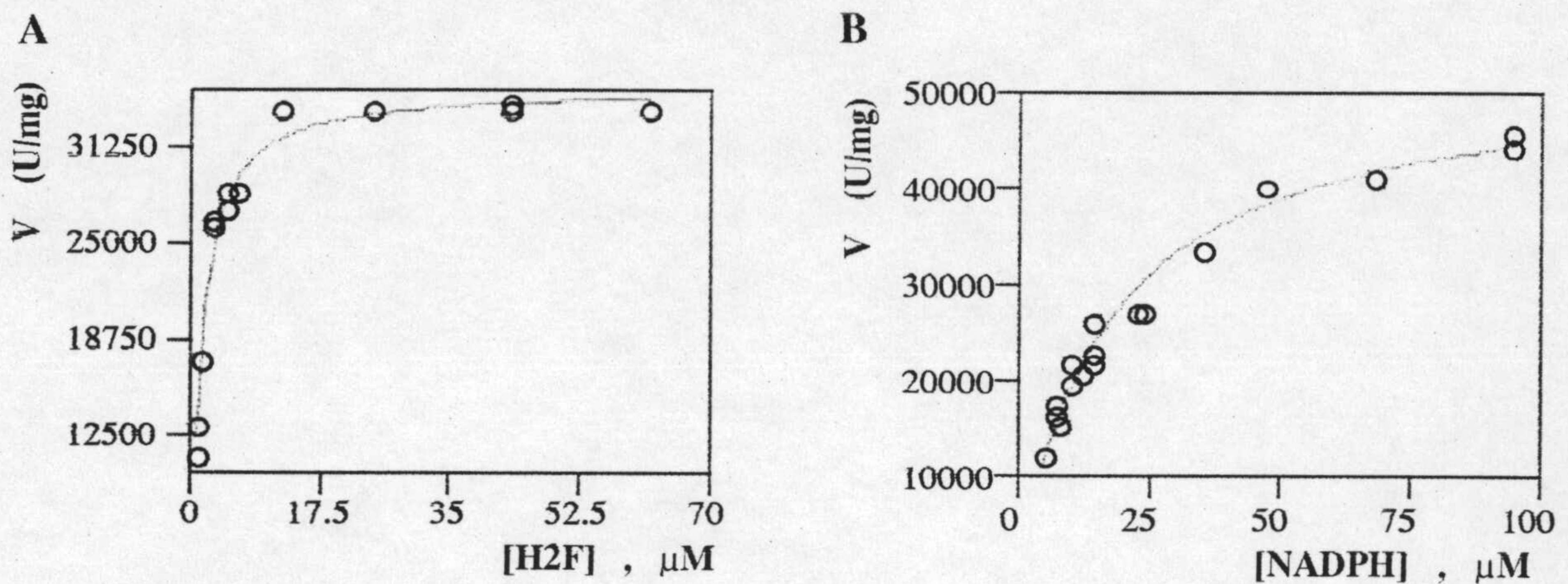


Figura IV. 16. Variación de la velocidad DHFR frente la concentración de sustrato . En rojo se representan las regresiones no lineales de los valores obtenidos a la ecuación de Michaelis-Menten. A Variamos concentración de H₂F, [NADPH]= 100 μM, [E]= 0.64 nM. B Variamos la concentración de NADPH, [H₂F]= 100 μM, [E]= 0.84 nM;

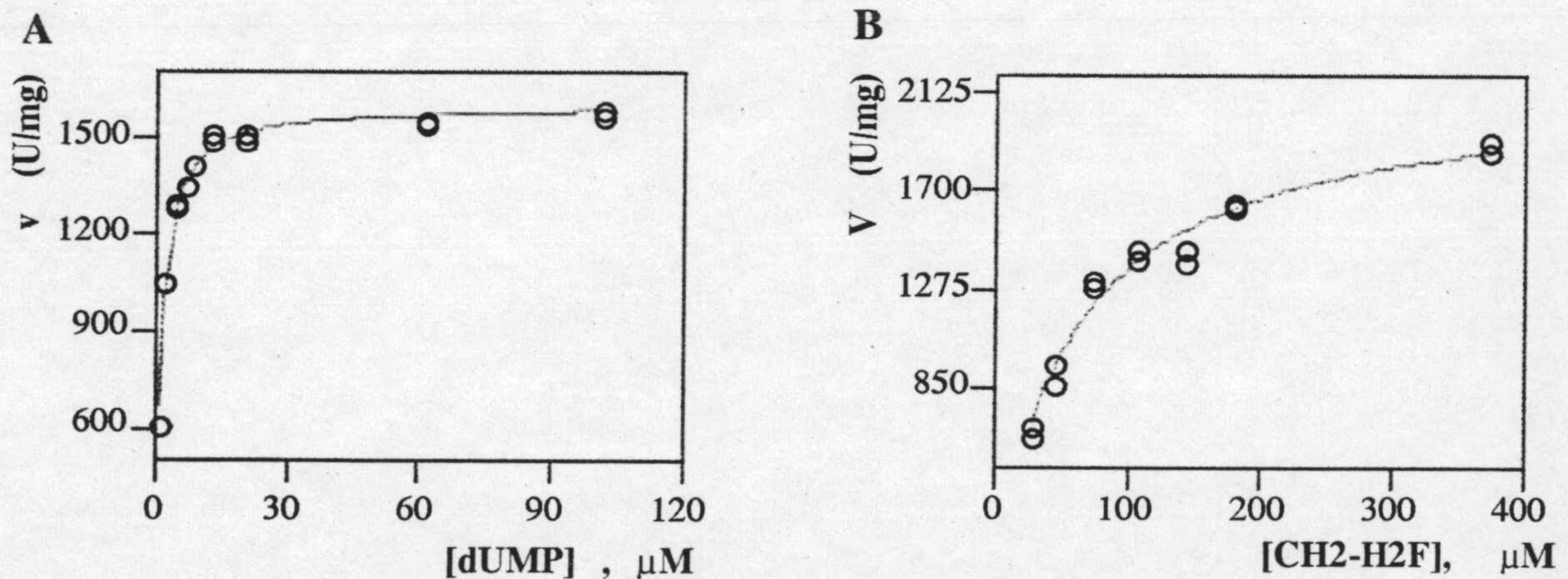


Figura IV.17. Variación velocidad de la TS frente a la concentración de uno de los sustratos mientras que la del otro permanece constante. En rojo aparecen los ajustes de los valores a la ecuación de Michaelis-Menten. A Se varió la concentración de dUMP, [CH₂-H₄F]=200 μM en la forma R. B Se varió la concentración de [CH₂-H₄F], [dUMP]= 125 μM. En ambos la concentración de enzima fue de 25 nM.

IV.1.2.1. K_m s para el H₂F y NADPH y k_{cat} para la actividad DHFR.

Las K_m s para el H₂F y el NADPH se determinaron a partir de las curvas A y B de la figura IV.16. Los valores obtenidos fueron $17 \pm 2 \mu\text{M}$ para el NADPH y $1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ para el H₂F. El valor calculado para la k_{cat} fue de $72 \pm 8 \text{ s}^{-1}$. Estos valores junto con los parámetros cinéticos correspondientes a la actividad TS aparecen reflejados en la tabla IV.

IV.11.2 2. K_m s para el dUMP y el CH₂-H₄F y k_{cat} para la actividad TS.

Las K_m s correspondientes a los sustratos de la TS y la k_{cat} fueron obtenidos de los ajustes representados en la figura IV.17. La K_m para el CH₂-H₄F fue de $58 \pm 5 \mu\text{M}$ mientras la del dUMP fue de $1.02 \pm 0.05 \mu\text{M}$. El valor para la k_{cat} de la TS fue de $3.4 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$ (Tabla IV).

Para los cálculos tanto de la k_{cat} de la actividad TS como DHFR tomamos el peso molecular correspondiente al dímero ($1.18 \times 10^5 \text{ D}$).

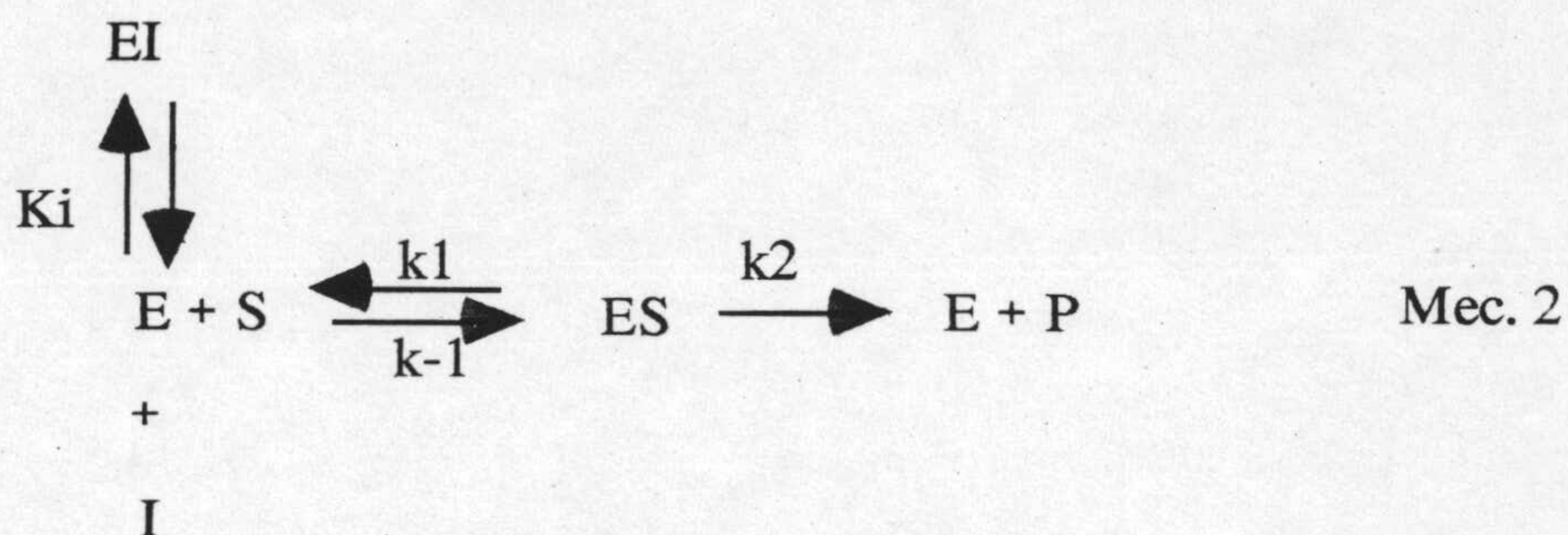
Tabla IV. Parámetros cinéticos de la DHFR-TS de *T. cruzi*.

	Actividad enzimática: Sustrato			
	TS: dUMP	TS:CH ₂ -H ₄ folato	DHFR:NADPH	DHFR:H ₂ folato
$K_m(\mu\text{M})$	1.02 ± 0.05	58 ± 5	17 ± 2	1.2 ± 0.1
$k_{cat}(\text{s}^{-1})$	3.4 ± 0.5	3.4 ± 0.5	72 ± 8	72 ± 8
k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	3.05	0.06	4.5	57

IV.12. INHIBICION DE LA DHFR-TS DE *T. CRUZI* POR TMP, PYR y RO-46-8717: CALCULO DE LAS CONSTANTES DE INHIBICION.

TMP, PYR y RO-468717 son inhibidores competitivos de la actividad DHFR en virtud de su capacidad para unirse al sitio de unión del sustrato, en nuestro caso el H₂F (Segel, 1975). Por otra parte el análisis de las curvas de progresión de la actividad DHFR del enzima bifuncional reflejó que se comportaban como inhibidores clásicos competitivos (Morrison y walsh, 1988). Estos inhibidores se caracterizan porque el equilibrio de unión entre el enzima y el inhibidor se produce muy rápidamente en la escala del estado estacionario. En estas condiciones la disminución en la actividad enzimática observada con el secuestro de enzima por el inhibidor (Figura IV.18).

El procedimiento por el cual se determina la constante de inhibición depende de la naturaleza de la ésta. Para los inhibidores competitivo clásicos las ecuaciones a partir de las que se obtiene las KI se deducen asumiendo el siguiente mecanismo para la inhibición:



Donde K_i es la constante de inhibición, y representa la constante de equilibrio de la disociación del complejo EI, $K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$. Si no hay acumulación de los complejos intermediarios EI o ES son aplicables las condiciones del estado estacionario ($d[EI]/dt = 0$ y $d[ES]/dt = 0$). Si además la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración del complejo ES, podemos deducir una ecuación similar a la de Michaelis-Menten en la que se observa que el efecto aparente del inhibidor competitivo clásico es aumentar la K_m por el sustrato.

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m(1 + [I]/K_i)} \qquad (5)$$

A partir de la ecuación 5 podemos obtener la expresión para la velocidad relativa en presencia y en ausencia de inhibidor, v_i y v_o respectivamente

$$\frac{v_i}{v_o} = \frac{\frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m(1 + [I]/K_i)}}{\frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m}} \qquad (6)$$

De donde se deduce que

$$\frac{[I](1-i)}{i} = K_i(1 + [S]/K_m) \qquad (7)$$

Expresión en la que [I] representa la concentración de inhibidor, [S] la concentración de H₂F, K_m es la cte. de Michaelis para el H₂F, e i es igual a 1-vi/vo.

Si tomamos como concentración de inhibidor aquella que disminuye la velocidad de reacción en un 50%, I₅₀, entonces la ecuación 7 queda como sigue:

$$I_{50} = (1 + [S]/K_m) \quad (8)$$

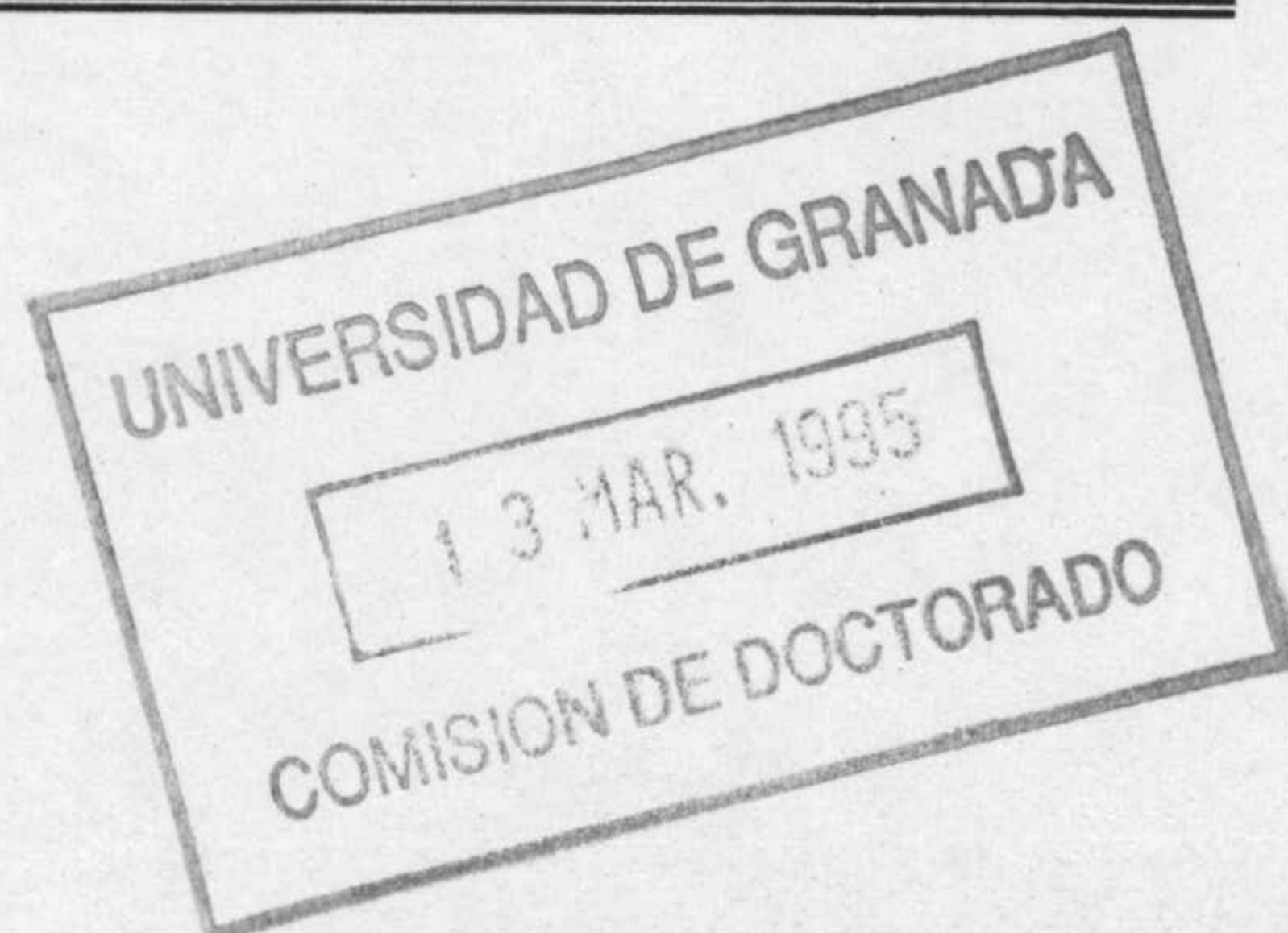
Esta ecuación que nos permitió calcular las K_i para los inhibidores citados. Para ello representamos el grado de inhibición sufrido por el enzima frente a la concentración de cada uno de los inhibidores (figura IV.18.A2, B2, C2) y a partir de ellas estrapolamos las I₅₀ correspondientes con las que calculamos las K_i.

Las K_i de inhibición aparecen reflejadas en la tabla IV junto con las I₅₀ correspondientes a cada uno de los inhibidores.

Tabla IV. Constantes de inhibición e I₅₀s de la Pyr, Tmp, y RO-46-8717 correspondientes para la DHFR-TS de *T. cruzi*.

Inhibidor	Tipo	K _i (nM)	I ₅₀ (μM)
Trimetoprim ^a	Competitivo	21	0.36
Pyrimethamine ^b	Competitivo	12	0.18
RO-46-8717 ^c	Competitivo	0.53	0.01

a [H₂F]= 16.5 μM; b [H₂F]= 18 μM; c [H₂F]= 17.6 μM. K_m[H₂F]= 1.2 μM.



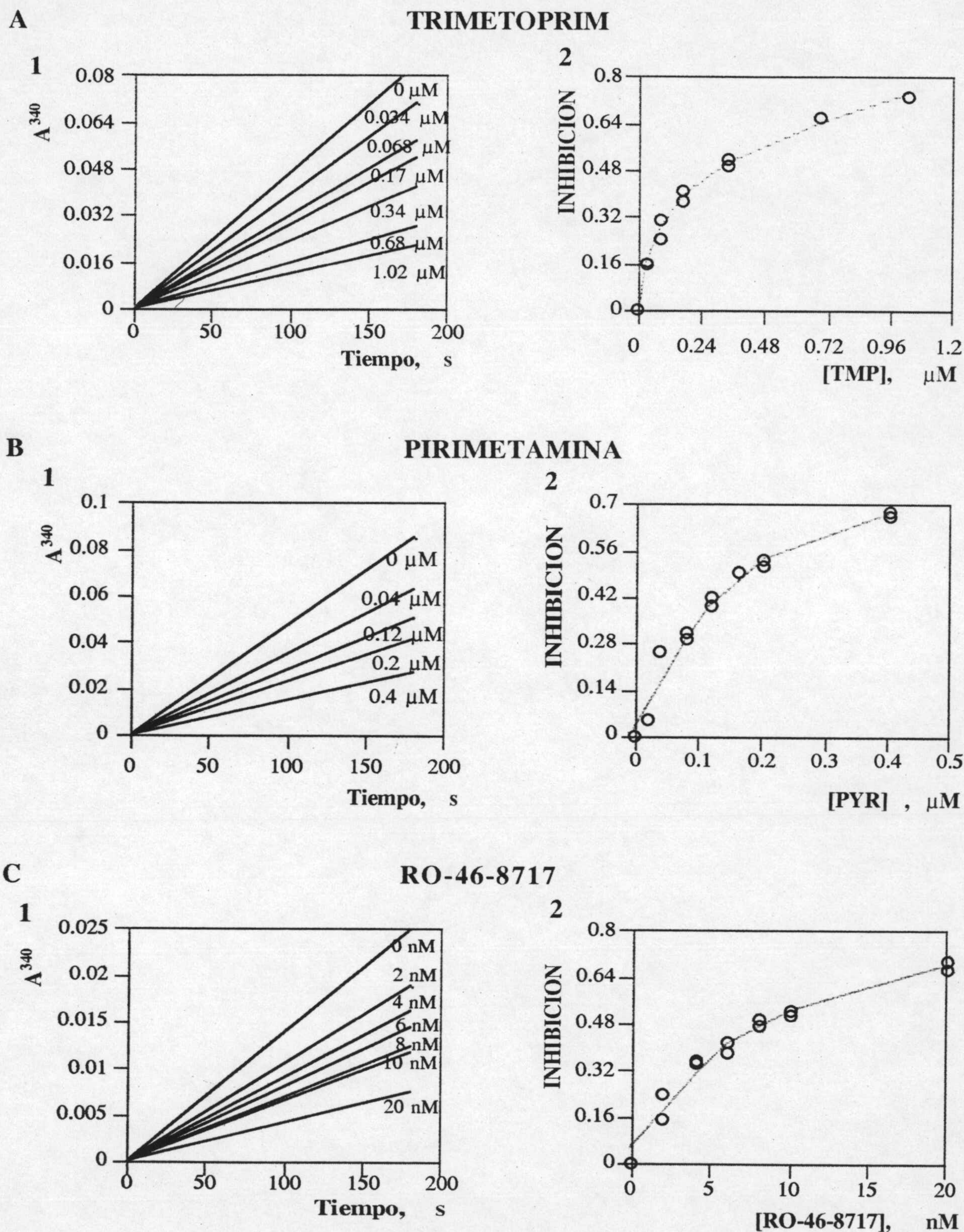


Figura IV.18. Progresiones correspondientes al efecto de varios inhibidores competitivos sobre la actividad DHFR y curvas de inhibición obtenidas a partir de ellas. A Trimetoprim; B Pirimetamina; C RO-46-8717. 1 Rectas de progresión; 2 curvas de inhibición. La concentración de enzima en los ensayos cinéticos fue de 1 nM y las concentraciones de dihidrofolato y NADPH se fijaron en entorno 15 μ M y 100 μ M. En las curvas de progresión aparecen las concentraciones de inhibidores ensayadas.

IV.13. ANALISIS DE LA INTERACCION DEL MTX CON LA DHFR-TS DE *T. CRUZI*.

IV.13.1. Determinación de la KI del MTX para el enzima bifuncional.

La determinación de la KI del MTX se hizo en base a experimentos en los que determinábamos las curvas de progresión de la actividad DHFR en presencia de diferentes concentraciones de MTX, manteniendo fijas y a concentraciones saturantes el H₂F y NADPH. Las curvas de progresión fueron bien diferentes a las obtenidas con inhibidores competitivos observándose un incremento de la inhibición a lo largo del tiempo de reacción (Fig. IV.19A).

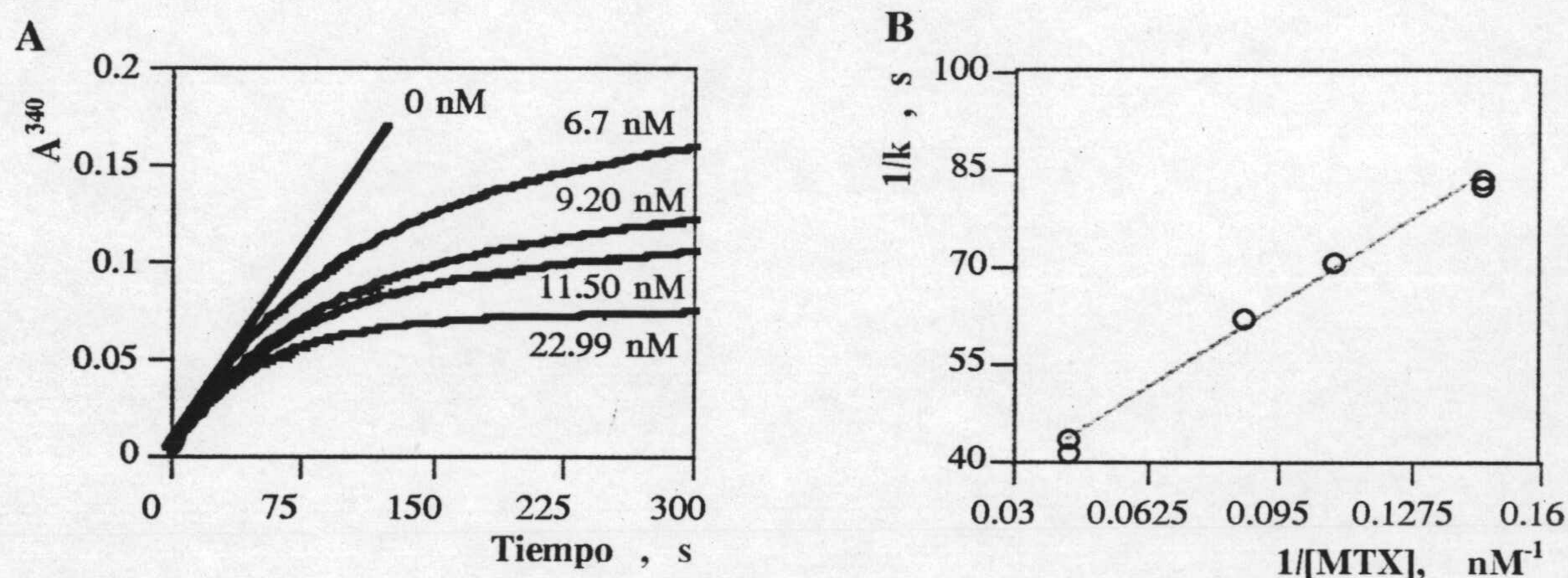
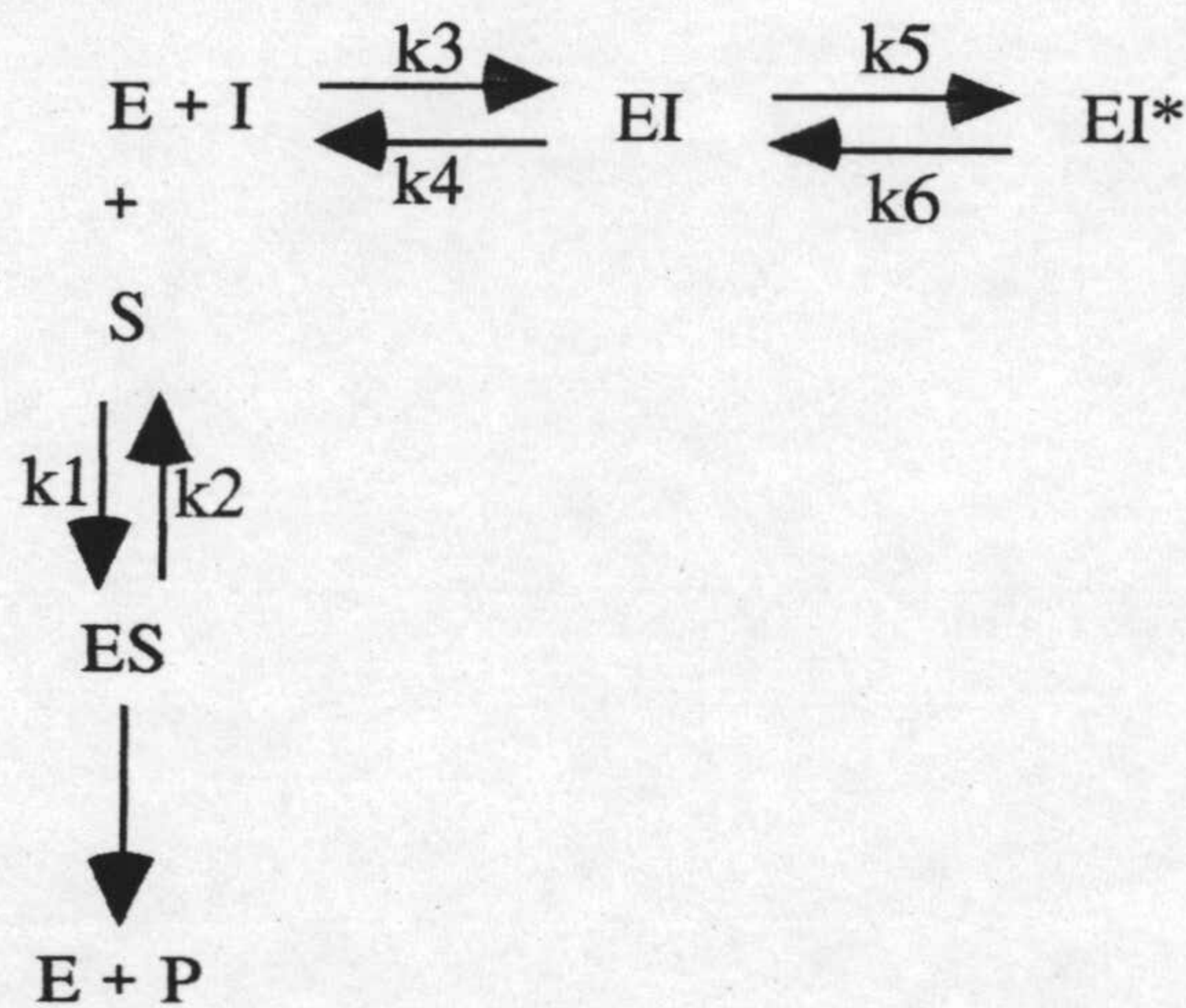


Figura IV.19. Análisis de la inhibición de la DHFR-TS por MTX. A. Curvas de progresión para la inhibición provocada por el MTX. Las curvas se obtuvieron según se describió en material y métodos (concentración saturante de los sustratos) adicionando las concentraciones de MTX indicadas en la figura. La concentración de enzima fue 0.85 nM. B Representación doble recíproca de la constante de pseudo-primer orden k frente a la concentración de MTX (Ecuación 12). Los valores representados se obtuvieron a partir de las regresiones no lineales de las curvas del panel 'A' a la ecuación 9. De la ordenada de la recta se obtuvo el valor para la k_5 (ordenada en el origen = $1/k_5$) y de la pendiente de las rectas calculamos la K_i de complejo inhibitorio inicial (Ecuación 10), tomando el valor de 1.2 para la K_m para del H₂F

Los inhibidores que presentan este tipo de comportamiento se denominan de unión lenta y se caracterizan porque el tiempo necesario para el establecimiento del equilibrio entre el inhibidor y el enzima ocurre lentamente con respecto a la escala de tiempo del estado estacionario de segundos a minutos (Willians y Morrison, 1988), lo que se traduce en una variación de la concentración del complejo enzima inhibidor durante el transcurso de la reacción. Este tipo de comportamiento no se observa con los inhibidores clásicos competitivos porque el equilibrio entre el enzima y el inhibidor se alcanza rápidamente, en la escala de los milisegundos.

Si observamos los curvas con mayor detenimiento observamos que son bifásicas con un segmento inicial en el que la inhibición es menor y otro segmento final en el que la inhibición se ha multiplicado. Este tipo de inhibición pudo describirse en base a un modelo que contempló en la formación rápida de un complejo enzima inhibidor inicial que sufría a continuación una lenta isomerización. La unión inicial del inhibidor es rápida pero débil, mientras que la isomerización aunque es lenta es fuerte provocando un incremento en la fuerza de unión del MTX y explicando la forma bifásica de las curvas (Morrison y Walsh, 1988). Esquemáticamente:



Mec. 3

Las constantes de velocidad correspondiente a la cinética de unión de MTX se obtuvieron a partir del análisis de las curvas de progresión siguiendo las ecuaciones deducidas por Morrison y Walsh (1988).

Las curvas de progresión fueron ajustadas mediante regresiones no lineales a la siguiente ecuación:

$$[NADPH] = v_f t - (v_f - v_i)(1 - e^{-kt})/k \quad (9)$$

que corresponde con a un proceso de pseudo-primer orden de constante de velocidad es k . v_i y v_f son las velocidades iniciales y finales del estado estacionario, y corresponden con las tangentes de los segmentos señalados en las curvas de progresión. Los valores de entrada en la ecuación 9 fueron el tiempo y la D.O. y las variables que obtuvimos a partir de la regresión fueron v_i , v_o , y k . La constante de inhibición para el complejo inicial, K_i , fue obtenida a partir de la pendiente de una representación de inverso de las constantes de pseudo-primer orden obtenidas frente al inverso de la concentración de MTX correspondiente (Fig.IV.19.B) de acuerdo a la ecuación 10.

$$1/k = 1/k_5 + \frac{K_i(1 + [H_2F]/K_m)}{k_5[MTX]} \quad (10)$$

K_m es la constante de Michaelis del H_2F .

Por último la constante de inhibición global del MTX, K_I , fue calculada de la siguiente expresión:

$$K_I = K_i k_6 / (k_5 + k_6) \quad (11)$$

en la que k_6 fue obtenido como una media de los valores obtenidos para cada curva de progresión de acuerdo la ecuación:

$$k_6 = k_{vf}/v_o \quad (12)$$

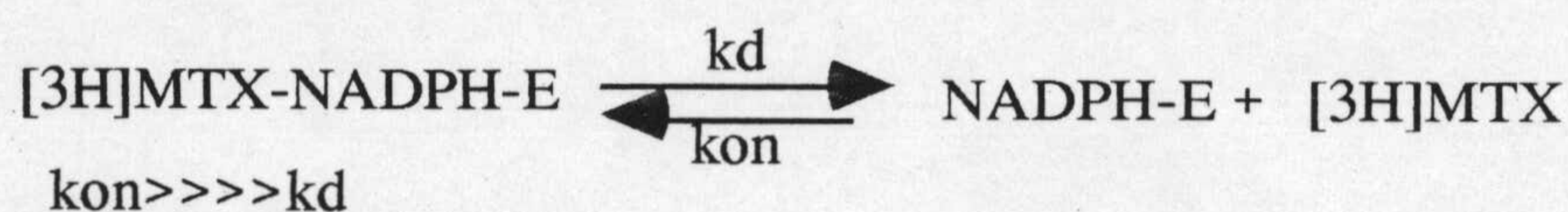
Como resultado de los calculos obtuvimos que la constante de inhibición para el complejo inhibitorio inicial correspondiente al enzima bifuncional era de 0.23 nM y la constante de inhibicion global fue de 4.9 pM. Por otro lado las constantes de velocidad directa, k_5 , e inversa, k_6 , para el proceso de isomerización del complejo ternario enzima-NADPH-MTX fueron respectivamente 2.7 min^{-1} y 0.051 min^{-1} .

IV.13.2. Deteminación de la velocidad de disociacion del MTX del complejo ternario DHFR-TS-NADPH-MTX: Estequiometría de unión.

En el apartado anterior hemos comprobado que la unión del MTX al enzima bifuncional DHFR-TS de *T. cruzi* ocurre en virtud de un proceso que contempla la isomerización de un complejo inhibitorio inicial. Esta isomerización se observa cláramente en la escala de tiempo correspondiente al estado estacionario. Sin embargo, la unión del MTX se puede analizar en una escala de tiempo superior en la que podemos considerar que la unión obedece a un proceso simple de primer de primer orden (Mec. 4). En estas condiciones podríamos determinar la constante de velocidad aparente de disociación del MTX del complejo ternario, k_d .

Para la determinación de la velocidad aparente de disociación del MTX del complejo ternario seguimos el procedimiento descrito en material y métodos (II.2.23), que consistía en la medida de la disminución con el tiempo de la radiactividad del complejo $[^3H]MTX-NADPH-DHFR$.

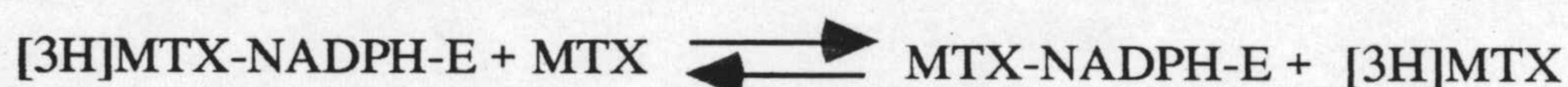
Cuando se incubaba el enzima con el $[^3H]MTX$ en presencia de NADPH se forma el complejo ternario $[^3H]MTX-NADPH-DHFR$ en virtud del equilibrio Mec. 4.



Mec. 4

El MTX es un inhibidor muy fuerte de la DHFR (estequiométrico) lo que determina que la constante de disociación aparente, k_d , es muy baja, y mucho menor que la constante aparente de asociación, k_{on} ($k_d \ll \ll k_{on}$) con lo que el equilibrio está totalmente desplazado hacia la derecha.

Si el complejo ternario radiactivo lo incubamos entonces con un exceso MTX frío, éste irá remplazando al metotrexato tritiado en virtud de este otro equilibrio:



Equilibrio que está desplazado hacia la derecha, de manera que se observa un recambio en el complejo ternario del MTX caliente por frío, mayor cuanto mayor es el tiempo transcurrido. Por otro lado, dado el exceso de MTX frío, la probabilidad de que una molécula de MTX tritiado que se ha disociado se vuelva a reasociar es muy pequeña, por lo que la disminución observada en la radiactividad del complejo se debe exclusivamente a la disociación del MTX del complejo ternario y la velocidad con la que ocurre se ajusta a un proceso de primer orden cuya constante de velocidad es k_d . Matemáticamente:

$$v = d[EI]/dt = -k_d[EI] \quad (13)$$

Donde $[EI]$ corresponde con la concentración del complejo ternario radiactivo. Integrando la ecuación 13 obtenemos la siguiente expresión:

$$\ln[EI] = \ln[EI]_0 - k_d \cdot t \quad (14)$$

en la que $[EI]_0$ corresponde con la concentración de $[^3H]MTX-NADPH-DHFR$ antes de agregar MTX frío. En la práctica $[EI]$ es directamente proporcional a las dpm y por ello la ecuación 14 puede sustituirse por la siguiente:

$$\ln(dpm) = \ln(dpm_0) - k_d \cdot t \quad (15).$$

que representa la ecuación de una recta del $\ln(dpm)$ frente a tiempo, con pendiente negativa k_d y dpm_0 corresponde con la radiactividad inicial del complejo ternario antes de agregar el MTX frío.

Nuestros datos experimentales representados como $\ln(\text{dpm})$ frente al tiempo se ajustaron bastante bien a la ecuación de una recta (Fig.IV.20) lo que nos permitió obtener un valor de k_d de 0.034 min^{-1} .

Por otro lado, a partir de la radiactividad del complejo ternario a tiempo 0 calculamos la estequiometría de unión del MTX al enzima bifuncional. Cuando hicimos estos calculos teniendo en cuenta la eficacia del contaje, la concentración de enzima en el experimento, y la actividad específica del MTX radiactivo obtuvimos que 0.8 moles de MTX se unían a 1 mol de enzima dimerico, es decir salvando posibles errores experimentales la estequiometría de unión fue 1:1.

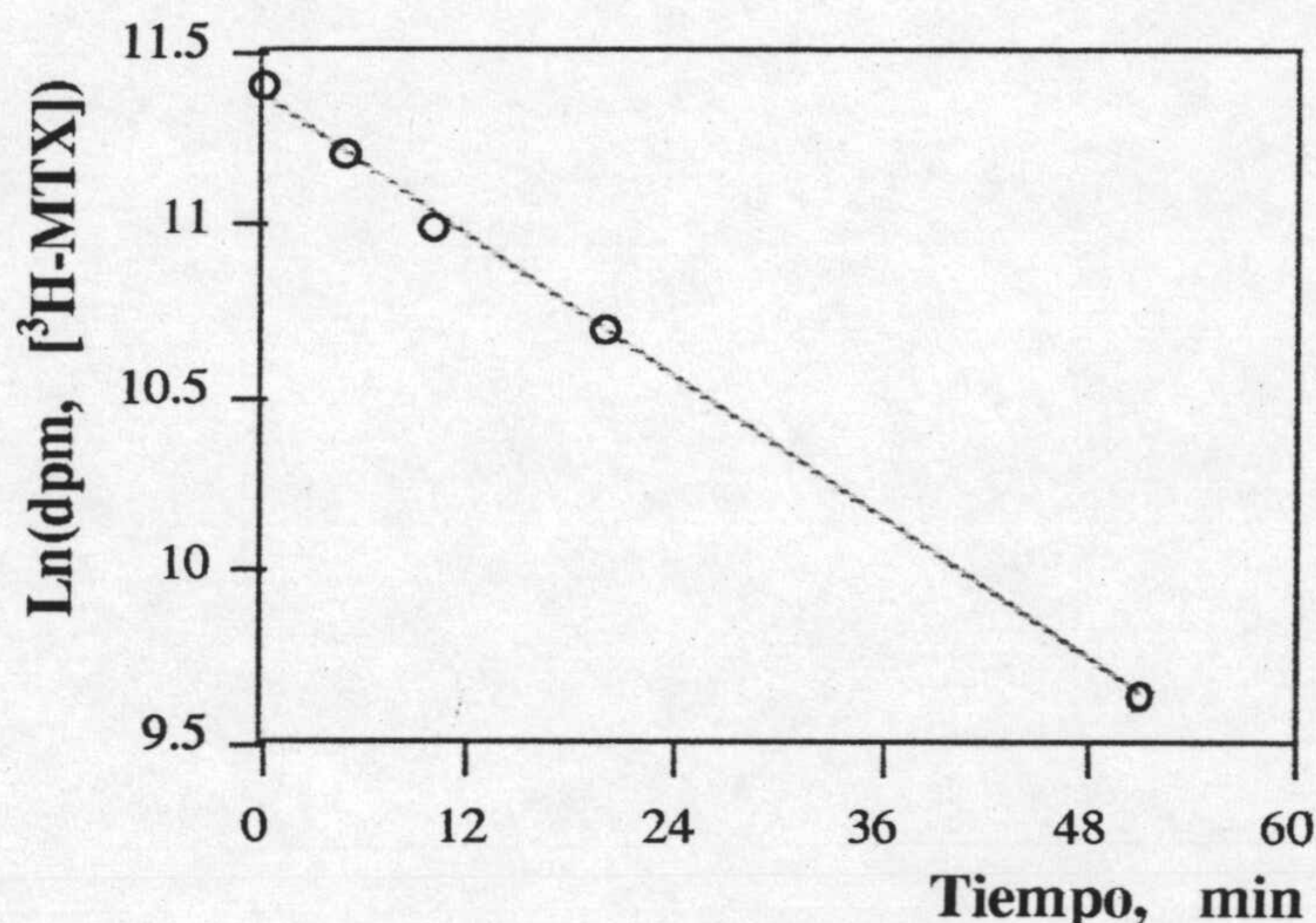


Figura IV.20. Velocidad de disociación del MTX del complejo ternario E-NADPH-MTX. Los experimentos se realizaron según se describió en material y métodos II.2.23. La concentración de enzima bifuncional fue 16.9 nM .

II.14. EXPRESION DEL DOMINIO DHFR DEL ENZIMA BIFUNCIONAL DHFR-TS DE *T. CRUZI*.

El carácter bifuncional del enzima DHFR-TS nos motivó a intentar expresar cada uno de los dominios individualmente. A continuación describimos los resultados que obtuvimos para el caso del dominio DHFR. Para el dominio TS seguimos una estrategia paralela cuya descripción hemos obviado por no obtener resultados positivos.

Basandonos en la homología y en predicciones de la estructura secundaria de la DHFR-TS de *T. cruzi* consideramos que el dominio DHFR se extendía entre la Met1 y la Asn234 (Fig.IV.6). Esta región fue amplificada mediante PCR utilizando como DNA plantilla 250 ng del plásmido pTC4.4 y como cebadores los oligonucleótidos ON3 y ON5. pTC4.4 era una

construcción derivada del pUC18 que contenía un inserto EcoRI-PstI de 4.4 kb procedente del clon genómico pRTS-1. El oligonucleótido ON3 fue el mismo que el empleado en la amplificación de la secuencia completa de la DHFR-TS, mientras que ON5 estaba basado en los en la secuencia de los residuos 232-234, apareaba en la cadena no codificante y porta un triplete CTA que produce un codon de terminación tras la Asn234 seguido de un sitio de restricción PstI para facilitar el posterior clonaje (Fig. IV.21).

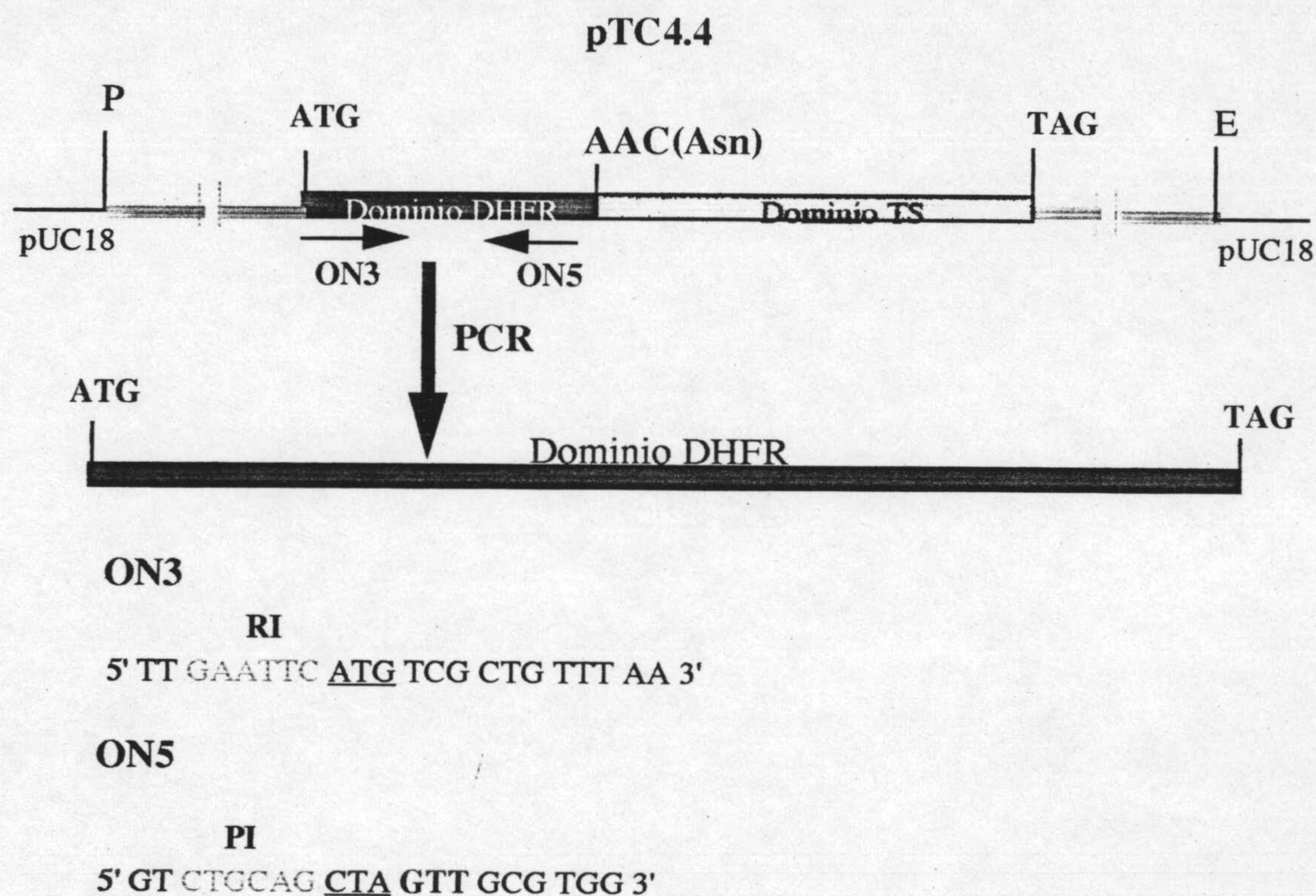


Figura IV.21. Estrategia seguida para la amplificación y posterior expresión del dominio DHFR del enzima bifuncional DHFR-TS de *T. cruzi*. El esquema muestra la secuencia de los oligos empleados en la amplificación del dominio. En rojo aparecen las dianas EcoRI y PstI agregadas a los extremos 5' de los cebadores ON3 y ON5. En negrita se ha destacado en el cebador ON4 el triplete que origina la Asn 234 elegida como último aa del dominio DHFR. Subrayadas aparecen la secuencias correspondientes al triplete que origina el codon de terminación en el cebador ON5 y el codon de iniciación en el cebador ON3. P, PstI, E, EcoRI.

La reacción de PCR amplificó un único producto de aproximadamente 700 pb que fue purificado de un gel agarosa, digerido con EcoRI y PstI y clonado en pKK223.3 dando el plásmido pKTCD. pKTCD fue propagado inicialmente en *E. coli* XL1-Blue, y la autenticidad de la construcción fue verificada mediante análisis de restricción y secuenciación. El plásmido fue entonces usado para transformar varias cepas de *E. coli*, en donde la expresión fue comprobada tras inducir con IPTG cuando la cepa así lo requería. Los ensayos cinéticos revelaron actividad DHFR en los extractos solubles de cada una de las cepas transformadas (Tabla IV). Sin embargo,

los niveles de expresión fueron bastantes bajos (menores del 1%) y los geles desnaturalizantes SDS-PAGE sólo mostraron una banda del tamaño apropiado en *E. coli* TG1 RecO, después de la inducción con IPTG (Datos no mostrados). Además la expresión decrecía notablemente después de la primera transformación según las células envejecían, sufriendo la actividad DHFR variaciones superiores al 50%.

Tabla IV. Expresión del dominio recombinante DHFR de *T. cruzi*.

Cepa <i>E. coli</i> .	Vector	Inducción IPTG	(Umg ⁻¹)
PA414	pKTCD	No	~150
χ2913	pKTCD	No	~100
JM105	pKTCD	Si	~150
TG1RecO	pKTCD	Si	~200

IV.15. PURIFICACION DEL DOMINIO DHFR DE *T. CRUZI*.

El dominio DHFR del enzima bifuncional DHFR-TS de *T. cruzi* fue purificado a homogeneidad a partir de los extractos celulares solubles correspondiente a células *E. coli* PA414 y TG1 RecO transformadas con la construcción pKTCD. La purificación fue realizada en las mismas condiciones las descritas para el enzima bifuncional de *T. cruzi*, aunque fue necesaria una cromatografía adicional bien de intercambio aniónico en una columna mono-Q o de exclusión molecular en una columna de superosa (II.2.19 y II.2.20). En ambos caso el rendimiento de la purificación fue similar.

Para el caso en el que hicimos un intercambio aniónico en una columna mono-Q obtuvimos alrededor de 170 µg de proteína pura (Fig. IV.22) lo que supuso una recuperación del 13% del enzima recombinante total (Tabla V).

La actividad específica de la proteína purificada giró entorno las 37000 Umg⁻¹ cuando para las determinaciones se diluía en tampón TDE1x, semejante a la obtenida para la enzima bifuncional

Tabla V. Purificación del dominio DHFR de *T. cruzi*.

Etapa	Proteína total ^a (mg)	act.espc (Umg ⁻¹)	Unid. totales	Purif. (x-veces)	Rend. ^b
Crude extract	1218	42	51200		
MTX-Sepharose	0.8	17000	14000	405	27.3%
Mono-Q	0.17	37700	6500	900	13%

a A partir de 2 litros de cultivo

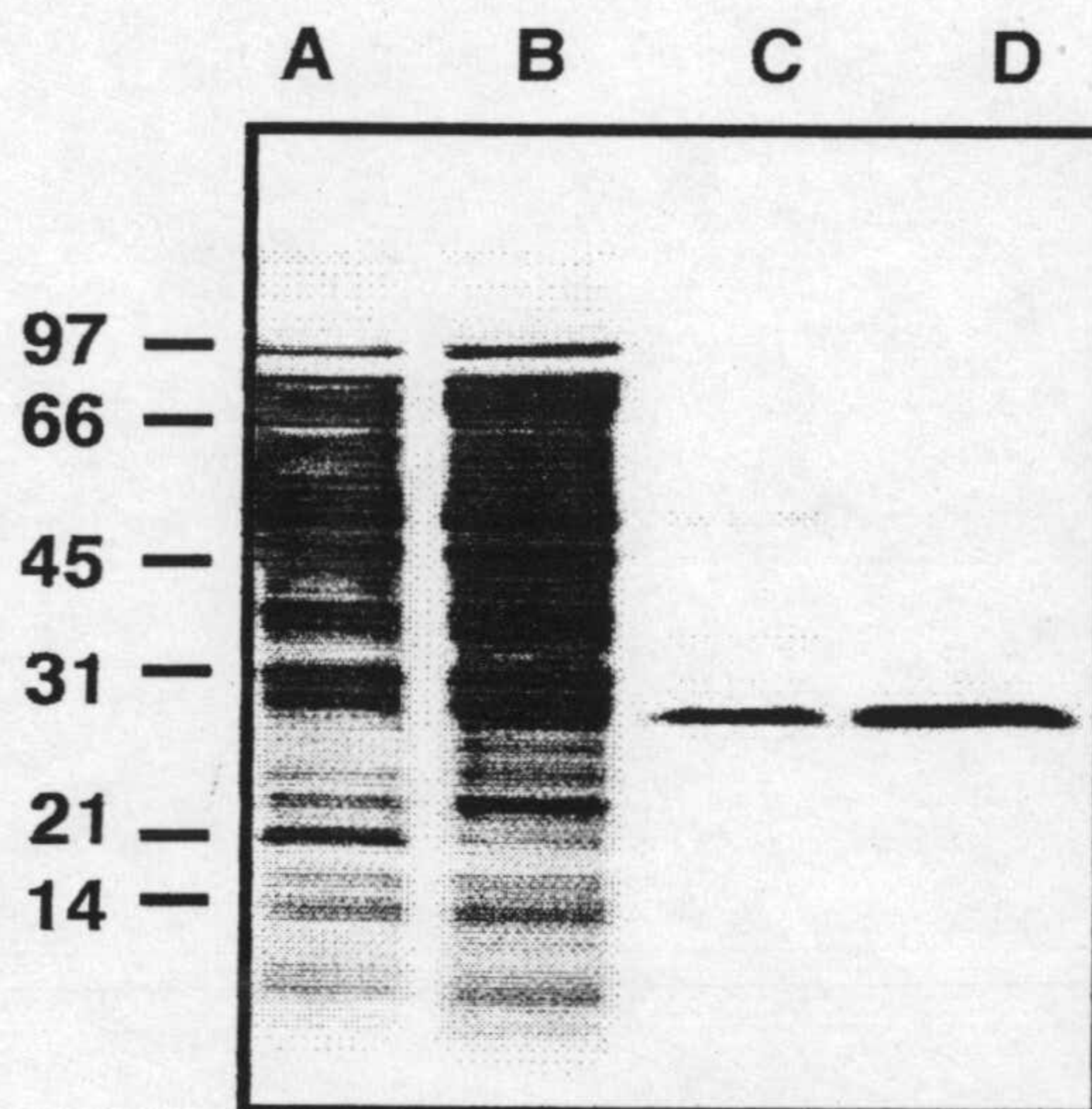


Figura IV.22. Purificación del dominio recombinante DHFR de *T. cruzi* expresado en *E. coli* PA414. Gen desanturante de SDS en poliacrilamida al 10% teñido con Coomassie R250. A) 20 µg extracto soluble crudo; B) 20 µg del mismo extracto tras haber sido recirculado varias veces por la columna de MTX-sefarosa; C) 1 µg de proteína purificada tal como sale de la columna de MTX-sefarosa; D) 1 µg del dominio DHFR purificado tras una cromatografía adicional en una columna mono-Q.

IV.16. PROPIEDADES FISICO QUIMICAS DE DOMINIO DHFR DE *T. CRUZI*.

Al igual que hicimos con la proteína bifuncional determinamos varias propiedades teóricas y experimentales relacionadas con la estructura del dominio DHFR.

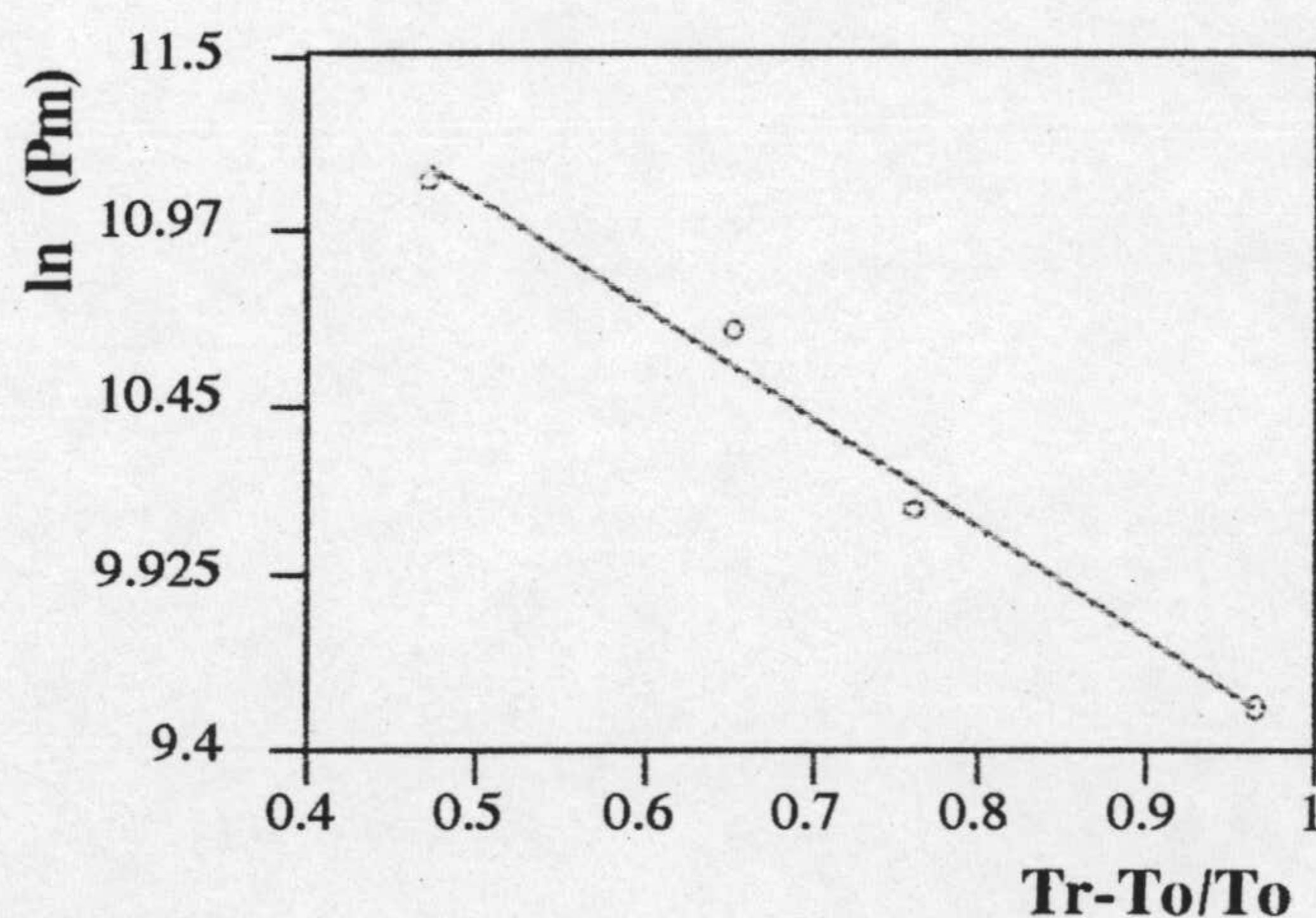
IV.16.1. Estabilidad de la proteína del dominio DHFR de *T. cruzi*.

El dominio DHFR fue muy estable lo mismo que ocurrió con el enzima bifuncional. No hubo pérdida de actividad tras largos periodos de incubación a T_a ambiente y la congelación tampoco afectó a la estabilidad de la proteína, incluso tras repetidos ciclos de congelación descongelación. Adicionalmente la siguió un comportamiento paralelo al enzima bifuncional en cuanto a la inactivación sufrida por dilución. Cuando el dominio DHFR era diluido a concentraciones inferiores a $0.006 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ hubo una desestabilización del enzima que fue cancelada con la adición de PEG o glicerol al tampón de dilución en una concentración final del 8%.

IV.16.2. Determinación del pm de la proteína del dominio DHFR de *T. cruzi*.

El pm del dominio DHFR determinado a partir de geles desnaturizante de poliacrilamida fue de 27 kD (Fig. IV.22). Lo cual corresponde básicamente con el obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos (25768 D).

El pm molecular de la proteína fue determinado también en estado nativo para lo cual realizamos una cromatografía de exclusión molecular en una columna de Superosa-12 (Fig. II.23B). El pm de la proteína fue obtenido por extrapolación en una recta de calibración construida con los tiempos de retención (t_R) correspondientes a varias proteínas de pm molecular conocido que fueron inyectadas en la columna en las mismas condiciones en las que lo fue muestra proteína (Fig. IV.23A). En concreto representamos $\ln pm$ us $(t_R - t_0)/t_0$, donde t_R es el tiempo de retención de la proteína cuyo pm representamos y t_0 es tiempo elución del frente que equivale al tiempo de elución del azul dextrano que se inyecta junto las muestras (Ver material y metodos II.2.20). En estas condiciones obtuvimos que el pm de el dominio DHFR de *T. cruzi* fue de 19900.



IV.17. CARACTERIZACION CINETICA DEL DOMINIO DHFR DE *T. CRUZI*.

IV.17.1. Dependencia de la velocidad DHFR frente al pH.

La dependencia de la actividad DHFR fue analizada en base a experimentos en los que se determinaba la actividad DHFR en tampón DHFR1x a distintos pHs. El resultado indicó que la actividad máxima se alcanzaba entorno pH 6 y además se observó una pérdida de actividad muy acusada a pH elevados.

IV.17.2 Dependencia de la actividad frente a la concentración de ClK.

El ClK afectó en gran medida al DHFR observándose una actividad máxima entre concentraciones de ClK de 0.1 M y 0.25M. La actividad a estas concentraciones de ClK duplicó la del enzima en el tampón convencional DHFR.

IV.17.3. Determinación de la k_{cat} y las K_m s para el H₂F y el NADPH.

El dominio DHFR de *T. cruzi* exhibió un comportamiento michaeliano de la velocidad de reacción frente a cada una de los sustratos (Fig.IV.24), por lo que determinamos las K_m s y k_{cat} de acuerdo a las ecuaciones que empleamos para el caso del enzima bifuncional (IV.11.2).

Los parámetros cinéticos obtenidos para la proteína del dominio fueron similares a los obtenidos para la actividad DHFR del enzima bifuncional, resultando la K_m para el H₂F de 0.74 ± 0.06 y la K_m para el NADPH. Por otra parte la k_{cat} fue de $16.4 \pm 0.7 \text{ s}^{-1}$, valor que fue calculado con el pm teórico obtenido de la secuencia. La tabla VI resume los parámetros obtenidos para el dominio

Tabla VI. Parámetros cinéticos correspondientes a la proteína del dominio DHFR de *T. cruzi*.

Sustrato	$K_m(\mu\text{M})$	$k_{cat}(\text{s}^{-1})$	$k_{cat}/K_m (\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1})$
H ₂ F	0.74 ± 0.06	16.7 ± 0.2	23
NADPH	15 ± 2	16.2 ± 0.5	1.1

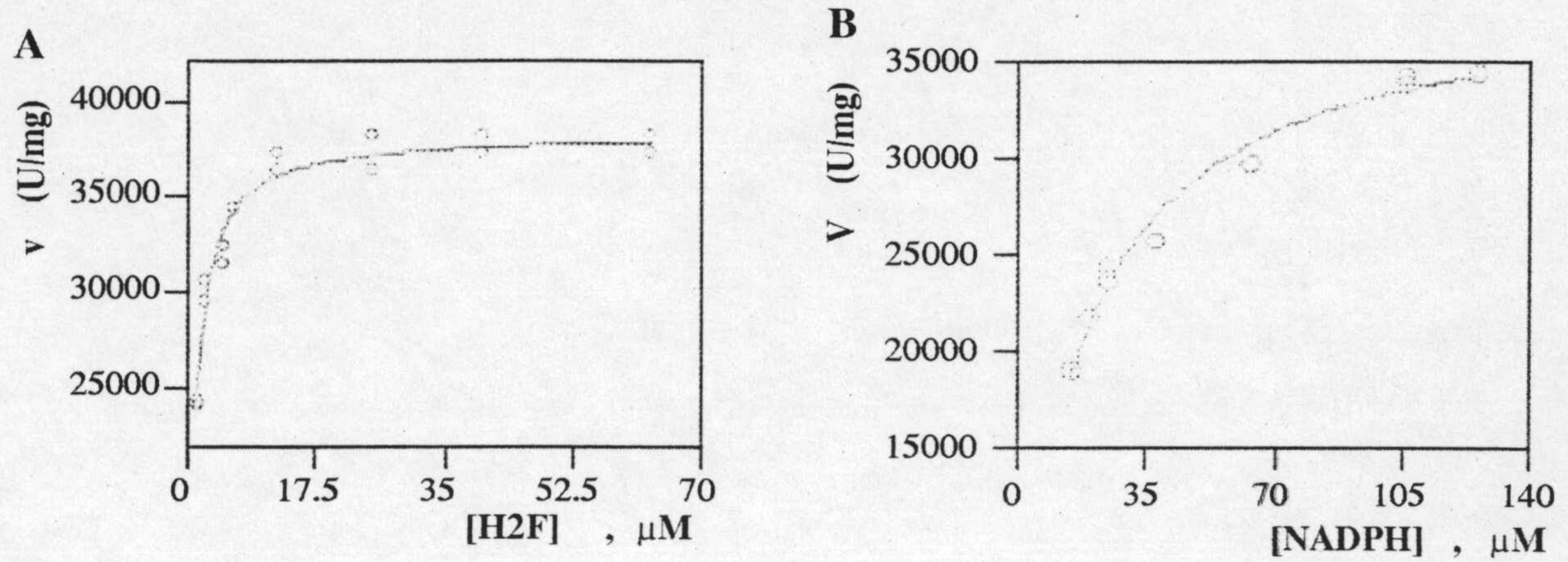
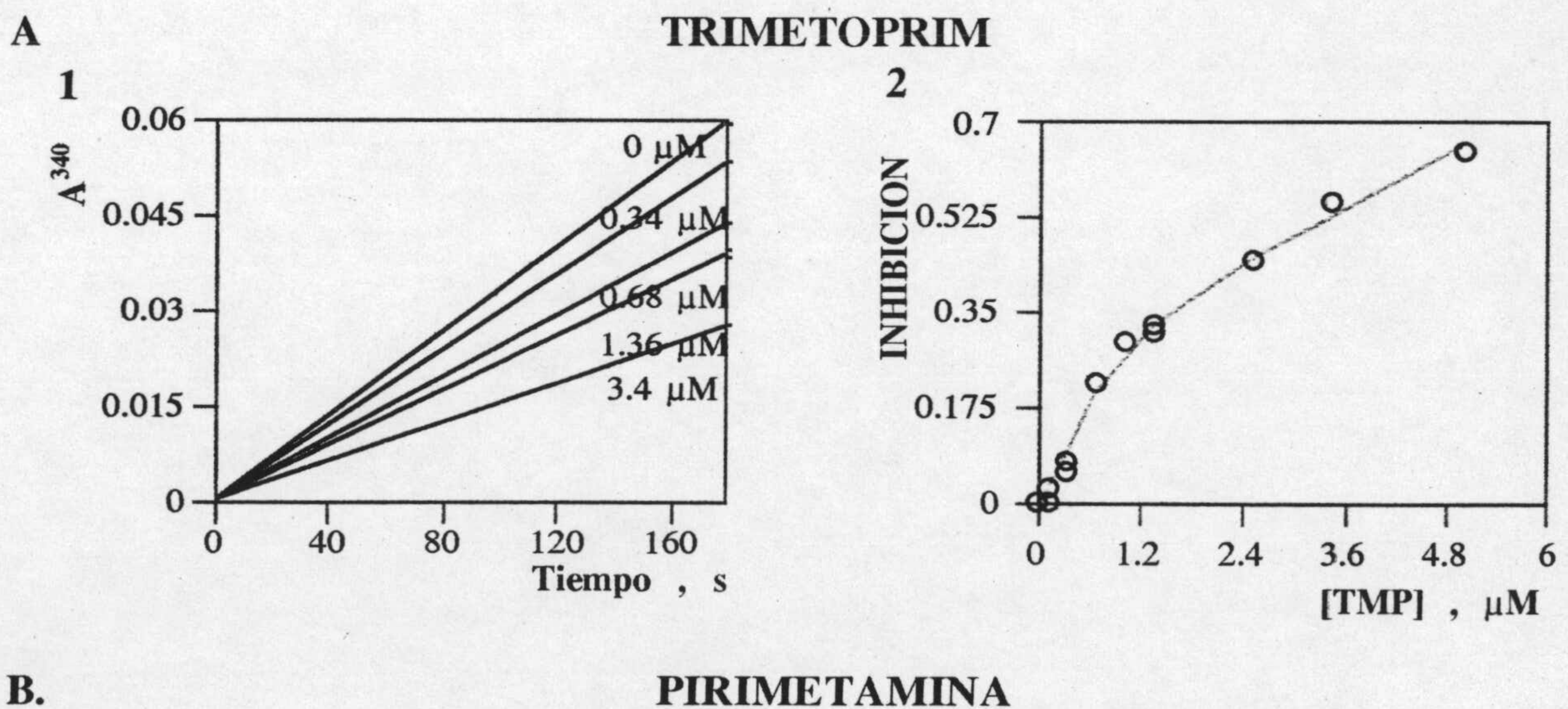


Figura IV.24. Variación de la actividad DHFR del dominio frente la concentración de sustrato. En rojo los ajustes de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten. A [NADPH] fija=100 μM; Se varió la concentración de H₂F. B [H₂F] fija = 100 μM. Se varió la concentración de NADPH.

IV.18. ANALISIS DE LA INHIBICION DEL DOMINIO DHFR DE *T. CRUZI* POR TMP, PYR Y RO-46-8717: CALCULO DE LAS CONSTANTES DE INHIBICION.

La inhibición provocada por los antifolatos arriba citados fue de tipo competitivo clásico (Fig.IV.25), tal como ocurrió con la enzima bifuncional, por lo que se aplicaron las ecuaciones descritas en el apartado IV.13. Brevemente se obtuvieron las I₅₀ a partir de las curvas de inhibición, y con los valores obtenidos se calcularon las K_i aplicando la ecuación 7. Los valores correspondientes a las K_i junto con las I₅₀ aparecen reflejados en la tabla VIV.



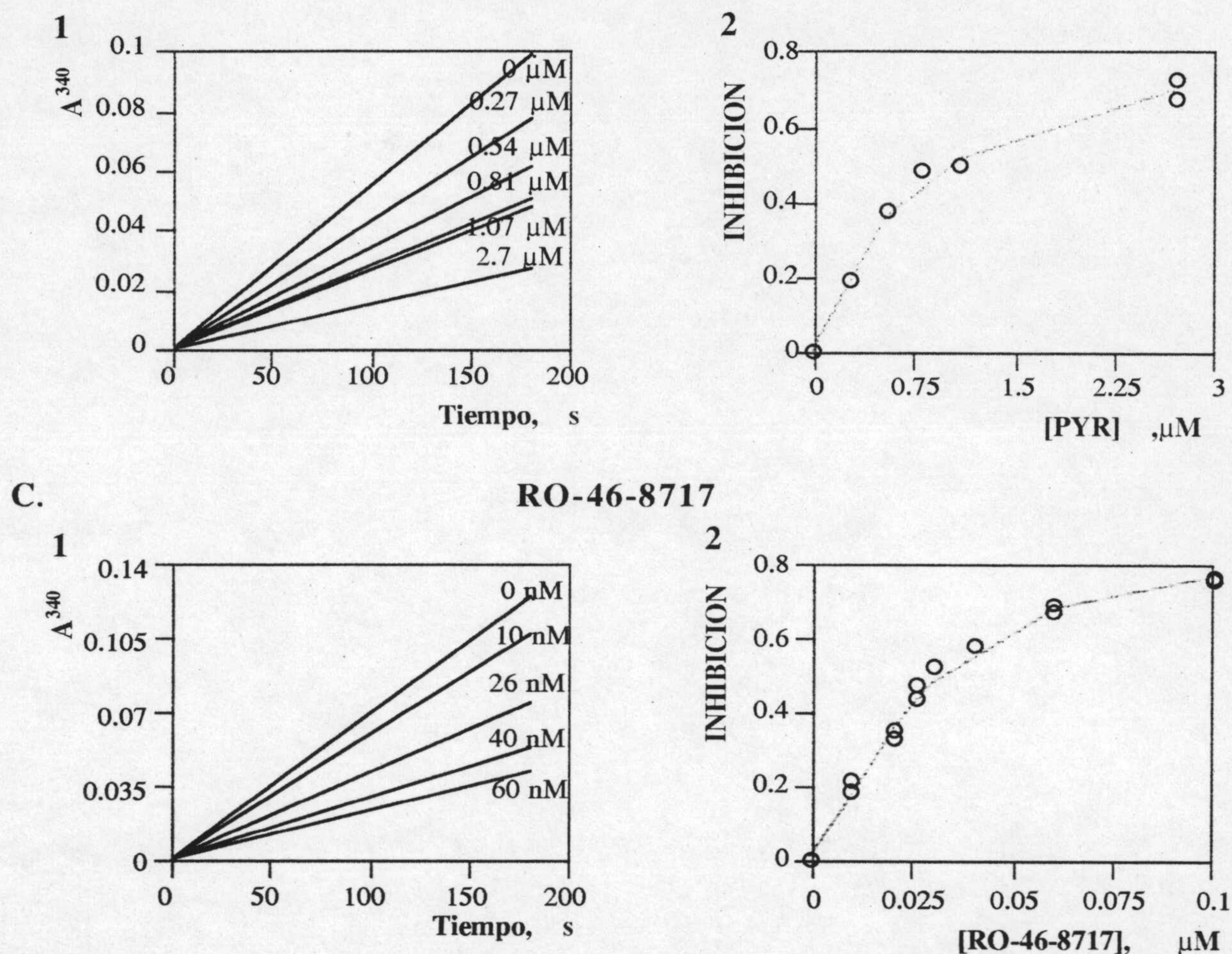


Figura IV.25. Análisis de la inhibición del dominio DHFR de *T. cruzi*. A. Timetoprim. 1 B. Pirimitamina. C. RO-46-8717. Los paneles con el número representan las rectas de progresión. Se ha indicado la concentración de inhibidor a la que se obtuvo cada recta. Los paneles dos corresponden con el grado de inhibición sufrido por el enzima frente la concentración de inhibidor. Los ensayos fueron realizados según se describe en material y métodos.

Tabla IV. K_i e I_{50} para el Tmp, Pyr y RO-46-8717 correspondientes a la proteína del dominio DHFR de *T. cruzi*.

Inhibidor	Tipo	K_i (nM)	I_{50} (μ M)
Trimetoprim ^a	Competitivo	150	3.0
Pirimetamina ^b	Competitivo	67	1.5
RO-46-8717 ^c	Competitivo	3.5	0.09

a. $H_2F = 12.6 \mu M$, b. $H_2F = 14.08 \mu M$, c. $H_2F = 18.4 \mu M$. $K_m[H_2F] = 0.74 \mu M$.

IV.19. ANALISIS DE LA INTERACCION DEL MTX CON EL DOMINIO DHFR DE *T. CRUZI*.

IV.19.1. Determinación de la KI del MTX para el dominio DHFR de *T. cruzi*.

Las curvas que obtuvimos para la inhibición de del dominio DHFR cuando iniciabamos la reacción con enzima fueron semejantes a las obtenidos con el enzima bifuncional (Fig.IV.25), por ello la determinación de la KI se hizo en base a el análisis de las curvas de progresión siguiendo las ecuaciones deducidas por Morrison y Walsh (1988) descritas en el apartado IV.13. Brevemente, a partir de las curvas de progresión obtuvimos la constante de pseudo-primer orden, k , que en una representación doble recíproca frente a la concentración de MTX nos permitió determinar la constante de inhibición del complejo inicial, K_i , y la constante de isomerización directa del complejo, k_5 . Con el valor de K_i y la k_6 (12) determinada a partir de las curvas de progresión calculamos la KI del MTX (11) (Fig.IV.26).

La constante de inhibición del MTX del complejo inicial fue de 0.4 nM, mientras que la constante de inhibición global fue de 9.3 pM. Por otro lado las constantes de velocidad directa e inversa del proceso de isomerización del complejo enzima-MTX fueron de 4.7 min^{-1} para k_5 y 0.11 min^{-1} para k_6 .

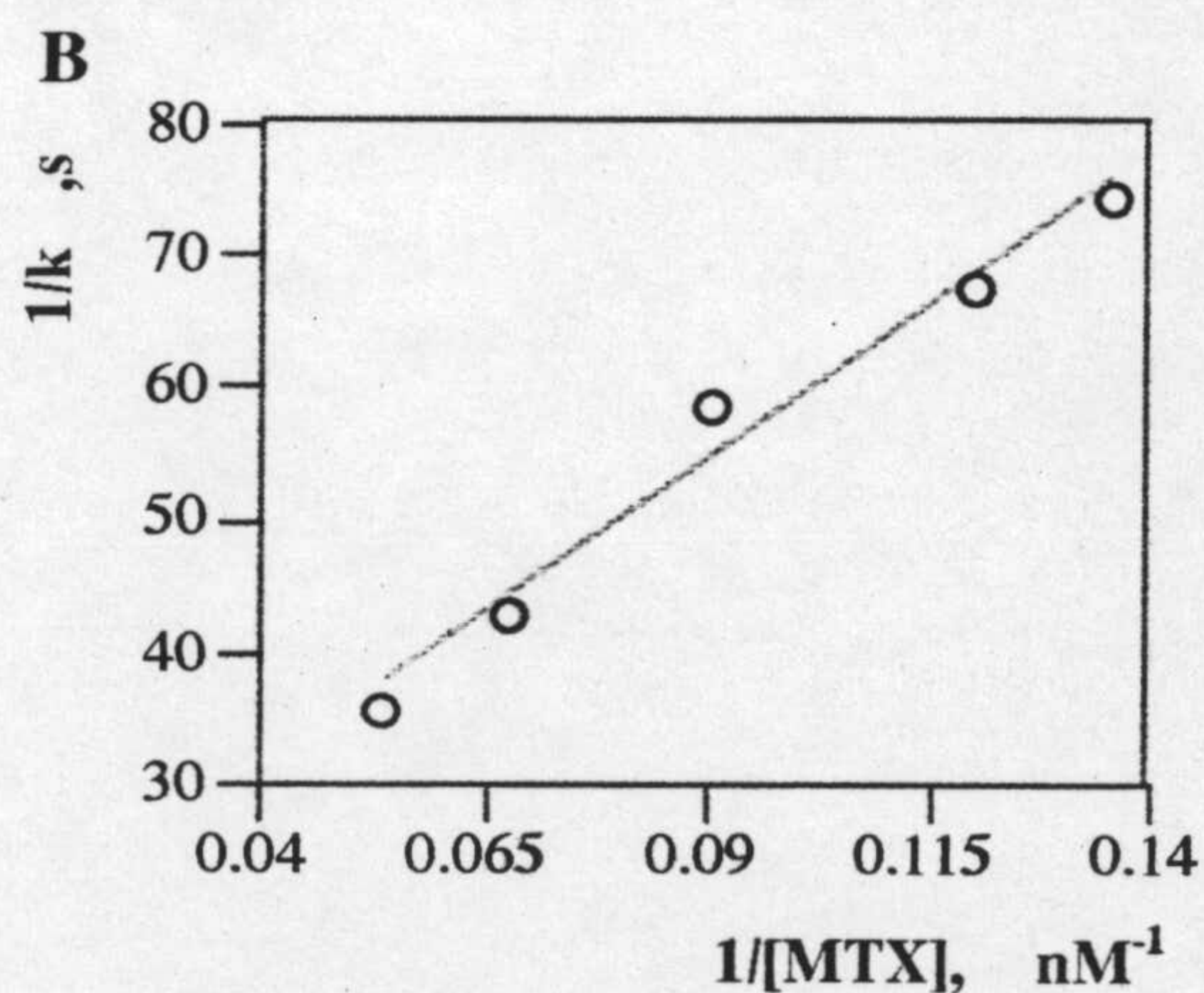
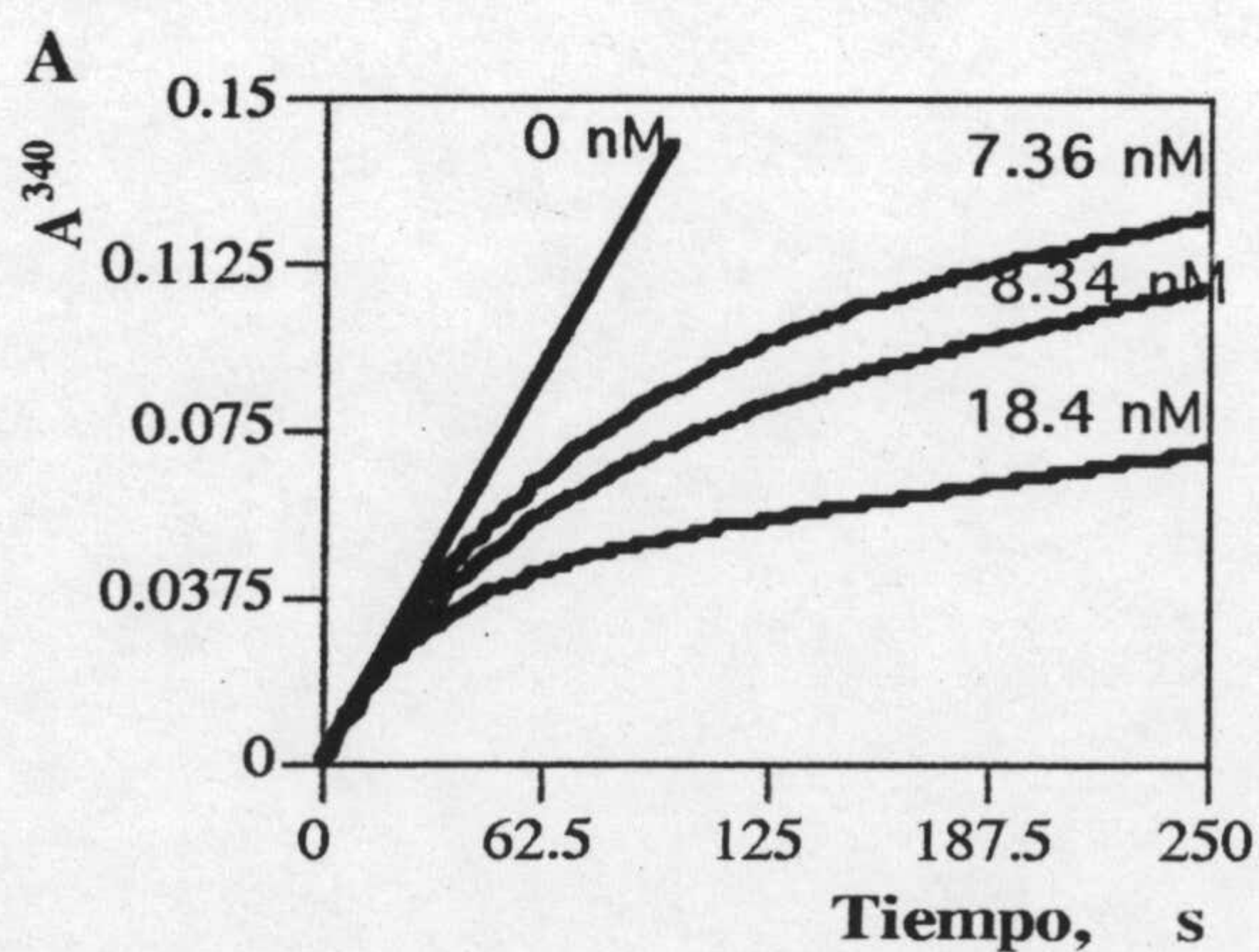


Fig.IV.26. *Análisis de la inhibición del dominio DHFR por el MTX.* A. Curvas de progresión obtenidas a diferentes concentraciones del inhibidor. B. Representación doble recíproca de k obtenida a partir de las curvas de progresión del panel A frente a la concentración de MTX.

IV.19.2. Determinación de la velocidad aparente de disociación del MTX del complejo ternario: Estequiometría de unión.

La velocidad aparente de disociación del MTX del complejo ternario fue calculada a partir de experimentos en los que se obtuvo el complejo ternario radiactivo con $[^3\text{HMTX}]$ y a continuación se observó como disminuía la radiactividad del complejo con el tiempo cuando se incubaba con MTX no radiactivo. Las condiciones que se siguieron se describieron en material y métodos (II.2.23) y el resultado se analizó en base a las ecuaciones que fueron empleadas para el enzima bifuncional (IV.13.2). El resultado de los experimentos se refleja en la gráfica IV.27, de cuya pendiente determinamos que la constante de velocidad aparente de la disociación del MTX, k_d , es de 0.40 min^{-1} .

Con el valor correspondiente a la radioactividad del complejo a tiempo 0 (antes de agregar MTX frío) determinamos que un mol de MTX se unía a un mol del dominio DHFR, resultando pues una estequiometría 1:1.

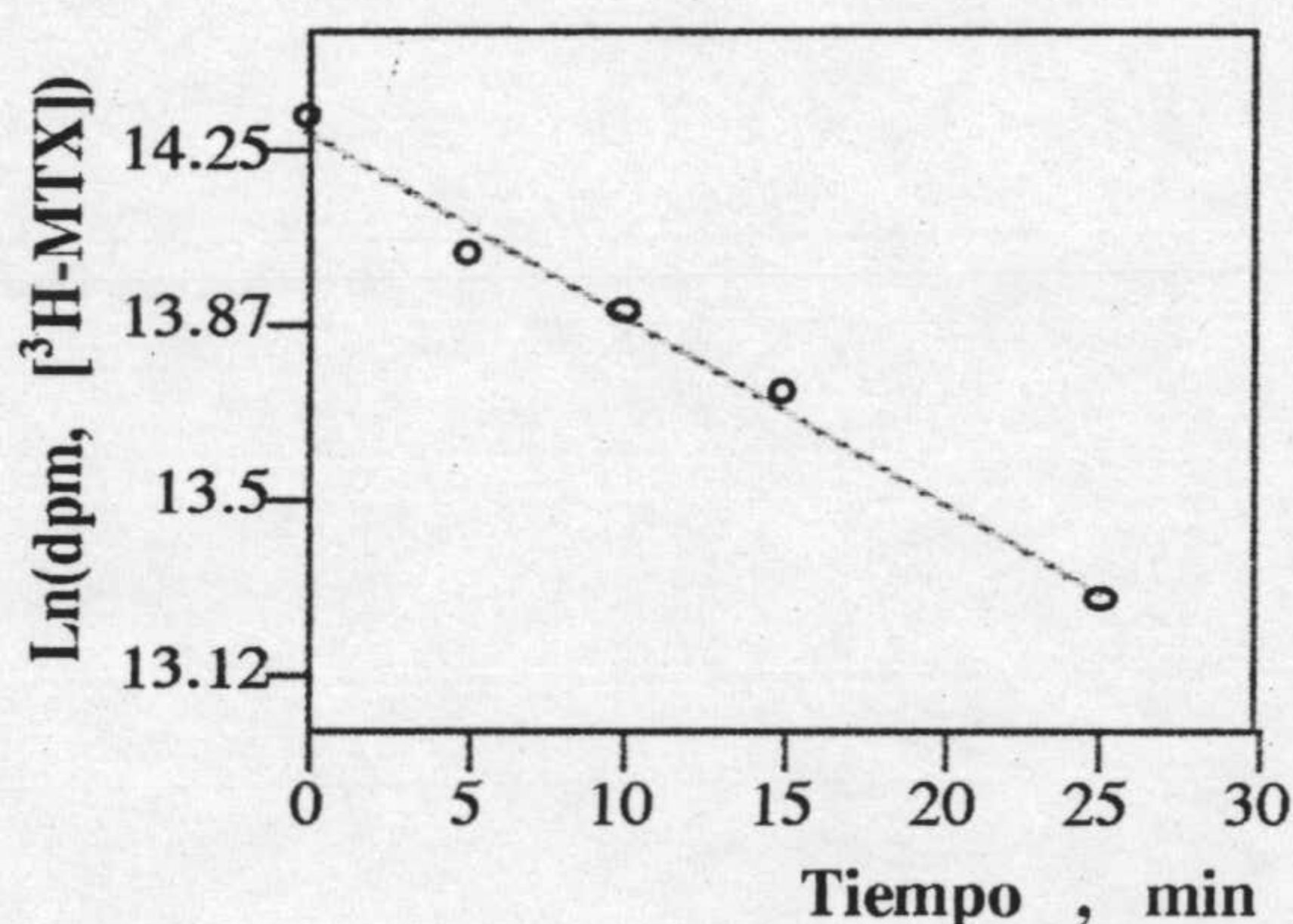


Figura IV.27. *Velocidad de disociación del MTX del complejo ternario MTX-NADPH-Dominio DHFR.* La concentración de enzima correspondiente a cada punto en la gráfica fue de $0.20 \mu\text{M}$. Condiciones del experimento en material y métodos (II.2.23).

V. DISCUSION

El interés del grupo cuyo seno se ha realizado este trabajo se centra en el estudio enzimas blanco de acción de fármacos como una de las posibles vías para el desarrollo de agentes terapéuticos frente enfermedades protozoarias. Por ello desde un principio la razón de este trabajo fue la caracterización de la DHFR-TS de *T. cruzi*. No obstante, hasta que se dispone de la proteína hay un largo camino que recorrer que implica la utilización de la potente herramienta que representa la biología molecular. Este paso a obligado a través del campo de los ácidos nucleicos nos ha posibilitado la caracterización del gen que codifica para la DHFR-TS.

La biología molecular de los protozoos parásitos es fascinante y revela numerosas peculiaridades que justifican "per se" los esfuerzos realizados en la caracterización del gen. A este interés se suma el hecho de que son muy pocos los genes caracterizados en *T. cruzi*. Por otro lado el análisis de los resultados obtenidos nos permitirá discutir la biología molecular de los protozoos parásitos y en particular de *T. cruzi*.

V.1. ORGANIZACION DEL GEN DE LA DHFR-TS EN *T. CRUZI*: PLOIDIA Y KARIOTIO

Los resultados correspondientes a las digestiones de DNA genómico de *T. cruzi* con enzimas con un sólo punto de corte en la secuencia del gen de la DHFR-TS, sugieren que es de copia única (III.5.1), en contraste con lo descrito para la mayor parte de los genes, que se encuentran repetidos, organizados en tandem de repetición. Los genes de las DHFR-TSs para otros protozoos relacionados se encuentra por lo general también en copia única. Este es el caso de *Leishmania tropica* (Datos no publicados) y *P. falciparum* (Snewin y col., 1989). Un caso especial lo representa la enzima bifuncional DHFR-TS de *L. major*. La cepa salvaje de *L. major* tan sólo presenta una copia del gen, sin embargo bajo la presión ejercida por MTX Coderre y col. (1983) seleccionaron individuos resistentes que super expresaron la enzima como consecuencia de una amplificación del gen de la DHFR-TS. Estudios posteriores (Beverley y col., 1984; Beverley y col., 1991; Washtien y col., 1985; Garvey y col., 1986; Hightower y col., 1987) mostraron que el efecto se reproducía con inhibidores de la TS y que lo que ocurría era que un fragmento de 30 a 40 kb, perteneciente al cromosoma 3 y conteniendo el gen de la DHFR-TS, se replicaba y recircularizaba para dar un elemento extracromosómico denominado región R. Elemento que era capaz de sufrir replicación autónoma y de adquirir estabilidad mitótica tras una continuada presión selectiva. En cambio, en *T. cruzi* no se ha descrito un fenómeno de estas características.

Cuando resolvimos los cromosomas de *T. cruzi* mediante electroforesis de campo pulsado e hibridamos el gel transferido a nylon con una sonda codificante para la DHFR-TS obtuvimos que hibridaban dos bandas de 0.99 y 1.04 Mb (III.5.2). Este resultado admite dos explicaciones: o bien la doble banda representan cromosomas homólogos y *T. cruzi* es como mínimo diploide para este gen, o, la población es heterogénea y han ocurrido extensos reagrupamientos de los cromosomas. Sin embargo, casando estos resultados junto a los que indicaban que el gen es de copia única pensamos que *T. cruzi* es diploide para el gen de la DHFR-TS y que éste se localiza en dos cromosomas homólogos que exhiben polimorfismo de tamaño y por tanto distinta movilidad. De hecho, otros estudios que analizan la localización cromosómica de diferentes genes en *T. cruzi* (Gibson y Miles, 1986; Henriksson y col., 1990) señalan la diploidía así como la existencia de polimorfismo de tamaño entre cromosomas homólogos, incluso en cepas clonadas (Henriksson y col., 1990). Este polimorfismo de tamaño es aún más acusado cuando se trata de diferentes cepas (Bishop y Miles, 1987) y parece corresponder con un fenómeno de plasticidad cromosómica bastante extendido entre los eucariotas de pequeño genoma (tripanosomas africanos, Gibson y Borst, 1986; *Leishmania*, Spithill y Samaras, 1985; y *Plasmodium* Sharkey y col., 1988). Los factores que contribuyen a la aparente variabilidad entre los cromosomas de *T. cruzi* es desconocida, pero puede involucrar crecimiento y contracción de los telómeros como se ha observado en *T. brucei*. (Bernards y col., 1983).

En resumen, aunque la ploidía en tripanosomátidos es difícil de establecer dado que no hay condensación de los cromosomas, nuestros resultados vienen a sumarse a otros que indican que el orden es diploide, en especial en lo referente a los "genes housekeeping" (Borst y col., 1982; Iovannisci y col., 1984; Gibson y col., 1985).

En cuanto al kariotipo de *T. cruzi*, en nuestras condiciones pudimos separar 13 bandas de DNA. Sin embargo, el número de cromosomas debe ser mayor a tenor de que la intensidad relativa de las bandas no es la misma. En concreto Gibson y Miles (1986) han evaluado que el número de cromosomas en *T. cruzi* podría ser de 250. En adición, no hemos encontrado la presencia de minicromosomas, en contraste con lo que ocurre en *T. brucei* donde los hay en abundancia. En estos parásitos los minicromosomas parecen estar relacionados con la variación antigénica, y se piensa que los minicromosomas constituyen reservorios de genes teloméricos de antígenos variables de superficie (Van der Ploeg, 1984b).

V.3. TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA DHFR-TS DE *T. cruzi*.

Tal y como indicaron el análisis de "northern blot" (III.7) el gen de la DHR-TS se transcribe en forma de un sólo transcrito de aproximadamente 2.3 kb (Fig. III.12). Si bien, sólo

detectamos un sólo transcrito para la DHFR-TS no se descarta que las regiones 5' y 3' que se transcriben junto a la DHFR-TS formen parte de algún otro transcrito, tal como se ha descrito para *L.major* (Kapler y col., 1990) y *C. fasciculata* (Hughes y col., 1989). En todo caso probablemente formarían también parte de zonas no codificantes dado el elevado contenido en residuos A+T.

V.4. ANALISIS DE LAS SECUENCIAS NO TRADUCIDAS QUE FLANQUEAN LOS EXTREMOS 5' Y 3' DEL GEN DE LA DHFR-TS.

V.4.1. Region 5'

V.4.1 1. Composición de bases.

La composición en bases de los 556 nucleóticos correspondientes a la zona 5' que flanquean el gen (Fig.III.6) muestra un contenido muy bajo de G+C de alrededor del 36% (Tabla V.1). El contenido en T es sensiblemente mayor al de A, aunque la proporción de residuos pirimidínicos (T+C) es equiparable al de purínicos (A+C). La secuencia contiene 6 ATG todos ellos no funcionales puesto que conducen a pautas de lectura con numerosas paradas. En este sentido, un estudio comparativo sobre las secuencias que flanquean el sitio de iniciación de la traducción en prozoos (Yamauchy, 1991) indicó que el único denominador común (compartido con el resto de los eucariotas) es la fuerte preferencia por una A en la posición -3. Desde este punto de vista tan sólo el ATG funcional posee una A en la posición -3 (Fig. V.1).

V.4.1.2. Sitios aceptores del miniexon

Todos los RNAm de tripanosomátidos descritos hasta la fecha comparten en su extremo 5' una secuencia de 39 nucleótidos denominada mini-exón o "sliced leader" que es adicionada a los pre-RNAm a partir de un transcrito independiente en un proceso de maduración denominado "trans-splicing" (revisión en Laird, 1989). Por otra parte, el sitio de aceptor del mini-exon corresponde siempre con un dinucleótido AG situado en 5' y a la distancia apropiada sobre el codon de iniciación.

Aplicando la técnica de RT-PCR (III.7) comprobamos que el dinucleótido AG situado en posición-163 (relativo al codon de iniciación) actúa como sitio aceptor del mini-exon (Figura V.1), correspondiendo el codon de iniciación con el primer triplete ATG corriente abajo de este dinucleótido. Este representa el sitio de "trans-splicing" descrito hasta la fecha más alejado del codon de iniciación. La composición en T+C de los 75 nucleótidos que flanquean corriente arriba el aceptor del mini-exon es del 80%, mientras que la de la región completa es del 50%.

Por ello esta zona podría representar la región rica en polipirimidinas que se ha postulado determinante en la selección del dinucleótido AG aceptor del mini-exon (Huang y col., 1991).

Por otro lado, en tripanosomas no existen requerimientos estrictos para el sitio aceptor del "spliced leader" y para la mayor parte de los genes codificantes se han descrito varios (Agabian, 1990), incluyendo el gen para la DHFR-TS de *L. major* (Hughes y col., 1989). Incluso se han descrito transcritos cuyo sitio aceptor de "trans-splicing" no está próximo a ninguna región rica en polipirimidinas (Fernandez cano, Tesis doctoral). Por ello, dado que nuestra secuencia contiene numerosos dinucleótidos AG, varios de ellos en las proximidades de regiones ricas en T+C, no descartamos la posibilidad de que exista algún otro aceptor del mini-exon alternativo, y que en nuestras condiciones experimentales hayamos detectado tan sólo uno de los posibles sitios de "trans-splicing".

```

-556 ATTCGCTTGTGCTGGTTGGCACACCGT ATGAAT ATACAT AT AT AT AT AT AT A
-502 CGCTATATACATGCTTGTTTGT TTTTCGAGT GTGTGTGTGTGTGT AATGTGAGCG
-448 GGGGAGGGGATTAGGTGGAGGATTCCTCTTT CATGAAGACCGAGAGGACATTT
-395 GGTTCAATTTGTGTGTGGCTTGGGGAGGGGAGCTAGCCACATATATTTTATTTTA
-341 TTTTATTTTATTTTATTTATTTATTTTGAGGAATTGGGAAGCAGGCGGGTGACTGG
-287 GAGGGATGTTTTCTTTTTCTTTTCGGCCACCATTCAGTCATGAGAGCCTTTTTT
-233 TTTTTCTTTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTTGTGTGTTGTTTTGTGG
-179 GTTTTTCTTTTGATAGGAGCACGAAGAGAAGGAAAAACAAAACAAAAGAC
-126 AAAACAAAAAATAACAAAAGACAAGAGTTACAAATAATATTTAAAGTGAATC
-72 CACACAAACAGGCGGCAAGCGGAAAAGAGGTCGTACGTACTTTTACACTTTTCT
-18 CTCACTTGTGCGTCCACCATG
      1►Met
    
```

Figura V.1. Análisis de la región 5' que flanquea el gen codificante de la DHFR-TS de *T. cruzi*. En azul hemos representado el dinucleótido AG aceptor del mini-exon y la posible secuencia promotora. En verde se reflejan las regiones ricas en polipirimidinas. Se han subrayado todos los tripletes ATG y los dinucleótidos AG hasta la posición -300. La adenina en posición -3 relacionada con los codones de iniciación funcionales aparece en negrita. La numeración tiene como origen el triplete de iniciación.

V.4.1.3. Posibles secuencias promotoras y de unión de proteínas.

Hasta la fecha son muy pocos los promotores descritos para los genes de tripanosomátidos y aún menos para *T. cruzi*. Además la comparación entre las secuencias promotoras caracterizadas en los distintos tripanosomátidos no revela ninguna similitud, ni entre ellas ni entre las descritas en eucariotas, lo que dificulta la asignación de posibles secuencias con actividad promotora. A pesar de ello pensamos que la secuencia corriente arriba del gen de la DHFR-TS podría ser un buen candidato para hallar una posible región promotora puesto que se trata de un gen de copia única.

Hasta ahora, no hemos realizado ningún trabajo experimental con el fin de acotar una región promotora y nos hemos limitado a buscar secuencias consenso con actividad promotora o capacidad de unión de factores de transcripción en otras especies. Entre otras se buscaron las secuencias promotoras TATA y CAAT de eucariotas (Breathnach y col., 1981) y sitios de unión del factor de transcripción SP1 (GGGGCTG) (Dynan y Tjian, 1983), encontrando tan sólo una región entre los nucleótidos -522 y -494 que contiene una elevada concentración de motivos TATA. Sin embargo, en tripanosomátidos no se ha descrito ninguna secuencia de este tipo involucrada en actividades promotoras, por lo que desconfiamos que posea actividad. Tampoco se encontró similitud con la secuencia consenso de los promotores de la DHFR de eucariotas (Yen y Kellems, 1987).

La comparación de la región 5' sobre la base de datos GenBank utilizando el programa FASTA sobre no reveló ninguna homología con regiones promotoras o de unión de factores de transcripción. Destacar que esta búsqueda el mayor grado de homología se estableció con genes codificantes para RNA ribosómicos incluido el 5 S de *T. cruzi*. También enfrentamos mediante el programa BESTFIT la región 5' del gen de la DHFR-TS de *T. cruzi* con regiones promotoras descritas en *T. brucei* para los antígenos variables de superficie (Zomerdijsk y col., 1990; Gottesdiener y col., 1991), y para el promotor del gen de la actina (Ben Amar y col., 1991) no obteniendo en ningún caso homología alguna.

Sin embargo, sí hemos encontrado una secuencia consenso descubierta por Martínez-Calvillo y Hernandez (1994) en los posibles sitios de iniciación de la transcripción del RNAr 18S. Estos autores señalaron que la secuencia $^{-4}\text{TCAT}^{+1}\text{GNNG}$ es común a los dos posibles sitios de iniciación de la transcripción descritos para el RNAr 18S (Dietrich y col., 1993; Martínez-Calvillo y Hernandez 1994). Puesto que este motivo parece estar conservado se concluye que es posible que tenga cierta actividad promotora. El residuo G marcado con +1 representa el primer nucleótido que se transcribe. Este mismo motivo se encuentra en posición -411 corriente arriba del codon de iniciación de la DHFR-TS de *T. cruzi* (Fig. V.1). La validez de

esa secuencia como posible sitio de iniciación de la transcripción es discutible para el gen de la DHFR-TS de *T. cruzi*, dado que esa secuencia sería específica de la RNA polimerasa I -que transcribe RNAr- y no de la RNA polimerasa II encargada de transcribir los genes que codifican para proteínas. No obstante, dadas las peculiaridades de la biología molecular de los tripanosomátidos no se descarta que el gen de la DHFR-TS de *T. cruzi* pueda ser transcrito a partir de un promotor de la RNA polimerasa I. En concreto en *T. brucei* donde se han descrito actividad para los tres tipos de promotores en base a su sensibilidad a la α -aminoptina (RNA polimerasa I, II, III (Stryer, 1988)); existen evidencias de que los genes codificantes para las proteínas variables de superficie (VSG) y la proteína ácida repetitiva de las formas pocíclicas (PARP) son transcritas por la polimerasa I (Chung y col., 1993).

Un alineamiento entre las zonas que flanquean los dos posibles sitios de inicio de la transcripción para el RNAr 18S -proximal y distal- de *T. cruzi* con los correspondientes de *T. brucei* (White y col., 1986) y *C. fasciculata* (Grondal y col., 1990) y parte de la región que flanquea el extremo 5' del gen de la DHFR-TS de *T. cruzi* aparece reflejado en la figura V.2. También hemos incluido esa misma región para el gen VSG 221a de *T. brucei* (Zomerdijs y col., 1990) La homología existente entre los distintos tripanosomátidos es mínima reduciéndose a tan sólo un residuo T correspondiente al residuo adyacente al sitio de transcripción y a un residuo G en la posición +4. El alineamiento completo de la secuencia 5' que flanquea el gen de la DHFR-TS de *T. cruzi* con todas estas secuencias mediante el programa BESFIT sólo reveló cierta homología con el transcrito primario del RNAr *T. cruzi* a nivel de los motivos TATA.

RNAr 18S

<i>C. fasciculata</i>	G G C G C T G T T T T G C T A A A A C T C G T G T C T G A G
<i>T. brucei</i>	A A A A G T A G C G C T T A C G G C G T A C G G A G C A G G
<i>T. cruzi</i>	
	1
<i>Distal</i>	A T T T G T G T C T A G T A C A T C A T G G A G C G G T A T
<i>Proximal</i>	T T G C A C A A T T T G T G T G T C A T G C T G T G T G C A
<i>DHFR-TS T. cruzi</i>	G T G G A G G A T T C C T C T T T C A T G A A G A C C G A G
<i>221a VSG T. brucei</i>	T T A C C A C A C C A T T A T A T A T T A C A G G G G A G G

Figura V.2. Homología entre los sitios de iniciación de la transcripción de varios genes y el posible sitio de iniciación de transcripción de la DHFR-TS de *T. cruzi*. Recuadrado aparece el motivo común a los sitios de iniciación del RNAr 18S (Martínez-Calvillo y Hernández). En negrita aparecen los nucleótidos comunes a todas las secuencias así como los comunes entre los RNAr 18S de *T. cruzi* y la región 5' que flanquea el gen de la DHFR-TS de *T. cruzi*. El origen de transcripción se indica con el número 1.

V.4.2. Región 3'.

Secuenciamos 291 nucleótidos del extremo 3' que flanquea el gen de la DHFR-TS. La composición en bases es de un 40% en G+C con un 60% en A+T, típico de una zona no codificante (Tabla V.1). En adición todos los ATG que localizamos en la secuencia conducen a pautas de lectura muy cortas que difícilmente podrían ser codificantes.

De acuerdo con los datos que tenemos referentes al tamaño del transcrito, tamaño del gen y el sitio de adición del mini-exon, el sitio de poliadenilación del transcrito de la DHFR-TS debe quedar corriente abajo de esta secuencia, a no ser que el transcrito posea una cola de poli A de unos 300 nucleótidos. En todo caso dado que en tripanosomátidos no existe una secuencia consenso que señale el sitio de poliadenilación -secuencia AAUAAA en el resto de los eucariotas- la determinación del sitio de poliadenilación requerirá del mapeo con S1.

Si bien no hemos realizado un estudio detallado sobre esta zona se cuenta entre nuestros objetivos puesto que se conoce que las secuencias 3' que flanquean los genes tienen un papel importante en la regulación génica (Hug y col., 1993) y además se ha comprobado que la adición del mini-exon está acoplada a la poliadenilación (LeBowitz y col., 1993)

V.5. ESTUDIO DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA CODIFICANTE DE LA DHFR-TS DE *T. CRUZI*.

La secuenciación de un fragmento de un clon de DNA genómico de *T. cruzi* obtenido mediante una sonda diseñada por PCR de una zona conservada de la TS reveló un marco de lectura abierto de lectura de 1563 pb. La proteína predicha tiene 521 aa (Fig.III.6) y un peso molecular teórico de 58829 D.

La asignación del triplete ATG correspondiente al codon de iniciación fue realizada en base a la homología con la secuencia de la DHFR-TS de *L. major* (Grumont y col., 1986), no obstante son varios los resultados que corroboran la correcta elección de la pauta de lectura. En primer lugar no existe ningún otro triplete ATG en las proximidades corriente arriba del escogido, situándose el más cercano -246, 83 nucleótidos corriente arriba del sitio localizado como aceptor del mini-exon (Figs. III.6 y V.1). Corriente abajo sí existen otros tripletes ATG, sin embargo, son descartados como codones de iniciación, tal como reveló la microsecuencia del extremo aminoterminal de la proteína recombinante. El codon de terminación corresponde con la secuencia TAG entre los nucleótidos 1563-1566. Es el primero que aparece en la pauta de lectura y va precedido de un triplete codificante para una valina que está conservada en la mayor parte de los orígenes (Figs. III.6). Por último, otro resultado que reflejó la correcta elección de la pauta

de lectura fue la coincidencia entre el pm molecular teórico de la proteína y el que obtuvimos por espectroscopia de masas.

V.5.1. Uso codónico y Composición en bases.

El código genético es universal en los genes nucleares eucarióticos. Sin embargo, la frecuencia con que cada aminoácido es codificado por un triplete particular varía de unos organismos a otros e incluso de unos genes a otros en el mismo organismo. La composición en bases de la DHFR-TS de *T. cruzi* muestra un contenido en G+C del 58%, sustancialmente superior al encontrado en las regiones 5' y 3' que flanquean la secuencia, donde es del 36 y el 40% respectivamente. Esto es un indicio de que estas regiones son no codificantes, de hecho el análisis de las secuencias codificantes de 19 genes de *T. cruzi* mostró un contenido en G+C del 56%, ligeramente inferior al de la DHFR-TS. Por otro lado la secuencia de la DHFR-TS de *T. cruzi* muestra una fuerte preferencia (70%) por residuos G o C en la tercera posición de los codones, preferencia que se repite en los 19 genes analizados de *T. cruzi* en donde es del 68.5%. En comparación, los genes de la DHFR-TS de *L. major* (Beverley y col., 1986), *Toxoplasma gondii* (Roos, 1993), y *P. falciparum* (Bzik y col., 1987) tienen un contenido en G+C en la tercera posición de los codones del 86, 67, y 16%, respectivamente.

Tabla V.1. Frecuencia de nucleótidos (nt) del gen de la DHFR-TS de *T. cruzi* y de las regiones flanqueantes.

	Región 5' (556 nt) nt(%)	Sec. codif.(1566 ^a nt) nt(%)	Región 3'(291 nt) nt(%)	3 ^a posición nt(%) 522 ^a
G	127(22.8)	464(29.6)	70(24.0)	185(35.4)
A	151(27.1%)	330(21.1)	117(40.2)	58(11.1)
T	203(36.5%)	336(21.4)	57(19.6)	99(18.9)
C	75(13.5%)	436(27.8)	47(16.1)	180(34.4)
%G+C	36.3	57.5	40.2	69.9

^a Incluye el codon de terminación.

Ala	GCT 3 GCC 14 GCA 8 GCG 13	0.4 1.3 1.3 0.9	Arg	CGT 7 CGC 22 CGA 0 CGG 10 AGA 1 AGG 1	0.6 1.2 0 2.2 1 0.2	Asn	AAT 11 AAC 10	1.4 0.8	Asp	GAT 5 GAC 20	0.6 1.2	Cys	TGT 1 TGC 7	0.6 1.1
Gln	CAA 4 CAG 8	1.4 0.9	Glu	GAA 6 GAG 33	0.5 1.2	Gly	GGT 13 GGC 11 GGA 4 GGG 9	1.2 0.8 0.8 1.4	His	CAT 4 CAC 9	1 0.8	Ile	ATT 9 ATC 12 ATA 2	0.9 1.1 1.3
Leu	TTA 1 TTG 11 CTT 8 CTC 16 CTA 6 CTG 13	0.7 1.5 0.8 1.6 2.2 0.6	Lys	AAA 6 AAG 15	1.4 0.9	Met	ATG 13		Phe	TTT 15 TTC 6	1.4 0.6	Pro	CCT 4 CCC 7 CCA 8 CCG 12	0.9 1 1.4 0.9
Ser	TCT 4 TCC 7 TCA 1 TCG 8 AGT 2 AGC 9	1.1 1 0.3 1.4 0.5 1.2	Thr	ACT 1 ACC 5 ACA 9 ACG 14	0.2 0.9 1.5 1.1	Trp	TGG 8		Tyr	TAT 6 TAC 14	1.2 0.9	Val	GTT 8 GTC 9 GTA 2 GTG 6 TAG* 1	1 1.4 1 0.8

Tabla V.II. *Uso codónico de la DHFR-TS de T. cruzi.* Cada uno de los cuadros muestra el número de veces que aparece el triplete codificante para ese aminoácido, y el ratio entre la frecuencia relativa de ese triplete en el gen de la DHFR-TS y el que aparece en la tabla V.III del uso codónico de *T. cruzi*.

Ala	GCG 0.38 GCA 0.16 GCT 0.18 GCC 0.28	Arg	CGT 0.26 CGC 0.44 CGA 0.05 CGG 0.11 AGA 0.02 AGC 0.11	Asn	AAT 0.36 AAC 0.64	Asp	GAT 0.32 GAC 0.68	Cys	TGT 0.21 TGC 0.79
Gln	CAG 0.76 CAA 0.24	Glu	GAG 0.71 GAA 0.29	Gly	GGG 0.17 GGA 0.13 GGT 0.24 GGC 0.46	His	CAT 0.31 CAC 0.69	Ile	ATA 0.07 ATT 0.45 ATC 0.49
Leu	TTG 0.13 TTA 0.03 CTG 0.42 CTA 0.05 CTT 0.20 CTC 0.18	Lys	AAG 0.80 AAA 0.20	Met	ATG 1	Phe	TTT 0.51 TTC 0.49	Pro	CCG 0.42 CCA 0.19 CCT 0.15 CCC 0.24
Ser	AGT 0.12 AGC 0.25 TCG 0.18 TCA 0.10 TCT 0.12 TCC 0.23	Thr	ACG 0.43 ACA 0.21 ACT 0.17 ACC 0.18	Trp	TGG 116	Tyr	TAT 0.24 TAC 0.76	Val	GTG 0.54 GTA 0.06 GTT 0.22 GTC 0.18 TGA* 0.58 TAA* 0.11 TAG* 0.31

Tabla V.III. *Uso codónico de T. cruzi.* Obtenido a partir de la secuencias codificantes completas de 19 genes.

El uso codónico del gen de la DHFR-TS de *T. cruzi* aparece en la tabla V.II, junto con el ratio obtenido de dividir la frecuencia con la que aparece un determinado codon y la frecuencia de ese codon obtenida a partir del uso codónico de 19 genes de *T. cruzi* (Tabla V.III). Como refleja la tabla V.II el uso codónico de la DHFR-TS de *T. cruzi* no es particularmente inusual. Todos los tripletes se encuentran en el gen salvo CGA (Arg), que si bien es usado en otros genes de *T. cruzi*, su frecuencia es muy baja. Los cocientes señalados arriba giran todos alrededor de la unidad, lo que indica que el uso codónico de la DHFR-TS no difiere del descrito para *T. cruzi*, y tan sólo los codones ACT(Thr) y TCA(Ser) presentan una frecuencia relativa significativamente menor a la esperada (5 y 3 veces menor respectivamente). Por su parte, el triplete GCT(Leu) se encuentra sobrerrepresentado 2.2 veces con respecto a lo esperado.

V.6. ANALISIS DE LA SECUENCIA PEPTIDICA DE LA DHFR-TS de *T. cruzi*.

V.6.1. Distinción de los dominios DHFR y TS en la enzima bifuncional de *T. cruzi*.

El alineamiento de la DHFR-TS de *T. cruzi* con otras enzimas bifuncionales y las correspondientes monofuncionales (Fig V.III) se realizó en base a consideraciones de equivalencia estructural y máxima similaridad en la secuencia (Blakey, 1984; Volz y col., 1982, Perry y col., 1990, Knighton y col., 1994). De tal alineamiento se pueden distinguir dos dominios estructuralmente separados: un dominio DHFR situado en el extremo aminoterminal y representado unos 25 kD; y un dominio TS de aproximadamente 34 kD situado en el extremo carboxiterminal. Hemos asignado los aminoácidos 1-234 (Asn234) al dominio DHFR, mientras que los restantes corresponden al dominio TS. Esta división no es arbitraria y está apoyada en consideraciones estructurales.

Todas las TS de estructura de R-X resuelta presentan una hélice α -A en su extremo aminoterminal, predicha por los algoritmos de predicción de estructura secundaria (Chou y Fasman, 1978; Garnier y col., 1978). Esta hélice también se predice para las TSs de ratón y humano y en el caso de la DHFR-TS de *T. cruzi* (Fig.V. 5) comienza justo en la arginina 235. Por esta razón escogimos la Asn234 como último residuo del dominio DHFR. Esta elección se ve también apoyada por el hecho de que es posible expresar el dominio DHFR catalíticamente activo a partir de los 234 primeros aminoácidos, y otro tanto ocurre con los residuos homólogos para el caso del dominio DHFR de la DHFR-TS de *P. falciparum* como una proteína catalíticamente activa en base a la elección de los mismos aminoácidos (Siwaraporn y col., 1993).

Dihidrofolato Reductasa



Figura V.3a. Alineamiento de la DHFR. La figura muestra el dominio DHFR de *T. cruzi* alineado con otras DHFRs monofuncionales y con los correspondientes dominios de otras enzimas bifuncionales. La estructura secundaria observada en la DHFR-TS de *L. major* se indica sobre las secuencias (Knighton y col., 1994). Una raya discontinua representa una lámina β y una continua un hélice.

Timidilato Sintasa

		----- I ----- A ----- B -----
		240 250 260 270 280
T.cruzi	-----	REEEQYLSLVDRIIREGNVVKHDRTGVTLSIFGAQMRFSLRNNRLPLLTTK
L.major	-----	HEERQYLELIDRIMKTGIVKEDRTGVGTISLFGAQMRFSLRDNRLLPLLTTK
C.fasciculata	-----	AEERQYLELIDRIMKTGLVKEDRTGVGTISLFGAQM-FSLRDNLPLLTTK
P.falciparum	EEDDFVYFNFNKEKEEKKNKNSIHPNDFQIYNLSKYKYHPEYQYLNIYDIMMNGNKQSDRTGVGVLSKFGYIMKFDLSQY-FPLLTTK	
Human	-----	MPVAGSELPRRPLPPAAQERDAEPRPPHGLQYLGQIQHILRCGVRKDDRTGTGLSVFGMQARYSLRDE-FPLLTTK
L.casei	-----	MLEQPYLDLAKKVLDEGHFKPDRHTHTGTYSIFGHQMRFDLSKG-FPLLTTK
E.coli	-----	MKQYLELMQKVLDEGTQKNDRTGTGLTSIFGHQMRFNLDG-FPLLTTK
	----- II ----- III ----- III' -----	
	290 300 310 320 330	
T.cruzi	RVFWRGVCEELLWFLRGETYAKKLSDKGVHIWDDNGSRRFLDSRGLTEYEE-----	
L.major	RVFWRGVCEELLWFLRGETSAQLLADKDIHIWDGNGSREFLDSRGLTENKE-----	
C.fasciculata	RVFWRGVCEELIWFLRGETNAHVLAADKDIHIWDGNGSREFLDSRGLTENKE-----	
P.falciparum	KLFLRGIIEELLWFIRGETNGNTLLNKNVRIWEANGTREFLDNRKLFHREV-----	
Human	RVFWKGVLEELLWFIKGSTNAKELSSKGVKIWDANGSRDFLDSLGFSTREE-----	
L.casei	KVPFGLIKSELLWFLHGDNTNIRFLLQHRNHIWDEWAFEKWVKSDEYHGPDMTDFGHRSSQKDPFAAVYHEEMAKFDDRVLHDDAFAAK	
E.coli	RCHLRSIIHELLWFLQGDNTNIAYLHENNVTIWDEWADEN	
	----- IV ----- V ----- C ----- VI ----- D ----- E -----	
	340 350 360 370 380 390 400 410 420	
T.cruzi	-MDLGPVYGFQWRHFGAAYTHHDANYDGGQVDQIKAIIVETLKTNPDDRMLFTAWNPSALPRMALPPCHLLAQFYVS--NGELSCMLY	
L.major	-MDLGPVYGFQWRHFGADYKGFANYDGGVDQIKLIVETIKTNPDDRLLVTAWNPCALQKMALPPCHLLAQFYVNTDTSELSCMLY	
C.fasciculata	-MDLGPVYGFQWRHFGADYKGFANYD-EGVDQIKTIVETLKT--NDRLLVTAWNPCALHKMAVRPCHLLGQFYVNTQTSELSCMLY	
P.falciparum	-NDLGPVYGFQWRHFGAEYTNMYDNYENKGVLDQLKNIINLIKNDPTSRRIILCAWNVKDLDMALPPCHILCQFYVF--DGKLSCLMY	
Human	-GDLGPVYGFQWRHFGAEYRDMESDYSGGVDQLQRVIDTIKTNPDDRRIIMCAWNPDLPLMALPPCHALCQFYVV--NSELSCQLY	
L.casei	YGDLGLVYGSQWRAWHTS-----KGDITDQLGDVIEQIKTHPYSRRLIVSAWNPEDVPTMALPPCHTLQFYVN--DGKLSLQLY	
E.coli	-GDLGPVYGFQWRAWPTP-----DGRHIDQITTVLNLQKNDPDSRRIIVSAWNVGELDKMALAPCHAFFQFYVA--DGKLSCLY	
	----- VII ----- F ----- VIII -----	
	430 440 450 460 470 480 490 500	
T.cruzi	QRSCDMGLAVPFNFIASYALLTILIAKATGLRPGELVHTLGDAHVYSNHVEPCNEQLKRVPRAFPYLVFRREREFLEDYEEGDMEVIDY	
L.major	QRSCDMGLGVPFNFIASYALLTILLAKATGLRPGELVHTLGDAHVYRNHVDALKAQLERVPHAFPPTLIFKEERQYLEDYELTDMEVIDY	
C.fasciculata	QRCCDMGLGVPFNFIASYALLTILIAKATGLRPGELVHTLGTAHVYSNHVEALKEQLQRPVAFPPVLVFKKEREFLDYESTDMEVVDY	
P.falciparum	QRSCDLGLGVPFNFIASYIFTHMLAQVCNLLQPAQFIHVLGNNAHVYNNHIDSLKIQLNRIYPFPPTLKLNPDIKNIEDFTISDFTIQNY	
Human	QRSGDMGLGVPFNFIASYALLTYMIAHITGLKPGDFIHTLGDAAHIYLNHIEPLKIQLOREPRFPFKLRILRKRVEKIDDFKAEDFQIEGY	
L.casei	QRSADIFLGVPFNFIASYALLTHLVAHECGLEVGEFIFHTFGDAHLYVNHLDQIKEQLSRTPRPAPTLLQNPDKHDIFFDFMKDIKLLNY	
E.coli	QRSCDVFLGLPFNFIASYALLVHMMMAQQCDLEVGVDFGWTGGDTHLYSNHMDQTHLQLSREPRPLPKLIIKRKPESIFDYRFEDFEIQGY	
	510 520	
T.cruzi	APYPPISMKMAV	
L.major	VPHPAIKMEMAV	
C.fasciculata	VPYPPIKMEMAV	
P.falciparum	VHHEKISMMAV	
Human	NPHPTIKMEMAV	
L.casei	DPYPPIKAPVAV	
E.coli	DHPGIKAPVAI	

Discusión

Figura V.3b. Alineamiento de la TS. En la figura se alinean el dominio TS de la enzima de *T. cruzi* con varias TSs monofuncionales y los dominios TS de otras enzimas bifuncionales. La estructura secundaria observada para la DHFR-TS de *L. major* se indica sobre la secuencia (Knighton y col., 1994). Una línea discontinua representa una lámina β y continua una hélice α .

V.6.2. Homología del dominio DHFR.

El dominio DHFR tiene 234 aa -bastante más que los 159 y 186 residuos que poseen respectivamente la DHFR de *E. coli* y humano- y como en otras DHFR-TS, el extremo aminoterminal es aproximadamente unos 20 residuos más largo que el de las DHFR monofuncionales. Estos residuos constituyen una región variable y la homología significativa no aparece hasta el residuo 23 (Fig. V.3). Tampoco presenta homología significativa el extremo carboxiterminal del dominio DHFR (193-234) destacando en *T. cruzi* una inserción de 3 o 2 aas con respecto a la secuencia de otros enzimas bifuncionales (Fig. V.3a).

El alineamiento de las secuencias (Fig. V.3) muestra que la región que conecta la hélice α -B con la lámina β -B (residuos 57-73) es muy larga, 13 y 6 residuos más larga que en *E. coli* y humana. Además muestra un contenido inusualmente alto en residuos básicos, positivamente cargados (6 de los 13). Esta polongación es común en todas las DHFR-TS bifuncionales y en estructura cristalina de la DHFR-TS de *L. major* se ha visto que interaccionan con el dominio TS. El contacto se produce en una zona próxima al sitio de unión del CH₂-H₄F constituida también por residuos básicos (Lys285, Arg286 y Arg290, secuencia de *T. cruzi*) involucrada en la unión de folatos y análogos de folato poliglutamados (Maley y col., 1982; Kamb y col., 1993). Como consecuencia de ello se produce distribución superficial de carga positiva entre los sitios de unión de ambos dominios en base a la cual Knighton y col. (1994) sugirieron una canalización electrostática del H₂F producto de la TS (cargado negativamente) a la DHFR, apuntando además que podría tratarse de una característica general en esta familia de proteínas.

El alineamiento múltiple de la figura V.3 muestra que la secuencia de *T. cruzi* posee una inserción de tres residuos en la posición 169-172 con respecto a las secuencias de bacterias, compartida con *C. fasciculata*, *L. major* y humano. Matthews y col., (1985b) señalaron previamente esta inserción en los enzimas de vertebrados y propusieron que era la responsable de que el sitio activo del enzima de pollo fuese aproximadamente 1 Å más profundo que el de *E. coli* y que ésta a su vez era la razón de la diferente unión del TMP a ambos enzimas que hacen de él un inhibidor específico de las DHFRs de procariotas. Además estos autores razonan que el D27 de *E. coli* que interactúa con la porción pirimidínica del TMP está sustituido en los enzimas de vertebrados por un glutámico, de cadena lateral más larga, para compensar la mayor profundidad del sitio activo. No obstante, las bases estructurales de la diferente unión del TMP no están totalmente resueltas. De hecho Oefner y col (1988) no observaron diferencias significativas entre el tamaño de los sitios activos de los enzimas de humano y *E. coli* cuando comparan los complejos binarios DHFR-TMP. Adicionalmente nosotros observamos que los enzimas de *T. cruzi*, *C. fasciculata* y *L. major* aún poseyendo esta inserción de tres residuos tienen un residuo D homólogo al de procariotas.

La tabla V.4 construida a partir del alineamiento de la figura V.III, podemos extraer varias conclusiones: 1) El dominio DHFR esta póbrememente conservado a nivel de la secuencia aminoacídica. Tan sólo presenta una homología alrededor del 50% con los dominios DHFR de los enzimas biuncionales de *L. major* y *C. fasciculata.*, mientras que con los enzimas monofuncionales de humano, *L. casei*, *E. coli*, y el dominio DHFR de la enzima bifuncional de *P. falciparm* no alcanza el 25%. 2) La homología es sustancialmente menor con las DHFR de procariotas que con las eucarióticas. 3) El dominio DHFR de *T. cruzi* mantiene mayor homología con la enzima monofuncional humana que con el correspondiente dominio de la enzima bifuncional DHFR-TS *P. falciparum*.

Tabla V.4. Aminoácidos compartidos entre la DHFR-TS de *T. cruzi* y las de otros orígenes.

	TS Aas idénticos.	DHFR Aas idénticos	Homol. TS (%)	Homol. DHFR (%)	Homol. DHFR-TS (%)
<i>L. major</i>	225	118	78.4	50.4	65.8
<i>C. fasciculata</i>	224	108	78.0	46.2	63.8
<i>P. falciparum</i>	146	55	50.9	23.5	38.6
Human	179	57	62.4	24.4	--
<i>L. casei</i>	131	33	45.6	14.1	--
<i>E.coli</i>	131	51	45.6	21.8	--

Los aminoácidos involucrados en la catálisis o en la unión de sustratos estan especialmente conservados. Así, de los 15 residuos identificados en la unión del folato en los enzimas de *L. casei* y *E. coli* (Bolin y col., 1982; Bystoff y col., 1990) 6 son idénticos en *T. cruzi* y al menos otros 6 han sufrido variaciones conservativas. Por su parte de los 25 residuos asignados a la unión del NADPH en la enzima de *L. casei* (Filman y col., 1982) 12 son idénticos, 7 han sufrido cambios conservativos, y 6 han variado (Fig. V.4). Con respecto a un alineamiento en el que aparecen todas las DHFRs descritas (Volz y col., 1982) tan sólo un residuo aparece cambiado: el D126 que cambia a una S (S188) en la secuencia de *T. cruzi.* La estructura cristalina del complejo ternario DHFR-MTX-NADPH de *L. casei* (Filman y col., 1982) indica que este residuo participa junto a otros en una trama de puentes de hidrógeno que retienen una molécula H₂O que a su vez está inteaccionando través de un puente de hidrógeno con el O3' de la ribosa de la nicotinamida del cofactor. La interacción entre el H₂O y el residuo D126 ocurre a taves del oxígeno Oδ1 lateral que actúa como átomo donador en el puente de hidrógeno. En virtud de esto el cambio del D por S en *T. cruzi* sería conservativo, ya que el puente de

hidrógeno podía seguir estableciéndose entre la molécula de H₂O y el Oγ1 de la cadena lateral de la serina.

V.6.3. Estructura del dominio DHFR de *T. cruzi*.

Hasta la fecha carecemos de la estructura de R-X de la DHFR-TS de *T. cruzi* o del dominio DHFR correspondiente, aunque ya disponemos de cristales de la enzima bifuncional y en breve será posible contar con una estructura tridimensional para la enzima. Mientras tanto sólo podemos modelar una estructura en base a predicciones teóricas y a la estructura cristalográfica de la enzima homólogo DHFR-TS de *L. major* (Knighton y col., 1994) y otros enzimas monofuncionales ya resueltos.

La aplicación de los algoritmos de predicción de la estructura secundaria al dominio DHFR de *T. cruzi* (Garnier y col., 1975; Chou-Fasman y col., 1975) señalan la mayor parte de los motivos estructurales descritos para el dominio DHFR en la estructura cristalina de la DHFR-TS de *L. major* (Knighton y col., 1994), comunes al resto de las DHFRs. En concreto identifican tres de las α -hélices (α -B, α -E y α -F) y 6 de las láminas β (β -A, β -B, β -C, β -D, β -E, β -F), errando tan sólo en la predicción de las hélices α -E', α -C y α -D, y las láminas β -G y β -H. Esto indica que, si bien la estructura primaria está pobremente conservada, la proteína debe copiar el modelo común de plegamiento del resto de las DHFRs. En comparación, los algoritmos no predijeron las hélices α -E' y α -F, ni láminas β -G y β -H de la enzima de *L. major* (Fig. V.4).

La estructura secundaria predicha para el extendido extremo aminoterminal del dominio DHFR señala una lámina β en los primeros 6 aa, seguida por una hélice α que precede a la lámina β -A. En *L. major* se predice una hélice α , sin embargo, la estructura terciaria muestra que posee una configuración extendida y que contacta en toda su extensión con el dominio TS. Si esa estructura es consecuencia de la interacción con el dominio TS está aún por determinar. En todo caso sería interesante conocer cual es la estructura del dominio DHFR expresado individualmente.

La estructura de R-X para el enzima bifuncional de *L. major* ha indicado claramente que cada uno de los dominios DHFR y TS contienen todos los elementos estructurales de las enzimas monofuncionales. Así iso ha señalado también que no existe conexión física entre los sitios activos de las enzimas que explique la canalización de sustrato observada. Sin embargo, el carácter bifuncional de la enzima DHFR-TS de *L. major* indujo a algunos autores (Grumont y col., 1986) a postular al existencia de un péptido de unión entre los dominios DHFR y TS asignándole una

DOMINIO DHFR

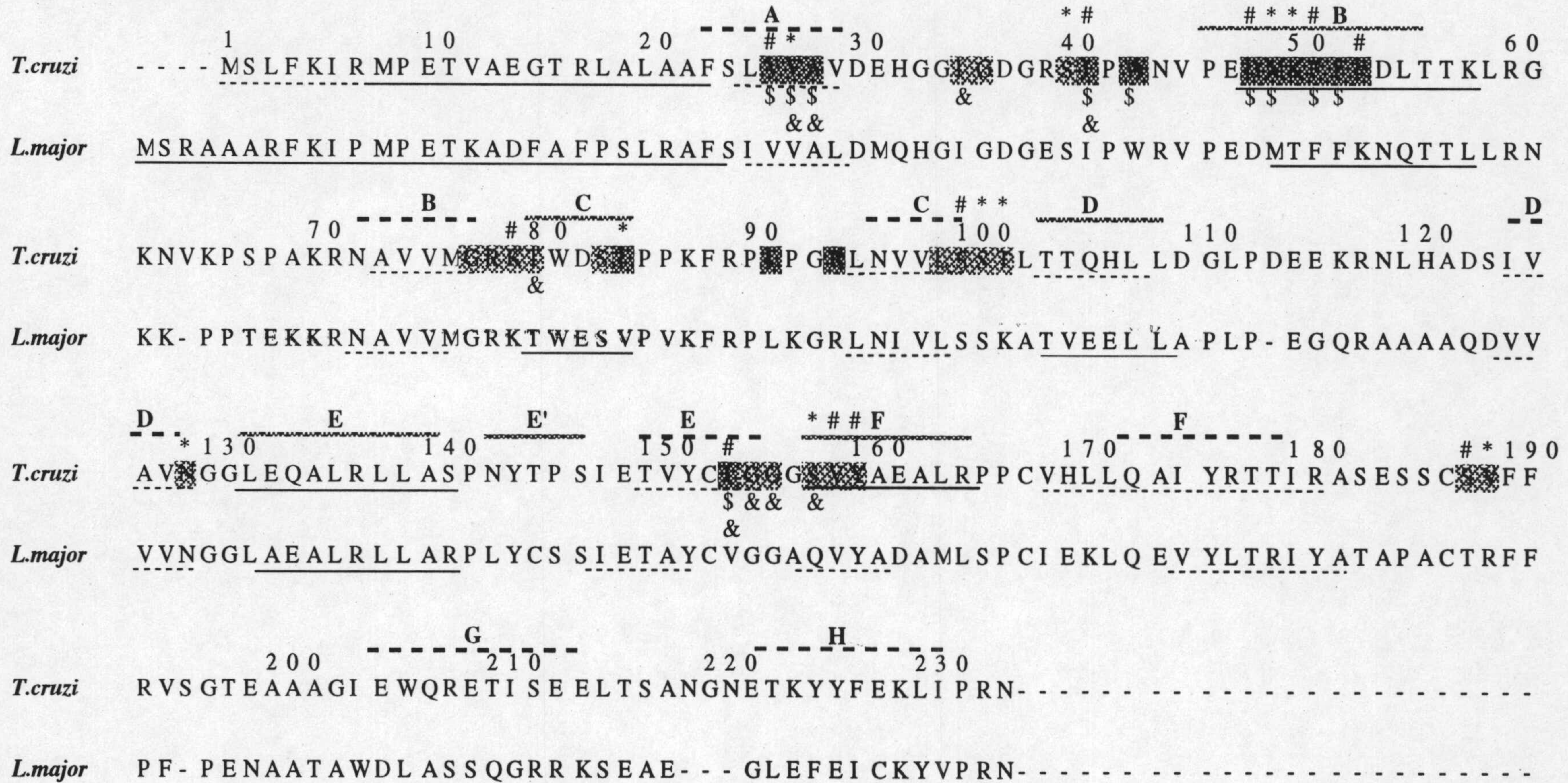


Figura V.4a. Análisis de la secuencia peptídica del dominio DHFR de *T. cruzi*: Comparación con mismo dominio de *L. major*. En la figura se ha representado en rojo la estructura de secundaria del enzima de *L. major* determinada por R-X (Knighton y col., 1994) y en negro bajo cada secuencia las predicciones de la estructura secundaria (Garnier y col., 1975; Chou-Fasman y col., 1975). En rojo se representan los residuos que interactúan con alguna parte del H₂F y en azul los que lo hacen con el NADPH. **Simbolos:** línea quebrada ≈ lámina β; línea continua ≈ hélice α, * residuo no conservado con respecto a la secuencia de *L. casei*; # residuo conservado; & interacciona con la porción nicotinamida del NADPH; \$ interacciona con el anillo pteridínico del H₂F.

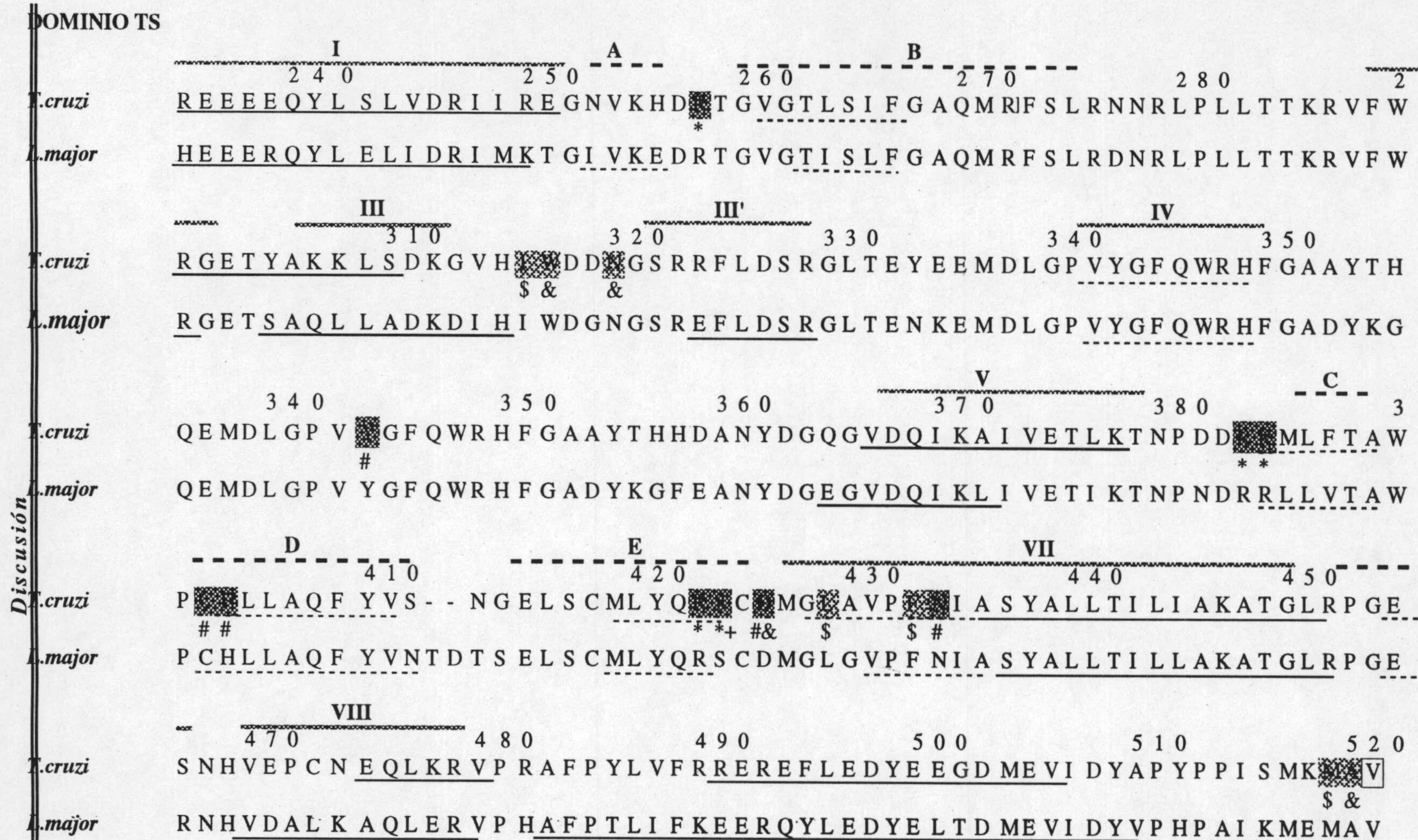


Figura V.3b. Alineamiento de la TS. En la figura se alinean el dominio TS de la enzima de *T. cruzi* con varias TSs monofuncionales y los dominios TS de otras enzimas bifuncionales. La estructura secundaria observada para la DHFR-TS de *L. major* se indica sobre la secuencia (Knighton y col., 1994). Una línea discontinua representa una lámina β y continua una hélice α .

estructura que era la idónea para su supuesto papel de puente de unión entre ambos dominios. Parecían apoyar esta idea la poca homología del extremo aminoterminal del dominio DHFR con otras DHFRs (Ver alineamiento Fig. V.3), el que no se predijeran las láminas β -G, y β -H (Ver Fig. V.4), y la excesiva longitud del dominio. Sin embargo, éstas no debieron de ser razones suficiente. Primero porque los extremos carboxiterminales de todas las DHFRs guardan poca homología, siendo en su totalidad una enzima poco conservado con sensibles variaciones de tamaño entre distintos orígenes. Segundo porque los algoritmos también fallan en la predicción de las láminas β -G y β -H en DHFRs donde sí han sido señaladas, como el caso de la humana (Humana: Oefner y col., 1988) y la de pollo (Matthews y col., 1984a). Y tercero porque, si bien estos algoritmos no predicen las láminas β -G y β -H, sí que predicen la hélice α -A (I) con la que comienzan todas las TS conocidas.

V.6.4. Homología del dominio TS.

Hemos asignado 287 aas al dominio TS (Arg235-Val521). El alineamiento de este dominio (Fig V.5) refleja, en contraste con lo que ocurría con la DHFR, un elevado grado de conservación: tamaños similares (exceptuando la de *L. casei*), y un número elevado de aas idénticos. De hecho, la TS es uno de los enzimas más conservados con un periodo evolutivo similar al de los citocromos (Perry y col., 1990). Son de destacar: a) La inserción de 8 aas entre los residuos 353 y 362, distintivos las TSs eucarióticas frente las procarióticas; b) La inserción de una Arg278 (Gln en *C. fasciculata*) que, según la estructura de la DHFR-TS de *L. major*, interaccionaría con el dominio DHFR; c) la delección de dos residuos entre las posiciones 412 y 415 con respecto a los enzimas de *L. major* y *C. fasciculata*.

La identidad con otras TS (Tabla V.4) supera en todos los casos el 45%. La mayor identidad corresponde con los dominios TS de los enzimas bifuncionales de *L. major* y *C. fasciculata* (78.4% y 78.0%, respectivamente) y la menor con las TSs de *E. coli* y *L. casei* (45.6%). El análisis de la identidad también indica que la enzima está más relacionada con la de los eucariotas vertebrados que con la de procariotas. Además, como ocurría con el dominio DHFR, la homología es mayor con la enzima humana (62.4%) que con el dominio correspondiente de *P. falciparum* (50.9%).

Todos los residuos descritos en la enzima de *E. coli* (Montfort y col., 1990) involucrados en catálisis o en unión de sustratos están conservados en la enzima de *T. cruzi*. (Fig. V.5). Tan solo la G225 (numeración de acuerdo al enzima de *L. casei*) ha sufrido un cambio conservativo por una A (A430). La cys que actúa como a través de su grupo sulfhidrilo se adiciona nucleofílicamente al sustrato corresponde en la secuencia de cruzi con la C403.

V.6.5. Estructura del dominio TS.

El elevado grado de conservación de la secuencia aminoacídica de las TSs se refleja también a nivel de la estructura secundaria. Así, la predicción de la estructura secundaria para la enzima de *T. cruzi* revela las 5 láminas β (β -B, β -C, β -D, β -E, β -F, nomenclatura según la enzima de *L. major*) comunes a todas las TS y que forman la interfase del dímero (Hardy col., 1987, Perry y col., 1990). Así mismo predice todas las hélices observadas en la enzima de *L. major* excepto la III' y la IV (Knighton y col., 1994). No obstante el tamaño de alguno de los motivos predicho no se ajusta con el observado en la estructura de la DHFR-TS de *L. major* (Fig. V.5): las láminas β , B, E, F e igual ocurre con las hélices VI, VII, VII. Además no se observa separación entre las hélices II y III. En comparación las predicciones para la enzima de *L. major* fueron similares aunque en ésta última si se predijo la hélice III' característica de esta enzima (Fig V.5).

En definitiva aunque existen variaciones entre la estructura secundaria predicha para la DHFR-TS de *T. cruzi* y la observada en la enzima de *L. major*, la gran homología entre ambas y el que los algoritmos tampoco predigan todos los elementos encontrados, indican que probablemente la enzima de *T. cruzi* contiene todos los motivos de la estructura secundaria de la DHFR-TS de *L. major*.

V.6. RELEVANCIA DE LA DHFR-TS DE *T. CRUZI*: HACIA EL DISEÑO RACIONAL DE INHIBIDORES.

El grupo en el que se ha desarrollado este trabajo estamos interesados en el estudio y la caracterización de enzimas blanco de acción de fármacos como una posible vía para la búsqueda y desarrollo de agentes quimioterapéuticos eficaces frente determinados patógenos.

Hasta mediados de los años 30 era ampliamente aceptado que todos los organismos seguían las mismas vías para controlar funciones bioquímicas y que no había diferencia entre los enzimas que controlaban estas rutas (Florkin, 1974). Consecuentemente, el concepto de agentes terapéuticos selectivos para una determinada especie no tenía mucha credibilidad. Esta idea cambió cuando se demostró que la actividad antibactericida de las sulfonamidas derivaba del hecho de que prevenían en bacterias el uso de del ácido p-aminobenzoico en la síntesis de ácido fólico, mientras que las células de mamífero no se afectaban porque no sintetizaban dicho ácido (Woods y col., 1940). Hoy en día está totalmente aceptado que existen pequeñas diferencias entre los enzimas de un determinado patógeno y del hospedador, que pueden ser explotadas para el tratamiento de ciertas enfermedades en base a la inhibición selectiva de uno de estos enzimas. Sin embargo, tan sólo aquellos enzimas que controlan procesos esenciales son potenciales blancos de acción de fármacos.

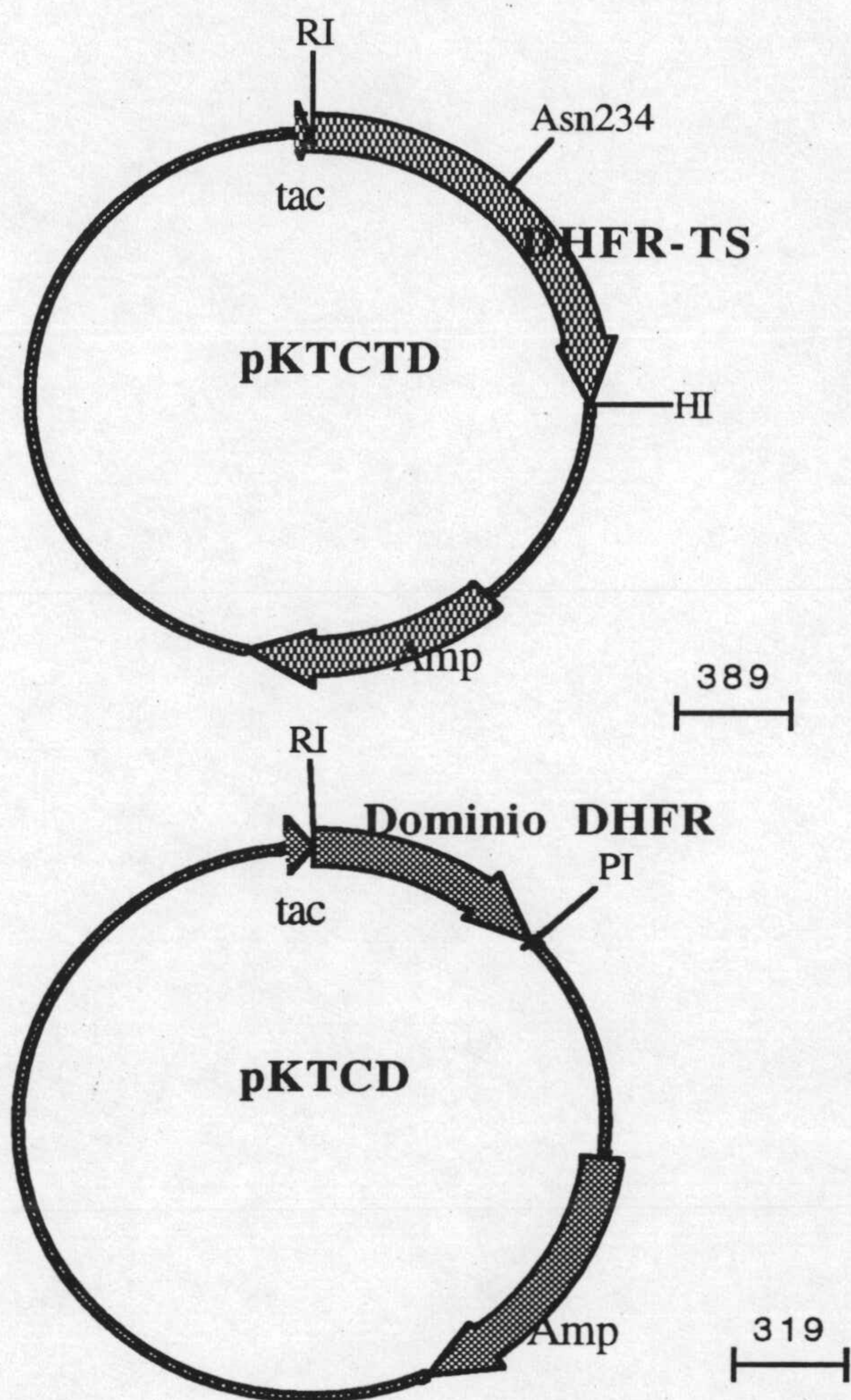
Desde este punto de vista la DHFR-TS de *T. cruzi* parece ser un candidato ideal: primero, porque tanto la DHFR como la TS son esenciales y la inhibición de cualquiera de ellas determina la muerte celular por disminución de los niveles de dTMP y consecuente parada de la síntesis de DNA; y segundo, porque el carácter bifuncional de la enzima en *T. cruzi* refleja de partida que existen claras diferencias con respecto las monofuncionales del huésped humano, necesarias para el posible desarrollo de fármacos selectivos. Adicionalmente, nuestra atención se ha centrado especialmente en la DHFR dado que está mucho menos conservada que la TS, y a priori esto aumenta la probabilidad de encontrar un inhibidor específico. De hecho, la DHFR ha sido utilizada ampliamente como blanco terapéutico y representa el caso modelíco de un enzima presente en el huésped y en el parásito que es posible inhibir selectivamente (Revisión en Schweitzer y col., 1990). En concreto, son varias las enfermedades causadas por protozoos que han sido tratadas con TMP y Pyr, bien sólo o en combinación con sulfo drogas. Estas incluyen malaria (Ferone, 1984; Peters, 1984), toxoplasmosis (Grossman y Remington, 1979), neumonía provocada por *P. carinii* (Winston y col., 1980), y coccidiosis aviar (McDougald, 1982)

El desarrollo de un fármaco efectivo implica en primer lugar el aislamiento y caracterización de la propiedades fisico-químicas del enzima escogido como blanco de acción y en segundo lugar conlleva la realización de estudios de inhibición y el entendimiento de las bases moleculares de esa inhibición. Por ello, hemos expresado el enzima recombinante DHFR-TS de *T. cruzi*, la hemos purificado, y hemos dado los primeros pasos en la caracterización del enzima y en los estudios de inhibición.

V.7. EXPRESIÓN Y PURIFICACION DE LA DHFR-TS DE *T. CRUZI*.

Los estudios detallado sobre la DHFR-TS o el dominio DHFR requieren de grandes cantidades de enzima pura. Sin embargo, La DHFR-TS de *T. cruzi* es una enzima minoritaria que representa menos del 0.1 % de las proteínas totales del parásito lo que unido a la dificultad del cultivo de parásitos limita la cantidad de enzima disponible.

Para solventar el problema recurrimos a la expresión heteróloga de la enzima recombinante en *E. coli*.. Mediante PCR amplificamos las regiones codificantes para la secuencia completa de la DHFR-TS, empleando para ello un oligonucleótido sentido que contenían el codon de iniciación del gen y otro antisentido que contenía el codon de terminación. Además los oligonucleótidos diseñados incluían en los extremos 5' dianas de restricción con el fin de facilitar el posterior clonaje. La secuencia codificante de la DHFR-TS fue entonces clonada en el vector de expresión pKK223.3 dando la construcciones pKTCTD (Fig. V.6).



Promotor tac

TTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT
 -35 -10 operador lac

Figura V.6. Plasmidos de expresión de la DHFR-TS de *T. cruzi* (pKTCTD) y el dominio DHFR (pKTCD). Las construcciones se hicieron sobre el vector pKK223.3. El vector porta un gen de resistencia a ampicilina (amp) marcado en azul y el promotor tac, híbrido entre el promotor del triptófano y el operón lac. Aba representa la secuencia de este operador con las regiones citadas en rojo. EI, EcoRI, HI, HindIII, PI, Ps. Asn corresponde con el último residuo que pertenece al dominio DHFR y que así se consideró para obtención de la construcción pKTCD.

La expresión de la DHFR-TS en pKK223.3 está bajo el control del promotor tac, un híbrido que combina la región -35 del promotor del triptófano con la región -10 del promotor lacUV5 y con el operon lac (Fig.V.6). En los huéspedes apropiados la expresión está regulada por el represor lac, siendo necesaria la inducción con IPTG. El sitio EcoRI ha sido introducido en el oligonucleótido sentido con el fin de utilizar el sitio de unión a ribosoma (RBS) del propio vector. Tras la secuencia codificante para la DHFR-TS el vector contiene un terminador ribosomal (*rrn B*) que aborta la traducción (Fig. V.6).

Para expresión de la DHFR-TS contamos con las cepas de *E. coli* χ 2913 Thy⁻ y PA414 Thy⁻ DHFR⁻, incapaces de crecer en un medio sin timidina lo que nos permite seleccionar fenotípicamente aquellos transformantes que expresen la proteína catalíticamente activa, y de hecho la transformación de estas cepas con el plásmido pKTCTD complementó la deficiencia en timidina. Los niveles de expresión de la DHFR-TS de *T. cruzi* correspondientes a proteínas solubles oscilan alrededor del 2% en células χ 2913.

Para la purificación de las proteínas recombinantes realizamos una cromatografía de afinidad en columnas de MTX-sefarosa siguiendo el procedimiento descrito para el enzima bifuncional salvaje y recombinante de *L. major* (Meek y col., 1985; Grumont y col., 1988). Sin embargo, en nuestro caso fue necesario la adición de KCl 0.5 M en el tampón de elución para la apropiada elución de la proteína de la columna. Este procedimiento nos permite purificar la proteína bifuncional en un sólo paso (III.9). El tampón de lisis empleado para la purificación de ambas proteínas contenía una mezcla de seis inhibidores de proteasas (Meek y col., 1985). Esta precaución es necesaria ya que, previamente había sido descrita la alta susceptibilidad del dominio TS a la proteólisis (Garvey y Santi, 1985). En estas condiciones el ratio DHFR/TS fue el mismo para los extractos crudos que para la proteína. El rendimiento de la purificación de la enzima bifuncional es del 40% y nos permite obtener aproximadamente 1.5 mg de proteína pura por litro de cultivo. La proteína purificada tiene un pm determinado por espectrometría de masas de 58820 ± 20 D y es muy estable, especialmente lo referente a la actividad DHFR (IV.10).

V.8. CARACTERIZACION CINETICA DE LA DHFR-TS DE *T. CRUZI*.

V.8.1 Efecto del pH y fuerza iónica (CLK).

Las actividades DHFR y TS son dependientes del tampón en el que se diluyen las enzimas previamente a las determinaciones cinéticas. En concreto la actividad TS es el doble cuando utilizamos como tampón de dilución TDE1x frente a tampón TE1x. La diferencia en este caso estriba en que el primero contiene un agente reductor DTT que podría estar evitando la oxidación del grupo sulfidrilo de la cisteína 403 que actúa como nucleófilo en la reacción. Por su parte la

actividad DHFR también sufre un incremento de aproximadamente del 80% cuando en el tampón de dilución se agrega PEG o glicerol a una concentración final del 8%. En este caso no existe diferencia alguno entre que el tampón de dilución sea TE1x o TDE1x. El glicerol y el PEG no sólo fueron capaces de activar el enzima sino que además impiden que esta se inactive con el tiempo cuando se encuentra a diluciones elevadas.

El pH óptimo para la actividad DHFR se situó en torno a 7.0, y se observó para ambos enzimas una rápida caída en la actividad a pHs básicos, siendo aproximadamente de la mitad a pH 8. Por el contrario el efecto pHs ácidos no fue tan drástico y la actividad se mantenía en ambos casos practicamente constante en un plató entre pH 5 y 7.2.

Este comportamiento es lógico en el caso de la DHFR dado que se ha demostrado que el primer paso de la reacción, la transferencia de un protón al sustrato, necesita que la enzima se encuentre protonada para que sea catalíticamente activa (Stone y Morrison, 1984) y de hecho la elevada actividad a pH ácido es una característica común de todas las DHFRs. Por otro lado el efecto tan acusado del pH básico sobre la actividad DHFR de *T. cruzi* es una característica que comparte con las enzimas de procariotas (Stone y Morrison, 1984; Fierke y col., 1987, Andrews y col., 1989) en tanto que para las enzimas de vertebrados presentan son básicamente pH independientes entre pH 5 y 9 (Beard y col., 1988; Schweitzer y col, 1989, Thillet y col., 1988).

La adición de CLK en el tampón de reacción también activo tantó a la DHFR como a la TS, con una concentración óptima de CLK para la DHFR de 0.25 M y de 0.1 M para la TS. La activación fue mayor para el caso de la DHFR llegando al 100%, en tanto que para la TS sólo fue del 30%. No hemos aún analizado esto datos y desconocemos cual es la razón de tan acusada de este incremento en la actividad, aunque si se indicado un efecto similar para la actividad DHFR de la enzima DHFR-TS de *P. falciparum*.

V.8.2. K_m s y k_{cats} .

El comportamiento cinético de las actividades DHFR y TS de la enzima bifuncional cuando se variaba uno de los sustratos y se mantenía fijo el otro fue del tipo Michaelis-Menten. Los valores de las K_m s para los sustratos de la DHFR(μ M: H₂F, NADPH) y de la TS(μ M: dUMP, CH₂-H₄F) fueron los siguientes: DHFR(1.2, 17); TS(1.02, 58). Y las constantes catalíticas para una y otra actividad fueron: DHFR 72 s⁻¹; TS 3.4 s⁻¹.

Comparando con la enzima de *L. major*, la constante catalítica obtenida para la DHFR de *T. cruzi* es el doble, mientras que la constante catalítica para la TS es aproximadamente la misma (Grumont y col., 1988). En cuanto a las K_m s todas son equiparables a las de la enzima de *L.*

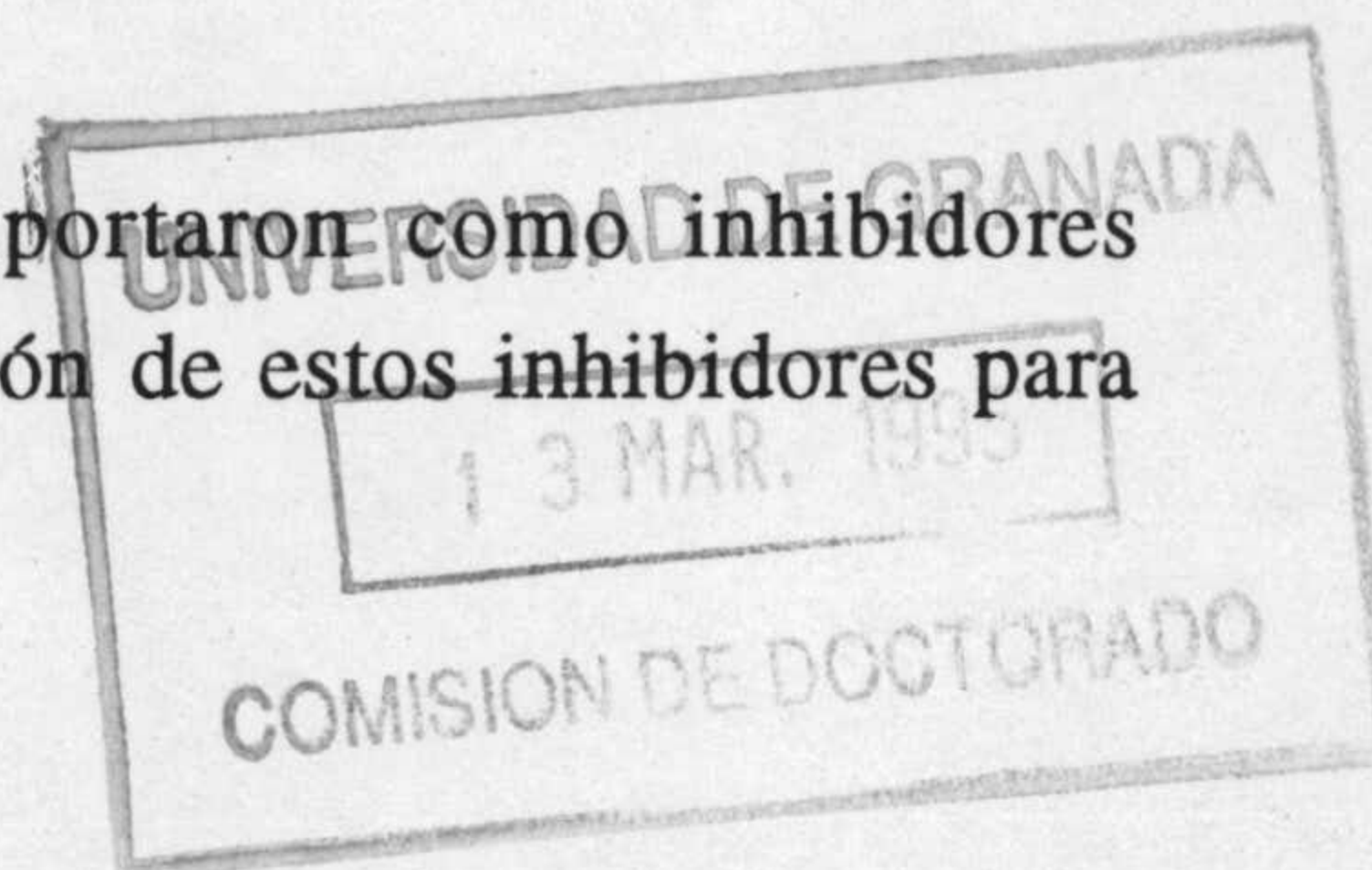
major, tan sólo la K_m para el NADPH es aproximadamente 10 veces mayor en el caso de la enzima de *T. cruzi*. y lo mismo ocurre con respecto a las DHFR bacterianas y de vertebrados, en donde el valor de la K_m oscila entre 1 y 2 μM . Es posible justificar la elevada K_m del NADPH simplificando la cuestión en los siguientes términos a) la arquitectura del sitio de unión al NADPH de las DHFRs bacterianas (Bystroff y col., 1990, Filman y col., 1982) se conserva en los enzimas de *L. major* y *T. cruzi* y b) las diferencias en la unión del NADPH radican exclusivamente en los residuos que interaccionan con él. Con estas premisas hemos localizado los residuos que interaccionan con el NADPH en el enzima de *T. cruzi* (los que aparecen en azul en la figura V.4) y los hemos comparado con los homólogos de *L. major*. Todos ellos son idénticos o conservados en ambas secuencias y tan sólo los siguientes cambian: T102(K en leishmania), S158(Q) y V189(R). En especial pensamos que el residuo V189 podría ser el principal responsable de la menor afinidad que presenta el NADPH por la enzima de *T. cruzi*. Esto es así porque la variabilidad de esos es mayor y de acuerdo con las estructuras terciarias de los enzimas bacterianos podrían seguir interaccionando de igual manera con los sustratos. En cambio la V189 corresponde con una T en las DHFRs de *E. coli* y *L. casei* que está involucrada en la unión donde fija a través de la cadena lateral dos moléculas de H_2O , que interaccionan a través de dos puentes de hidrógeno con el cofactor. Un residuo polar como la R de *L. major* podría también fijar estas moléculas de H_2O y así conservar las interacciones favorables con el sustrato, pero no la valina de *T. cruzi*.

V.9. INHIBICION DE LA DHFR-TS DE *T. cruzi* MEDIANTE TMP, PYR Y RO-46-8717.

Hasta la fecha los antifolatos no han resultado eficaces frente las tripanosomiasis (enfermedad de Chagas entre ellas) o las leishmaniasis, aunque dado gran número de antifolatos disponibles no se descarta que de partida alguno de ellos sea eficaz frente a *T. cruzi*., por lo que la realización de extensos ensayos de inhibición sobre el enzima DHFR-TS de *T. cruzi* es uno de los objetivos de este grupo. La relevancia de estos estudios es doble, primero porque identifican directamente aquellos inhibidores que son potentes y específicos y segundo porque permiten obtener la información necesaria para el desarrollo de otros más potentes y específicos.

En esta tesis aunque doctoral hemos escogido tres: el TMP y la Pyr por su amplio espectro, y el RO-46-8717, una 2-4-diamopirimidina-5-bencil-sustituida relacionada con el TMP que nos fue cedida amablemente por el Profesor Daniel V. Santi de la Universidad de California, San Francisco.

Según lo esperado TMP, Pyr y RO-46-8717 se comportaron como inhibidores competitivos de la DHFR de *T. cruzi*.. Las constantes de inhibición de estos inhibidores para



varias enzimas relacionadas aparecen reflejadas en la tabla V.5. El TMP resultó el inhibidor más pobre con una K_i de 21 nM, valor que está mucho más proximo al enzima humana (≈ 100 nM) que la de *E. coli* (0.08 nM). La K_i para la Pyr fue de 12 nM, significativamente mayor que la correspondiente a *P. falciparum* donde es de aproximadamente 0.1 nM y del mismo orden que la de humano (65 nM). Podríamos haber esperado que que la inhibición sufrida por la DHFR-TS de *T. cruzi* hubiera sido más parecida a la de plasmodium que a la de humano, sin embargo, no ha sido así, mostrando que las relaciones evolutivas no tienen porqué reflejarse forzosamente en la respuesta de la DHFR.

Tabla V.5. Constantes de inhibición de DHFRs de distintos organismos para varios antifolatos.

Ki(inhibidor)	<i>T. cruzi</i> ^a	Humana	<i>P. falciparum</i>	<i>E. coli</i>
Ki(TMP)	21 nM	100 nM ^b	d	0.08 nM ^f
Ki(Pyr)	12 nM	65 nM ^b	0.1 nM ^e	12.5 nM ^f
Ki(RO-46-8717)	0.5 nM	800 nM ^c		

a Datos determinados en esta tesis

b Datos procedentes de Siwaraporn y col., 1988.

c Dato determinados en la Universidad California, San Francisco.

d

e Dato procedente de Siwaraporn y col., 1990.

f. Datos obtenidos por Burchal, 1979.

Por lo general para que un inhibidor pueda ser efectivo debería poseer una K_i por debajo del orden nM. Por ello los elevados valores de las constantes de inhibición para el TMP y la Pyr explican por sí mismos porque estos inhibidores no son eficaces frente a la enfermedad de Chagas. Si bien TMP y Pyr no fueron buenos inhibidores de la DHFR de *T. cruzi* no se descarta que algún otro lo pueda ser. De hecho un estudio correspondiente a los efectos de varias 2,4-diaminopirimidinas-5-bencil sustituidas en varios organismos (Roth y col., 1962) mostraron que TMP y Pyr no son necesariamente los inhibidores más potentes de una determinada DHFR. Por otro lado, nuestros resultados apoyan la idea de que cuando el mecanismo de acción de una droga es bien conocido, es lógico tan sólo realizar los estudios in vivo con aquellos compuestos que han sido preseleccionados en base a los resultados de inhibición sobre la enzima.

RO-46-8717, fue el mejor inhibidor de los probados con una constante de inhibición menor de 1 nM. Este compuesto no fue sólo el más potente, sino que además mostró una gran especificidad por el enzima de *T. cruzi*, dado que la K_i para el enzima humano fue de 800 nM. Estos resultados nos movieron a ensayar el fármaco in vivo frente las formas epimastigotas de *T.*

cruzi (Datos no mostrados). Desafortunadamente el compuesto no inhibió el crecimiento de los parásitos, sugiriendo que no se concentra lo suficiente en el interior, bien porque éstos lo degradan, expulsan o limitan su entrada. En este sentido viene a colación que para que una droga pueda ser empleada como fármaco es condición necesaria pero no suficiente el que inhiba de una forma efectiva y selectiva la enzima blanco. Aunque los estudios in vivo no fueron los deseados, el resultado sigue siendo alentador ya que hemos comprobado que es posible la inhibición potente y selectiva de la DHFR-TS *T. cruzi* con antifolatos que tan sólo presentan ligeras modificaciones con respecto a los clásicos.

V.10. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LA DHFR-TS DE *T. CRUZI* CON EL MTX.

El MTX es un análogo del folato que ha sido empleado durante mucho tiempo como agente neoplásico en el tratamiento del cancer y frente a algunas enfermedades de naturaleza autoinmune como la artritis reumatoide. Este compuesto presenta dos características interesantes que nos han movido a analizar su interacción con la DHFR-TS de *T. cruzi*. Por una parte es un extremadamente potente inhibidor de todas las DHFR conocidas -es un inhibidor estequiométrico- y por otra, pertenece a la clase de inhibidores de unión lenta (Morrison y Walsh, 1988).

Como en el caso de las DHFRs (Willians y col., 1979; Stone y col., 1984; Stone y Morrison, 1986; Appleman y col., 1988a) pollo (Stone y col., 1984; Stone y Morrison, 1986) y humano (Appleman y col., 1988b) la unión del MTX a la DHFR-TS de *T. cruzi* conlleva la isomerización del complejo inicial formado con la enzima. La formación del complejo inicial DHFR-NADPH-MTX es rápida, mientras que la isomerización ocurre lentamente aumentando la fuerza con la que se une el MTX. En el caso de la enzima de *T. cruzi* la contribución de este cambio conformacional incrementa la unión MTX en un factor de 47, pasando la constante de inhibición de 0.23 nM para el complejo inhibitorio inicial a 4.2 pM para el proceso global. En comparación en *E. coli* (Appleman y col., 1988a) la contribución de este cambio conformacional a la unión global del MTX es de tan sólo 3 veces, mientras que en humano es de aproximadamente la misma magnitud (60 veces) (Appleman y col., 1988b). El ratio K_I/K_i ha resultado más alto para otras enzimas de vertebrados: $18 \cdot 10^4$ para la de hígado de pollo (Stone y Morrison, 1986); $5.6 \cdot 10^4$ para la de hígado de rata (Roth y Cheng, 1982); y de $0.23 \cdot 10^4$ para la de hígado bovino (Li y col., 1981).

La lenta velocidad de isomerización del complejo inicial DHFR-NADPH-MTX impone un límite superior a la velocidad con la que se puede completar la unión del MTX. Esta viene determinada por k_5 (III.11.14) y su valor es de 2.3 min^{-1} para la DHFR-TS de *T. cruzi* y

corresponde con un $t_{1/2} = 20$ s (tiempo necesario para que el 50% del MTX se una al enzima). Este valor es bastante más elevado que los descritos para las enzimas de humano (1.7 s) y de *E. coli* (2.9 s). La velocidad con la que el MTX se libera del complejo ternario está limitada por k_6 y el valor aparente está indicado por la k_d (IV.13.2). El valor de esta constante para *T. cruzi* es de 0.034 min^{-1} lo cual corresponde con un $t_{1/2}$ de 20 min.

La tabla V.6 contiene el resto de los datos correspondientes a la interacción del MTX con las enzimas de *T. cruzi*, humano y *E. coli*. Como hemos indicado el peso de la isomerización global en la unión global del MTX a la DHFR-TS de *T. cruzi* es semejante a la enzima de humano. Sin embargo, se comprueba que los valores de las constantes que definen el proceso de isomerización (k_5 y k_6) difieren en gran medida de los correspondientes a la DHFR de *E. coli* y humana (Morrison y Walsh, 1988).

Tabla V.6. Comparación de los parámetros cinéticos de la inhibición por MTX de la DHFR-TS de *T. cruzi*, DHFR de *E. coli* y DHFR de humano.

	<i>T. cruzi</i>	Humano ^a	<i>E. coli</i> ^b	Dominio DHFR
Ki(inicial)	230 nM	200 nM	2.4 nM	0.4 nM
k_5 (cte. isom. directa)	2.3 min^{-1}	24 min^{-1}	0.24 min^{-1}	4.7 min^{-1}
k_6 (cte. isom.reversa)	0.051 min^{-1}	0.42 min^{-1}	0.18 min^{-1}	0.11 min^{-1}
k_5/k_6	47	60	1.3	43
KI(Total)	4.9 pM	3.3 pM	1 pM	9.2 pM
$t_{1/2}$ isomerización.	20 s	1.7 s^{-1}	2.9 s^{-1}	10 s
k_d (aparente)	0.034 min^{-1}	0.007 min^{-1}	0.054 min^{-1}	0.04 min^{-1}
$t_{1/2}$ disociación	20 min	96 min	13	17

a Datos de Appleman y col., (1988b)

b Datos de Appleman y col., (1988a)

Para la observación de una unión lenta que involucre un cambio conformacional es necesario que KI sea menor que Ki y esta condición sólo se satisface si $k_6 < k_5$. Además estas constantes deben ser de la magnitud apropiada para que pueda observarse el establecimiento del equilibrio entre enzima e inhibidor. En el caso extremo de k_6 sea cero el inhibidor se convierte en irreversible (Morrison y Walsh, 1988).

El ratio k_5/k_6 puede ser tomado como un índice de la acumulación del complejo inhibitorio EI* (Morrison y Walsh, 1988). Además refleja la extensión en la que KI es menor que Ki y en aquellas condiciones en las que k_6 es despreciable frente k_5 ($KI = K_i k_6 / (k_5 + k_6)$)

equivale al ratio KI/Ki . Su valor puede oscilar entre 1 y 10^6 , y para el enzima de *T. cruzi* es de 45. De igual manera, cuanto mayor es el valor de k_5/k_6 mayor es la vida del complejo EI^* y con ello la probabilidad de que el inhibidor tenga utilidad in vivo como fármaco. La isomerización que sufre el complejo enzima inhibidor determinada la ventaja de estos inhibidores frente los competitivos clásicos: en condiciones clínicas la acumulación de sustrato provocada por la inhibición del enzima tiene poco efecto sobre la isomerización del complejo EI^* , con lo que no hay revesión de la inhibición como ocurre con los inhibidores clásicos.

Se ha propuesto que la unión del MTX -y en general los inhibidores de unión lenta (Morrison y Walsh, 1988)- mimetiza las interacciones en el estado de transición (Williams y col., 1979), y de hecho las estructuras tridimensionales DHFR-NADPH-MTX para los enzimas de *E. coli* y *L. casei* así lo sugieren (Bolin y col., 1982, Bistroff y col., 1990; Bistroff y col., 1991). La idea es que el sitio activo del enzima estaría preparado para la unión del estado basal representado por el sustrato pero no del estado de transición. En estas condiciones el enzima tiene que sufrir considerables reajustes para la unión del estado de transición. Estos reajustes simulan con los cambios conformacionales que sufre el enzima durante la catálisis y se reflejan en forma de la isomerización observada en las curvas de progresión. Hasta ahora no existe ningún tipo de regla que relacionando las estructuras del inhibidor y del enzima prediga el carácter de unión lenta de un inhibidor y la vida media del complejo EI^* . Sin embargo, el entendimiento de las bases moleculares será determinante en el diseño de inhibidores que incorporen el carácter de unión lenta.

V.11. EXPRESION Y PURIFICACION DEL DOMINIO DHFR DE LA DHFR-TS DE *T. CRUZI*.

Aparte del interés de la DHFR-TS de *T. cruzi* como blanco de acción de fármacos, el enzima presenta ciertas peculiaridades que hacen de ella un interesante modelo para la realización de estudios estructurales y cinéticos. Con este ánimo y dado el carácter bifuncional del enzima quisimos saber si era posible expresar los dominios individualmente y que conservaran la actividad catalítica. Los intentos que hicimos en este sentido con el dominio TS fueron infructuosos, sin embargo, no ocurrió así con el dominio DHFR.

Para la expresión del dominio DHFR seguimos el mismo esquema que el escogido para el enzima bifuncional: amplificación por PCR y clonado en el vector de expresión pKK223.3 (Fig. V.6). Para la amplificación del dominio DHFR utilizamos el oligonucleótido sentido empleado en la amplificación de la secuencia completa de la DHFR-TS y otro antisentido en el que introducimos un codon de terminación tras la Asn234 para disponer de una pauta de lectura completa con el dominio DHFR. Como resultado final obtuvimos una construcción, pKTCD,

que contenía una secuencia de 702 pb codificante para el dominio DHFR de La DHFR-TS de *T. cruzi*. (Fig.V.6). La construcción se utilizó para transformar distintas cepas de *E. coli* pudiéndose detectar en todos los casos la expresión de una proteína catalíticamente activa, sin embargo, en todos los casos la proteína representa menos del 1% del total de las proteínas solubles. Por otra parte, pensamos que es posible que el enzima presente cierta toxicidad dado que la expresión disminuye con el tiempo.

Para la purificación del dominio DHFR seguimos el mismo procedimiento descrito para el enzima bifuncional, consistente en una cromatografía de afinidad en una columna de MTX-sefarosa. Sin embargo, la purificación no se logró en un sólo paso, requiriendo una cromatografía adicional, ya sea de intercambio aniónico en una columna mono-Q, o de exclusión molecular en una columna de Superosa-12 (IV.10.2). Tras estas dos cromatografías el dominio DHFR reflejó una sola banda en un gel desnaturizante de poliacrilamida (IV.10.2). El rendimiento para la purificación del dominio DHFR fue bastante menor que el correspondiente al enzima bifuncional (15%) y la cantidad de proteína purificada por litro fue de aproximadamente de 90 µg. El bajo rendimiento obtenido en este caso deriva de los bajos niveles de expresión que tenemos, sin embargo la cantidad de proteína es suficiente para abordar la mayor parte de los estudios de caracterización del enzima. Por otro lado, estamos intentando mejorar el sistema, utilizando para ello otros vectores de expresión.

La disponibilidad de la proteína del dominio DHFR catalíticamente activa nos abre la posibilidad de realizar diferentes estudios que nos permitirán profundizar en el entendimiento de las bases moleculares de la interacción entre dominios, la canalización del sustrato, y las ventajas de un enzima bifuncional frente a los monofuncionales, fenómenos que no sólo no están resueltos sino sobre los que hay resultados contradictorios. Entre otros, será posible realizar experimentos cinéticos acoplados entre TSs y el dominio DHFR y, si las características del dominio DHFR y el enzima bifuncional son semejantes, el trabajar con un enzima más pequeño supone siempre una ventaja. En este sentido los estudios de generación de mutantes y de la cristalización de la proteína se verían facilitados.

V.12. LA ESTABILIDAD Y LAS PROPIEDADES CINÉTICAS DEL DOMINIO DHFR DIFIEREN POCO DE LAS OBSERVADAS EN LA DHFR-TS DE *T. CRUZI*.

V.12.1. Elevada estabilidad.

El dominio DHFR de la DHFR-TS de *T. cruzi* es muy estable y siguió un comportamiento paralelo al observado en el enzima bifuncional: Resistencia a largos periodos

almacenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e inactivación a altas diluciones que es cancelada con la adición de PEG o glicerol en un 80%. IV.16.1. Además cuando la enzima se diluyó en tampón con PEG o glicerol se elevó la actividad hasta en un 80%.

V.12.2. La velocidad disminuye drásticamente a pH básicos y hay activación a una fuerza iónica elevada (CLK).

Las curvas de actividad del dominio DHFR fueron semejantes a las observadas para el enzima bifuncional. Brevemente ambas semejaron el comportamiento de las DHFRs de procariotas frente al pH, sufriendo la actividad una caída súbita a pH básicos (IV.11.1, IV.17.1-2). La adición de CLK activó al dominio con un óptimo idéntico al obtenido para la enzima bifuncional (0.25), aunque el dominio resistió aún más que la enzima bifuncional los valores elevados de CLK.

V.12.3. K_{ms} y k_{cat} fueron similares a la del enzima bifuncional.

El comportamiento cinético del dominio es michaeliano y los valores de las K_{ms} fueron de $15\pm 2\text{ }\mu\text{M}$ y $0.74\pm 0.06\text{ }\mu\text{M}$, para el NADPH y el H_2F respectivamente. Desde nuestro punto de vista son comparables a las obtenidas para el enzima bifuncional por lo que no vamos a discutir las pequeñas diferencias existentes, que bien podrían deberse a errores experimentales. La constante catalítica del dominio DHFR es de $16.4\pm 0.7\text{ s}^{-1}$. Este valor fue calculado considerando a la proteína como monómerica empleando el pM predicho a partir de la secuencia aminoacídica (25768 D). Este valor es aproximadamente la mitad del correspondiente a la enzima bifuncional cuando consideramos para su cálculo el pM del monómero (36 ± 4^{-1}). La disminución en la k_{cat} observada en el dominio se podrían deber, bien a la cancelación de las interacciones existentes con el dominio TS, o bien a la cancelación de las posibles interacciones DHFR-DHFR entre las subunidades del dímero. Sea como fuere, los parámetros cinéticos se correlacionan bastante bien con los obtenidos con el enzima bifuncional, por lo que esas interacciones no son lo suficiente importantes como para conferirle ninguna clara desventaja cinética. Por otra parte, tanto la posibilidad de expresar el dominio catalíticamente activo, como el que los parámetros cinéticos sean similares a los del enzima bifuncional, revelan la autonomía catalítica de la DHFR en el enzima bifuncional.

V.8. TMP, PYR, RO-46-1787 y MTX FUERON PEORES INHIBIDORES DEL DOMINIO DHFR.

Puesto que el comportamiento a nivel de los parámetros cinéticos del dominio DHFR no difiere de los observados para el enzima bifuncional analizamos qué ocurría con el

comportamiento frente a los antifolatos inhibidores de DHFR ensayados para el enzima bifuncional.

TMP, Pyr y RO-46-8717 conservaron el caracter competitivo observado en el enzima bifuncional, pero fueron peores inhibidores del dominio DHFR de lo que lo habían sido para la DHFR del enzima bifuncional, en un factor que oscilo entre 6 para el TMP y la Pyr y 10 para RO-46-8717 (IV.18). En cambio se siguió manteniendo la secuencia en la inhibición, con TMP como el inhibidor más pobre ($K_i = 150$ nM), seguido de Pyr ($K_i = 67$ nM) y con RO-46-8717 como el inhibidor más potente ($K_i = 3.5$ nM).

Tabla V.7. Comparación entre la inhibición sufrida por el dominio DHFR y el enzima bifuncional of *T. cruzi* por varios antifolatos.

	TMP	Pyr K_i(nM)	RO-46-8717
DHFR-TS	25	12	0.35
Dominio DHFR	150	67	3.5

El MTX continuó siendo un inhibidor de unión lenta para el dominio DHFR con una constante de inhibición global ($K_i^* = 9.2$ pM) doble de la obtenida para el enzima bifuncional. El incremento en la constante de inhibición del MTX para el dominio DHFR se correlaciona con el incremento observado en la constante de inhibición de la fase inicial de unión rápida del MTX ($K_i = 0.4$ nM para el dominio y 0.23 nM para el enzima bifuncional). En cambio el cociente k_5/k_6 es el mismo para el dominio y el enzima bifuncional lo que indica que la isomerización del complejo inicial no está afectada, y contribuye en la misma medida que para el enzima bifuncional en la unión global del MTX. Parece lógico que sea la etapa inicial de unión rápida del MTX la afectada con una K_i mayor ya que es lo que ocurre con el resto de inhibidores competitivos. La velocidad de isomerización del complejo E-MTX gobernada por k_5 , es mayor para el dominio DHFR ($k_5 = 4.7$ min⁻¹) pero también lo es la velocidad de isomerización reversa ($k_6 = 0.1$ min⁻¹) con lo que se conserva el valor del cociente. La velocidad de disociación aparente (determinada a partir de los experimentos de intercambio de MTX caliente por frío en el complejo ternario) es de 0.04 min⁻¹ similar a la obtenida para el enzima bifuncional y por ello también lo es la vida media media de ambos complejos, $t_{1/2} = 17$ min (Tabla V.6).

Una vez más las diferencias con el enzima bifuncional son pequeñas aunque no sabemos si atribuir las a la eliminación del dominio TS o a la cancelación de posibles interacciones entre dominios DHFR.

V.9. INTERACCIÓN ENTRE DOMINIOS DHFR-DHFR EN EL ENZIMA BIFUNCIONAL.

Las interacciones entre el dominio DHFR y el TS entre una subunidad del enzima bifuncional existen (Knigton y col., 1994) y derivan del carácter bifuncional del enzima. En cambio existe cierta polémica en cuanto a las interacciones entre los dominios DHFR de subunidades diferentes.

La estequiometría de unión del MTX a la enzima bifuncional de *T. cruzi* es 1 y lo mismo ocurre con la DHFR-TS de *L. major* (Meek y col., 1985). Por lo tanto existe una comunicación funcional entre los dominios DHFR, en tanto que la unión de una molécula de MTX a uno de los dominios previene la unión de otra. En este sentido, la existencia de DHFR monofuncionales dimericas como las correspondientes al fago T4 (Purohit y col., 1981) y al plásmido Tn 7 (Fling y Elwell, 1980) apoyan la posibilidad de la existencia de contactos favorables a nivel de los dominios DHFR en la DHFR-TS.

Contradictoriamente, el dominio DHFR de *T. cruzi* expresado individualmente se comporta como un monómero de pM 20.000 (IV.16.2) y mismo resultado ha sido también descrito para el dominio DHFR de la DHFR-TS de *P. falciparum* (Sirawaraporn y col., 1994). Si bien este resultado no niega las interacciones DHFR-DHFR sí indican que han de ser débiles. Sea como fuere dado que el dominio DHFR parece ser tan eficiente con la enzima bifuncional y presenta un comportamiento similar ni las posibles interacciones DHFR-DHFR ni las existentes con el dominio TS son necesarias para el correcto funcionamiento de la DHFR.

Otro dato que se ha sumado a cerca de las posibles interacciones entre los dominios DHFR lo constituye la estructura cristalina de la DHFR-TS de *L. major* (Knigton y col., 1994), la cual no refleja ningún tipo de contacto entre los dominios DHFR. Sin embargo, este resultado no es definitivo puesto que el cristal fue obtenido con ambos sitios TS ocupados por inhibidores y con los dos sitios DHFR ocupados por MTX, lo que contradice la estequiometría 1:1 previamente demostrada para la unión del MTX. En estas condiciones el cristal de la DHFR-TS podría corresponder con uno en el que se han cancelado las interacciones DHFR-DHFR. De hecho, se ha observado que cuando la TS del enzima bifuncional de *L. major* es inhibida mediante proteólisis parcial (Garvey y col., 1985) o por FdUMP la estequiometría de unión del

MTX aumenta a dos. Por ello, no se descarta que una posterior estructura cristalina para el enzima libre de inhibidores pudiera reflejar la existencia de interacciones DHFR-DHFR.

Es poco probable que la comunicación observada entre los dominios DHFR esté mediada a través de la TS, dado que incluso la inhibición de cualquiera de ellas no repercute en la otra (Meek y col., 1985). Por lo tanto, nosotros apostamos por la existencia de contactos directos entre los dominios DHFR en el enzima bifuncional, sólo que no tienen la entidad suficiente y están asistidos por otros más fuertes correspondientes a la TS. Por ello el dominio se comporta como un monómero, y por ello no se observan en el cristal de la DHFR-TS complejado con inhibidores.

BIBLIOGRAFIA

1. Agabian, N. (1990) Trans Splicing of Nuclear Pre-mRNAs. *Cell* 61, 1157-1160.
2. Ahrweiler, P. M., and Frieden, C. (1988) Construction of a fol Mutant Strain of *Escherichia coli* for Use in Dihydrofolate Reductase Mutagenesis Experiments. *J. Bacteriol.* 170, 3301-3304.
3. Andrews, J., Fierke, C. A., Birdsall, B., Ostler, G., Feeney, J., Roberts, G. C., and Benkovic, S. J. (1989) A Kinetic Study of Wild-Type and Mutant Dihydrofolate Reductases from *Lactobacillus casei*. *Biochemistry* 28, 5743-5750.
4. Appleman, J. R., Howell, E. E., Kraut, J., Kühl, M., and Blakley, R. L. (1988a) Role of Aspartate 27 in the Binding of Methotrexate to Dihydrofolate Reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 9187-9198.
5. Appleman, J. R., Prendergast, N., Delcamp, T. J., Freisheim, J. H., and Blakley, R. L. (1988b) Kinetics of the Formation and Isomerization of Methotrexate Complexes of Recombinant Human Dihydrofolate Reductase. *J. Biol. Chem.* 263, 10304-10313.
6. Appleman, J. R., Beard, W. A., Delcamp, T. J., Prendergast, N. J., Freisheim, J. H., and Blakley, R. L. (1989) Atypical Transient State Kinetics for Recombinant Human Dihydrofolate Reductase Produced by Hysteretic Behavior. *J. Biol. Chem.* 264, 2625-2633.
7. Appleman, J. R., Beard, W. A., Delcamp, T. J., Prendergast, N., Freisheim, J. H., and Blakley, R. L. (1990) Unusual Transient- and Steady-State Kinetic Behavior is Predicted by the Kinetic Scheme Operational for Recombinant Human Dihydrofolate Reductase. *J. Biol. Chem.* 265, 2740-2748.
8. Appleman, J. R., Sirawaraporn, W., Santi, D. V., and Blakley, R. L. (1992) Hysteresis in Catalytic Activities and Complex Kinetics of inhibition are caused by protein conformational changes and domain-domain interactions in recombinant thymidylate synthase-dihydrofolate reductase (TS-DHFR) from *Leishmania major*. Comunicación personal
9. Arnheim, N., and Erlich, H. (1992) Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 131-156.
10. Arrebola, R., Olmo, A., Reche, P., Garvet, E. P., Santi, D. V., Ruiz-Pérez, L. M., and González-Pacanowska, D. (1994) Isolation and Characterization of a Mutant Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase from Methotrexate-Resistant *Leishmania* Cells. *J. Biol. Chem.* 269, 10590-10596.
11. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and struhl, K. (1987-1993) in *Current Protocols in Molecular Biology*. Janssen, K., ed. Published by Greene Publishing Associates Inc. and John Wilwy and Sons inc.
12. Bajorath, J., Kraut, J., Li, Z., kitson, D. H., and Hagler, A. T. (1991a) Theoretical Studies on the Dihydrofolate Reductase Mechanism: Electronic Polarization of Bound Substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6423-6426
13. Bajorath, J., Li, Z., Fitzgerald, G., Kitson, D. H., Farnum, M., Fine, R. M., Kraut, J., and Hagler, A. T. (1991b) Changes in the Electron Density of the Cofactor NADPH on Binding to *E. coli* Dihydrofolate Reductase. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 11, 263-270
14. Beard, W. A., Appleman, J. R., Delcamp, T. J., Freisheim, J. H., and Blakley, R. L. (1989) Hydride Transfer by Dihydrofolate Reductase. Causes and Consequences of the Wide Range of Rates Exhibited by Bacterial and Vertebrate Enzymes. *J. Biol. Chem.* 264, 9391-9

15. Belfort, M., Moelleken, A., Maley, G. F., and Maley, F. (1983) Purification and Properties of T4 Phage Thymidylate Synthetase Produced by the Cloned Gene in an Amplification Vector. . J. Biol. Chem. 258, 2045-2051
16. Ben Amar, M. F., Jefferies, D., Pays, A., Bakalara, N., Kendall, G., and Pays, E. (1991) The Actin Gene Promoter of *Trypanosoma brucei*. Nucleic Acids Res. 19, 5857-5862
17. Benkovic, s. J., and Bullard, W. P. (1973) On the Nechanisms of Action of Folic Acid Cofactors. Prog. Biorg. Chem. 2, 133-175
18. Bernards, A., Mihels, P. A. M., Licke, C. R., and Borst, P. (1983) Growth of Chromosome Ends in Multiplying Trypanosomes. Nature 303, 592-597
19. Bertino, J. R., Srimatkandada, S., Carman, M. D., Mini, E., Jastreboff, M., Moroson, B.m A., and Dube, S. K. (1985a) Mechanisms of Drug Resistance in Human Leukemia. (Neth, R., Gallo, R. C., Greaves, M. F., Janka, G., eds) Modern Trends in Human Leukemia VI. Berlin, Springer-Verlag, Berlin
20. Bertino, J. R., Mini, E., Sobrero, A., Moroson, B. A., Love, T., Jastreboff, M., Carmen, M., Srimatkandada, S., and Dube, S. (1985b) Methotrexate Resistant Cells as Targets for Selective Chemotherapy. Weber, G., ed. Advances in Enzyme Regulation, Pergamon, New York 4, 3-12
21. Beverley, S. M., Coderre, J. A., Santi, D. V., and Schimke, R. T. (1984) Unstable DNA Amplifications in Methotrexate-Resistant *Leishmania* Consist of Extrachromosomal Circles which Relocalize During Stabilization. . Cell 38, 431-9
22. Beverley, S. M., Ellenberger, T. E., and Cordingley, J. S. (1986) Primary Structure of the Gene Encoding the Bifunctional Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase of *Leishmania major*. . Proc Natl Acad Sci U S A 83, 2584-8
23. Beverley, S. M., Ellenberger, T. E., Iovannisci, D. M., Kapler, G. M., Petrillo-Peixoto, M., and Sina, B. J. (1988) Gene Amplification in *Leishmania*. In The Biology of Parasitism ed) pp.431-448, Alan R. Liss, Inc,
24. Beverley, a. C. (1990)
25. Beverley, S. M., and Clayton, C. E. (1991) Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei*. In Protocols in Molecular Parasitology ed)
26. Bishop, R. P., and Miles, M. A. (1987) Chromosome Size Polymorphisms in *Leishmania odnovani*. MOl. Biochem. Parasitol. 24, 263-272
27. Blakley, R. L. (1960) Crystalline Dihydropteroylglutamic Acid. Nature 188, 231-232
28. Blakley, R. L. (1969) The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines. New York, John Wiley and Sons Inc., Pages
29. Blakley, R. L. (1984) Dihydrofolate Reductase. In Folates and Pterins (Blakley, R. L. a. B., S. J. eds., ed) Vol 1, pp.191-253, John Wiley, New York
30. Bolin, J. T., Filman, D. J., Matthews, D. A., Hamlin, R. C., and Kraut, J. (1982) Crystal Structures of *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei* Dihydrofolate Reductase Refined at 1.7 Å Resolution. I. General Features and Binding of Methotrexate. . J. Biol. Chem. 257, 13650-62

31. Booth, R. G., Selassie, C. D., Hansch, C., and Santi, D. V. (1987) Quantitative Structure-Activity Relationship of Triazine-Antifolate Inhibition of *Leishmania* Dihydrofolate reductase and cell growth. *J. Med. Chem.* 30, 1218-24
32. Borst, P., van der Ploeg, M., van Hoek, J. F. M., Tas, J., and James, J. (1982) On the DNA Content and Ploidy of Trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 13-23
33. Borst, P. (1986) Discontinuous Transcription and Antigenic Variation in Trypanosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 701-732
34. Borst, P. (1991) Why Kinetoplast DNA Networks? *Trends Genet.* 7, 139-141
35. Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Anal. Biochem.* 131, 499-503
36. Brener, Z. (1980) Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* 18, 247-292
37. Brodgen, R. N. y. c. (1982) Trimethoprim: Review of Antibacterial Activity, Pharmacokinetics and Therapeutic Use. *Drugs* 23, 405-430
38. Bullock, W. O., Fernandez, J. M., and Short, J. M. (1987) xL1Blue: A High Efficiency Plasmid Transforming *recA* *Escherichia coli* Strain With Beta-Galactosidase Selection. *BioTechniques* 5, 376-378
39. Burchall, J. J. (1979) The Development of the Diaminopyrimidines. *J. Antimicrob. Chemother. (Suppl.B)* 5, 3-14
40. Bystroff, C., Oatley, S. j., and Kraut, J. (1990) Crystal Structures of *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase: Substrate Binding and a Model for the Transition State. *Biochemistry* 29, 3263-3277
41. Bystroff, C., and Kraut, J. (1991) Crystal Structure of Unliganded *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase Ligand-Induced Conformational Changes and Cooperativity in Binding. *Biochemistry* 30, 2227-2239
42. Bzik, D. J., Li, W. B., Horii, T., and Inselburg, J. (1987) Molecular Cloning and Sequence Analysis of the *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8360-4
43. Carle, G. F., and Olson, M. (1986) An Electrophoretic Karyotype for Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3756-3760
44. Carrington, H. C., Crowther, A. F., Darey, D. G., Levi, A. A., and Rose, F. L. (1951) A Metabolite of Paludrine With High Antimalarial Activity. *Nature* 168, 1080
45. Castro, C., Hernández, R., and Castañeda, M. (1981) *Trypanosoma cruzi* Ribosomal RNA: Internal Break in the Large Molecular Mass Species and Number of Genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 219-233
46. Castro, S. L. (1993) The Challenge of Chagas' Disease Chemotherapy: An Update of Drugs Assayed Against *Trypanosoma Cruzi*. *Acta Tropica* 53, 83-98
47. Cazzulo, J. J., Franke de Cazzulo, B. M., Engel, J. C., and Cannata, J. J. B. (1985) End Products and Enzyme Levels of Aerobic Glucose Fermentation in Trypanosomatids. 16, 329-343

48. Cazzulo, J. J., y col (1989) 33, 33-42
49. Cella, R., Carbonera, D., Orsi, R., Ferri, G. and Ladarola, P. (1991) Proteolytic and Partial Sequencing Studies of the bifunctional Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase from *Daucus carota*. *Plant molec. Biol.* 16, 975-982
50. Chamberlin, A. R., Cheung, Andrew, P. K., and Lim, P. (1976) Methotrexate. In *Analytical Profiles of Drug Substances* (Florey, E., ed) Vol 5, pp.283-306, Academic Press, New York
51. Chang, K. P., Fong, D., and Bray, R. S. (1985) Biology of *Leishmania* and Leishmaniasis. In *Leishmaniasis* (Chang/Bray, e., ed) Vol 1, pp.1-30, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam
52. Chou, y. F. (1978) Estructura secuendaria.
53. Chu, G., Vollrath, D., and Davis, R. (1986) Separation of Large DNA Molecules by Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields. *Science* 234, 1582-1585
54. Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989) One-Step Preparation of Competent *Escherichia coli*: Transformation and Estorage of Bacterial Cells in the Same Solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 86, 2172-2175
55. Chung, H.-M. M., Lee, M. G.-S., Dietrich, P., Huang, J., and Van der Ploeg, L. H. T. (1993) Disruption of Largest Subunit RNA Polymerase II Genes in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cel. Biol.* 13, 3734-3743
56. Cisneros, R. J., Silks, L. A., Dunlap, R. B. (1988) Mechanistic Aspects of Thymidylate Synthase: Molecular Basis for Drug Design. *Drugs of the Future* 13, 859-881
57. Coderre, J. A., Beverley, S. M., Schimke, R. T., and Santi, D. V. (1983) Overproduction of a Bifunctional Thymidylate Synthetase-Dihydrofolate Reductase and DNA Amplification in Methotrexate-Resistant *Leishmania tropica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U .S. A.* 80, 2132-6
58. Cody, V., Luft, J. R., Ciszak, E., Kalman, T. I., and Freisheim, J. H. (1992) Crystal Structure Determination at 2.3 Å of Recombinant Human Dihydrofolate Reductase Ternary Complex with NADPH and Methotrexate-Gamma-Tetrazole. *Anticancer Drug Des.* 7, 483-491
59. Cornelissen, A. W. C. A. y. c. (1986) *Nucleic. Acids Res.* 14, 5605-5614
60. Cowan, K. H., and Jolivet, J. (1984) A Methotrexate-Resistant Human Breast Cancer Cell Line with Multiple Defects, Including Diminished Formation of Methotrexate Polyglutamates. *J. Biol. Chem.* 259, 10793-800
61. Daron, H. H., Aull, J. L. (1978) A Kinetic Study of Thymidylate Synthase from *Lactobacillus casei*. *J. Biol. Chem.* 253, 940-945
62. De Grave, y. c. (1988)
63. De lange, T., Liu, A. Y. C., Van der Ploeg, L. H. T., Borst, P., Tromp, M. C., and 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
64. Dev, I. K., Dallas, W. S., Ferone, R., Hanlon, M., Mckee, D. D., and Yates, B. B. (1994) Mode of Binding of Flate Analogos to Thymidylate Synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 1873-1882

65. Dietrich, P., Soares, M. B., Affonso, M. H.T., and Floeter-Winter, L. M. (1993) The *Trypanosoma cruzi* Ribosomal RNA-encoding Gene: Analysis of Promoter and Upstream Intergenic Spacer Sequences. *125*, 103-107
66. Edman U., E., J. C., Lundgren, B., and Santi, D. V. (1989) Isolation and Expression of the *Pneumocystis carinii* Thymidylate Synthase Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6503-6507
67. Erickson, J. S., and Mathews, C. K. (1972) Spectral Changes Associated With Binding of Folate Compounds to Bacteriophage T4 Dihydrofolate Reductase. *J. Biol. Chem.* 247, 5661-5667
68. Falzone, C. J., Benkovic, S. J., and Wright, P. E. (1990) Partial ¹H NMR Assignments of the *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase Complex with Folate: Evidence for a Unique Conformation of Bound Folate. *Biochemistry* 29, 9667-9677
69. Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983) A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13
70. Ferone, R., and Roland, S. (1980) Dihydrofolate Reductase- Thymidylate Synthase, a Bifunctional Polypeptide from *Crithidia fasciculata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 5802-6
71. Ferone, R. (1984) Dihydrofolate Reductase Inhibitors. In: *Antimalarial Drugs. Vol. II. Handbook Experimental Pharmacology.* (Peter, W., and Richards, W. H. G., eds.) 68, 207-221. Springer-Verlag. New York.
72. Fierke, y. c. (1987)
73. Filman, D. J., Bolin, J. T., Matthews, D. A., and Kraut, J. (1982) Crystal Structures of *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei* Dihydrofolate Reductase Refined at 1.7 Å Resolution. II. Environment of Bound NADPH and Implications for Catalysis. *J. Biol. Chem.* 257, 13663-72
74. Finer-Moore, J. S., Montfort, W. R., and Stroud, R. M. (1990) Pairwise Specificity and Sequential binding in Enzyme Catalysis: Thymidylate Synthase. *Biochemistry* 29, 6977-6986
75. Finer-Moore, J., Fauman, E. B., Foster, P. G., Perry, K. M., Santi, D. V., and Stroud, R. M. (1993) Refined Structures of Substrate-bound and Phosphate-bound Thymidylate Synthase from *Lactobacillus casei*. *J. Mol. Biol.* 232, 1101-1116
76. Fling, M. E., and Elwell, L. P. (1980) Protein Expression in *Escherichia coli* Mini Cells Containing Plasmids Specifying Trimethoprim-Resistant Dihydrofolate Reductases. *J. bacteriol.* 141, 779-785
77. Florkin, M. (1974) Concepts of Molecular Biosemiotics and of Molecular Evolution. Florkin, M., and Stotz, E. H., eds. *Comprehensive Biochemistry* 29A, 1-224, Elsevier, Amsterdam
78. Foo, S. K., and Shane, B. (1982) Regulation of Folylpoly-g-Glutamate Synthesis in Mamalian Cells: In Vivo and In Vitro Synthesis of Pteroylpoly-g-Glutamates by Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Biol. Chem.* 257, 13587-13592
79. Foote, S. J., Galatis, D., and Cowman, A. F. (1990) Amino Acids in the Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Gene of *Plasmodium falciparum* Involved in Cycloguanil Resistance Differ from Those Involved in Pyrimethamine Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3014-7

80. Fragoso, a. g. (1992)
81. Frieden, C. (1970) Kinetic Aspects of Regulation of Metabolic Processes. Hysteretic Enzyme Concept. *J. Biol. Chem.* 245, 5788-5799
82. Futterman, S. J. (1957) Enzymic Reduction of Folic Acid and Dihydrofolic Acid to Tetrahydrofolic Acid. *J. Biol. Chem.* 228, 1031-1038
83. Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. (1978) Analysis of the Accuracy and Implications of Simple Globular Proteins. *J. Mol. Biol.* 120, 97-120
84. Garrett, C. E., Coderre, J. A., Meek, T. D., Garvey, E. P., Claman, D. M., Beverley, S. M., and Santi, D. V. (1984) A Bifunctional Thymidylate Synthetase-Dihydrofolate Reductase in Protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 11, 257-65
85. Garvey, E. P., and Santi, D. V. (1985) Limited Proteolysis of the Bifunctional Thymidylate Synthase-Dihydrofolate Reductase from *Leishmania tropica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7188-92
86. Garvey, E. P., Coderre, J. A., and Santi, D. V. (1985) Selection and Properties of *Leishmania tropica* Resistant to 10-Propargyl-5,8-Dideazafolate, an Inhibitor of Thymidylate Synthetase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17, 79-91
87. Garvey, E. P., and Santi, D. V. (1986) Stable Amplified DNA in Drug-Resistant *Leishmania* Exists as Extrachromosomal Circles. *Science* 233, 535-540
88. Gerothanassis, I. P., Birdsall, B., Bauer, C. J., Frenkiel, T. A., and Feeney, J. (1992) Nuclear Magnetic Resonance Detection of Bound Water Molecules in the Active Site of *Lactobacillus casei* Dihydrofolate Reductase in Aqueous Solution. *J. Mol. Biol.* 226, 549-554
89. Gibson, W. C., Osinga, K., Michels, P. A. M., and Borst, P. (1985) Trypanosomes of Trypanozoan Are Diploid for Housekeeping Genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 231-242
90. Gibson, W. C., and Miles, A. (1986) The Karyotype and Ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* 5, 1299-1305
91. Gibson, W. C., and Borst, P. (1986) Size-Fractionation of the Small Chromosomes of Trypanozoon and *Nannomonas* Trypanosomes by Pulsed Field Gradient gel Electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18, 127-140
92. Glew, R. H., Saha, A. K., Das, S., and Remaley, A. T. (1988) Biochemistry of the *Leishmania* Species. *Microbiol. Rev.* 52, 412-432
93. Gonzalez, A., Lerner, T., Huecas, M., Sosa-Pineda, B., and Lizardi, P. (1985) Apparent Generation of a Segmented mRNA from two Separate Tandem Gene Families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.* 13, 5789-5804
94. Gonzalez, A., Rosales, J. L., Ley V., and Díaz C. (1990) Cloning and Characterization of a Gene Coding for a Protein (KAP) Associated with the Kinetoplast of Epimastigotes and Amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40, 233-244
95. Gorla, N. B., Ledesma, O. S., Barbieri, G., and Larripa, I. B. (1988) Assessment of Cytogenetic Damage in Chagasic Children Treated with Benznidazole. *Mutation Res.* 206, 212-220

96. Gorla, N. B., Ledesma, O. S., Barbieri, G., and Larripa, I. B. (1989) Thirteenfold Increase of Chromosomal Aberrations Non-Randomly Distributed in Chagasic Children Treated with Nifurtimox. *Mutation Res.* 224, 263-267
97. Gottesdiener, K., Chung, H.-M., Brown, S., Lee, M. G.-S., and Van der Ploeg, L. H. T. (1991) Characterization of GSG Gene Expression Site Promoters and Promoter-Associated DNA Rearrangement Events. *Mol. Cel. Biol.* 11, 2467-2480
98. Grondal, E. J. M., Evers, R., and Cornelissen, A. W. C. A. (1990) Identification and Sequence Analysis of the ribosomal DNA Promoter Region of *Crithidia fasciculata*. *Nucleic Acids Res.* 18, 1333-1338
99. Grossman, P. L., and Remington, J. S. (1979) The Effect of Trimethoprim and Sulfamethoxazole on *Toxoplasma gondii* in Vitro and in Vivo. *Am. J. Tro. Med. Hyg.* 28, 445-455
100. Grumont, R., Washtien, W. L., Caput, D., and Santi, D. V. (1986) Bifunctional Thymidylate Synthase-Dihydrofolate Reductase from *Leishmania tropica*: Sequence Homology With the Corresponding Monofunctional Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5387-5391
101. Grumont, R., Sirawaraporn, W., and Santi, D. V. (1988) Heterologous Expression of the Bifunctional Thymidylate Synthase-Dihydrofolate Reductase from *Leishmania major*. *Biochemistry* 27, 3776-3784
102. Hajduk, S., L., Haris, M. E., and Pollard, V. W. (1993) RNA Editing in Kinetoplastid Mitochondria. *FASEB J.* 7, 54-63
103. Hammond, D. J., and Gutteridge, W. E. (1981) UMP Biosynthesis in the Kinetoplastida. *Biochim. Biophys. Acta* 718, 1-10
104. Hammond, D. J., and Gutteridge, W. E. (1984) Purine and Pyrimidine Metabolism in the Trypanosomatidae. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13, 243-261
105. Hanahan, D. (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* With Plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580
106. Hardy, L. W., Finer-Moore, J. S., Montfort, W. R., Jones, M. O., Santi, D. V., and Stroud, R. M. (1987) Atomic Structure of Thymidylate Synthase: Target for Rational Drug Design. *Science* 235, 448-455
107. He, M., Wilde, A., and Kaderbhai, M. A. (1990) A Simple Single-Step Procedure for Small-Scale Preparation of *Escherichia coli* Plasmids. *Nucleic Acids Res.* 18, 1660
108. Henriksson, J., Åslund, L., Macina, R. A., Franke de Cazzulo, B. M., Cazzulo, J. J., Frasch, A. C. C., and Pettersson, U. (1990) Chromosomal Localization of Seven Cloned Antigen Genes Provides Evidence of Diploidy and Further Demonstration of Karyotype Variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42, 213-224
109. Hightower, R. C., Wong, M. L., Ruiz, P. L., and Santi, D. V. (1987) Electron Microscopy of Amplified DNA Forms in Antifolate-Resistant *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* 262, 14618-14624
110. Hillcoat, B. L., Nixon, P. F., and Blakley, R. L. (1967) Effect of Substrate Decomposition on the Spectrophotometric Assay of Dihydrofolate Reductase. *Analytical Biochemistry* 21, 178-189

111. Howell, E. E., Villafranca, J. E., Warren, M. S., Oatley, S. J., and Kraut, J. (1986) Functional Role of Aspartic Acid-27 in Dihydrofolate Reductase Revealed by Mutagenesis. . *Science* 231, 1123-1128
112. Huang, J., Van der Ploeg, L. H. T. (1991) Requirement of a Polypyrimidine Tract for Trans-Splicing in Trypanosomes: Discriminating the PARP Promoter from the Immediately Adjacent 3' Splice Acceptor Site. *EMBO J.* 10, 3877-3785
113. Hug, m., Carruthers, V. B., Hartmann, C., Sherman, D. S., Cross, G. A. M., Clayton, C. (1993) A Possible Role for the 3'-Untranslated Region in Development Regulation in *Trypanosma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 87-96
114. Hughes, D. E., Shonekan, O. A., and Simpson, L. (1989) Structure, Genomic Organization and Transcription of the Bifunctional Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Gene from *Crithidia fasciculata*. . *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 155-166
115. Huynh, T. V., y col. (1985) in *DNA Clonning*. Volume 1 ed. Glover, D. M. IRL Press Limited, Oxford, England., 56-110
116. Iovannisci, D. M., Goebel, D., Allen, K., Kaur, K., and Ullman, B. (1984) Genetic Analysis of Adenine Metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes: Evidence for Diploidy at the Adenine Phosphoribosyltransferase locus. *J. Biol. Chem.* 259, 14617-14623
117. Iovannisci, D. M. a. B., S. M. (1989) Structural Alterations of Chromosome 2 in *Leishmania major* as Evidence for Diploidy, Including Spontaneous Amplification of Mini-Exon Array. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 177-188
118. Ivanetich, K. M., and Santi, D. V. (1990) Bifunctional Thymidylate Synthase-Dihydrofolate Reductase in Protozoa. . *FASEB J.* 4, 1591-1597
119. Jackson, R., Standart, N. (1990) Do the Poly(A) Tail and 3' Untranslated Region Control mRNA Translation? *Cell* 62, 15-24
120. Jolivet, J., Cowan, K. H., Curt, G. A., Clendeninn, N. J., and Chabner, B. A. (1983) The Pharmacology and Clinical Use of Methotrexate. . *N. Engl. J. Med.* 309, 1094-1104
121. Jones, N. C., Rigby, P. W. J., Ziff, E. B. (1988) Trans-Acting Protein Factors and the Regulation of Eukaryotic Transcription: Lessons from Studies on DNA Tumor Viruses. *Genes & Development* 2, 267-281
122. Kamb, A., Finer-Moore, J. S., and Stroud, R. M. (1992) Cofactors Triggers the Conformational Change in Thymidylate Synthase: Implications for and Ordered Binding Mechanism. *Biochemistry* 31, 12876-12884
123. Kamb, A., Finer-Moore, J., Calvert, A. H., and Stroud, R. (1993) Structural Basis of Recognition of Polyglutamyl Folates by Thymidylate Synthase. *Biochemistry* 41, 9883-9890
124. Kapler, G. M., and Beverley, S. M. (1989) Transcriptional Mapping of the Amplified Region Encoding the Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase of *Leishmania major* Reveals a High Density of Transcripts, Including Overlapping and Antisense RNAs. . *Mol. Cell. Biol.* 9, 3959-3972
125. Kapler, G. M., Zhang, K., and Beverley, S. M. (1990) Nuclease Mapping and DNA Sequence Analysis of Transcripts from the Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase (R) Region of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res.* 18, 6399-6408

126. Knighton, D. R., Kan, C.-C., Howland, E., Janson, C. A., Hostomska, Z., Welsh, K., and Matthews, D. A. (1994) Structure of and Kinetic Channelling in Bifunctional Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase. *Structural Biology* 1, 186-194
127. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
128. LaFon, S. W., Nelson, D. J., Berens, R. L., and Marr, J. J. (1982) Purine and Pyrimidine Salvage Pathways in *Leishmania donovani*. *Biochem. Pharmacol.* 31, 231-238
129. Laird, W. P. (1989) Trans Splicing in Trypanosomes-Archaism or Adaptation. *Trends Genet.* 5, 204-208
130. Lanar, D. E., Levy, L. S., and Manning, J. E. (1981) tamaño de genoma. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 327-341
131. Lazar, G., Zhang, H., and Goodman, H. M. (1993) The Origin of the Bifunctional Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Isogenes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 3, 657-668
132. LeBowitz, J. H., Smith, H. Q., Rusche, L., and Beverley, S. M. (1993) poliadeni. *Genes & Dev.* 7, 996-1007
133. Leon, y. c. (1980) tamaño macicxirculos.
134. Li, R. L., Dietrich, S. W., and Hansch, C. (1981) *J. Med. Chem.* 24, 538-544
135. Lockskin, A., and Danenberg, P. V. (1980) Hydrodynamic Behavior of Human and Bacterial Thymidylate Synthases and Thymidylate Synthase-5-Fluoro-2'-Deoxyuridylate-5,10-Methylenetetrahydrofolate Complexes: Evidence for Large Conformational Changes During Catalysis. *Biochemistry* 31, 6038-6044
136. Loutfy, M. A., and Aboul-Enein, H. Y. (1983) *Analytical Profiles of Drug Substances*. New York, Academic Press, Pages
137. Maley, G. F., Maley, F., and Baugh, C. M. (1982) Studies on Identifying the Folylpolyglutamate Binding Sites of *Lactobacillus casei* Thymidylate Synthase. *Archs. Biochem. Biophys.* 216, 551-558
- 138.
139. Martínez-Calvillo, S., and Hernández, R. (1994) *Trypanosmma cruzi* Ribosomal DNA: Mapping of a Putative Distal Promoter. *Gene* 142, 243-247
140. Matthews, D. A., Bolin, J. T., Burrige, J. M., Filman, D. J., Volz, K. W., Kaufman, B. T., Beddell, C. R., Champness, J. N., Stammers, D. K., and Kraut, J. (1985a) Refined Crystal Structures of *Escherichia coli* and Chicken Liver Dihydrofolate Reductase Containing Bound Trimethoprim. *J. Biol. Chem.* 260, 381-391
141. Matthews, D. A., Bolin, J. T., Burrige, J. M., Filman, D. J., Volz, K. W., and Kraut, J. (1985b) Dihydrofolate Reductase. The Stereochemistry of Inhibitor Selectivity. *J. Biol. Chem.* 260, 392-9
142. Matthews, R. B., Ghose, C., Green, J. M., Matthews, K. D. and Dunlap, R. B. (1987) Folylpolyglutamates as Substrates and Inhibitors of Folate-dependent enzymes. *Advances in Enzyme Regulation* 26,

143. Matthews, D. K., Moen, L. K., Want, Y., and Sargent, R. G. (1988) Intracellular Organization of DNA Precursor Biosynthetic enzymes. *TIBS* 13, 394-397
144. Matthews, d. A., Appelt, K., Oatley, S. J., and Xuong, N. H. (1990a) Crystal Structure of Escherichia coli Thymidylate Synthase Containing Bound 5-Fluoro-2'-deoxyuridylate and 10-Propargyl-5,8-dideazafolate. *J. Mol. Biol.* 214, 923-936
145. Matthews, D. A., Villafranca, J. E., Janson, C. A., Smith, W. W., Welsh, K., and Freer, S. (1990b) Stereochemical Mechanism of Action for Thymidylate Synthase Based on the X-ray Structure of the Covalent Inhibitory Ternary Complex with 5-Fluoro-2'-deoxyuridylate and 5,10-Methylenetetrahydrofolate. *J. Mol. Biol.* 214, 937-948
146. McDougald, L. R. (1982) Chemotherapy of Coccidiosis. In *the Biology of Coccidia* (Long, P. L., ed.) 373-428. University Press. Baltimore.
147. McGuire, J. J., Hsieh, P., and Bertino, J. R. (1983) Studies on the Substrate Specificity of Mammalian Folylpolyglutamate Synthase. Blair, J. A., ed. *Chemistry and Biology of Pteridines* 615-619, De Gruyter, Berlin.
148. Meek, T. D., Garvey, E. P., and Santi, D. V. (1985) Purification And Characterization Of The Bifunctional Thymidylate Synthetase-Dihydrofolate Reductase From Methotrexate-Resistant *Leishmania tropica*. *Biochemistry* 24, 678-86
149. Messing, J. (1983) New M13 Vectors For Cloning. *Meth. Enzymol.* 101, 20-78
150. Montfort, W. R., Perry, K. M., fauman, E. B., Finer-Moore, J. S., Maley, G. F., Hardy, L., Maley, F., and Stroud, R. M. (1990) Structure, Multiple Site Binding, and Segmental Accommodation in Thymidylate Synthase on binding dUMP and anti-Folate. *Biochemistry* 29, 6964-6977
151. Moore, M. a., Ahmed, F., and Dunlap, R. B. (1986) Evidence for the Existence of Covalent Nucleotide-Thymidylate synthase complexes, Identification of Site Attachment and Enhancement by folates. *J. Biol. Chem.* 261, 12745-12749
152. Moro y col. (1995)
153. Morrison, J. F., and Walsh, C. T. (1988) The Behavior And Significance Of Slow-Binding Enzyme Inhibitors. *Advanc. Enzymol.* 61, 201-301
154. Munich, M. J., and Boothroyd, J. C. (1988) Polycistronic Transcripts In Trypanosomes And Their Accumulation During Heat Shock: Evidence For a Precursor Role In mRNA Synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3837-3846
155. Nelson, K., Alonso, G., Langer, P. J., and Beverley, S. M. (1990) Sequence Of The Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase (DHFR-TS) Gene Of *Leishmania amazonensis*. *Nucleic Acids Res.* 18,
156. Nussensweig, V., Biancalana, A., Amato Neto, V., Sontang, R., Freitas, J. L. P., and Kloetzel, J. (1953) Açaõ da Violeta de Genciana sobre *Trypanosoma cruzi* "in Vitro": Sua Importância na Esterilização de Sangue Destinado à Transfusão. *Revta. Paul. Med.* 42, 57-58
157. Oefner, C., Darcy, A., and Winkler, F. K. (1988) Crystal Structure of Human Dihydrofolate Reductase Complexed With Folate. *Eur. J. Biochem.* 174, 377-85
158. Opperdoes, F. R. (1987) Compartmentation of Carbohydrate Metabolism in Trypanosomes. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 127-151

159. Padgett, R. A., Grabowski, P. J., Konarska, S. S., and Sharp, P. (1986) Splicing of Messenger RNA Precursors. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1119-1150
160. Pascal, R. A., Trang, N. L., Cerami, A., and Walsh, C. (1983) Purification and Properties of Dihydroorotate Oxidase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry* 22, 171-178
161. Penner, M. H., and Frieden, C. (1985) Substrate-Induced Hysteresis in the Activity of *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase. *J. Biol. Chem.* 260, 5366-9
162. Penner, M. H., and Frieden, C. (1987) Kinetic Analysis of the Mechanism of *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase. *J. Biol. Chem.* 262, 15908-15914
163. Perry, K. L., Watkins, K. P., and Agabian, N. (1987) Trypanosome mRNAs Have Unusual "Cap 4" Structures Acquired by Addition of a Spliced Leader. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8190-8194
164. Perry, K. M., Fauman, E. B., Finer-Moore, J. S., Montfort, W. R., Maley, G. F., Maley, F., and Stroud, R. M. (1990) Plastic Adaptation Toward Mutations in Proteins: Structural Comparison of Thymidylate Synthases. *Proteins: structure, function, and Genetics* 8, 315-33
165. Perry, a. A. (1991) Utilidades trasplicing.
166. Perry, K. M., Carreras, C. W., Chang, L. C., Santi, D. V., and Stroud, R. M. (1993) Structures of Thymidylate Synthase with a C-Terminal Deletion: Role of the C-Terminus in Alignment of 2'-Deoxyuridine and 5,10-Methylenetetrahydrofolate. *Biochemistry* 32, 7116-7125
167. Peters, W. (1984) Drug Combinations. in Peters W, Richards WHG (eds): *Antimalarial Drugs*. 2, 225. Springer-Verlag, New-York.
168. Peterson, D. S., Mihous, W. K., and Wellems, T. E. (1990) Molecular Basis Of Differential Resistance To Cycloguanil And Pyrimethamine In *Plasmodium falciparum* Malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3018-3022
169. Pollard, V. W., Rohrer, S. P., Michelotti, E. F., Hancock, K., and Hajduk, S. L. (1990) Organization of Minicircle Genes for Guide RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 63, 783-790
170. Puertas, y. c. (1994)
171. Purohit, S., Bestwick, R. K., Lasser, G. W., Rogers, C. M., and Mathews, C. K. (1981) T4 Phage Coded Dihydrofolate Reductase. *J. Biol. Chem.* 256, 9121-9125
172. Radloff, R., Bauer, W., and Vinograd, J. (1967) A Dye-Buoyant-Density Method For The Detection And Isolation Of Closed Circular Duplex DNA: The Closed Circular DNA In HELA Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 1514-1521
173. Roos, D. S. (1993) Primary Structure Of The Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Gene From *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 268, 6269-6280
174. Roth, B., Falco, E. A., Hitchings, G., and Bushby, S. R. M. (1962) 5-Benzil-2-4-Diaminopyrimidines as Antibacterial Agents. *J. Med. Pharm. Chem.* 5, 1103-1123
175. Roth, B., and Cheng, C. C. (1982) *Prog. Med. Chem.* 19, 269-331
176. Salcedo, y. c. (1994)

177. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Pages
178. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
179. Santi, D. V., and Danenberg, P. V. (1984) Folates in Pyrimidine Nucleotide Biosynthesis. In: *Folates and Pterins*. R. L. Blakey and S. j. Benkovic (Eds.). John Wiley & Sons: New York 345-398
180. Santi, D. V., McHenry, C. S., Raines, R. T., and Ivanetich, K. M. (1987) Kinetics and Thermodynamics of the Interaction of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridilate with Thymidylate Synthase. *Biochemistry* 26, 8606-8613
181. Sather, S., and Agabian, N. (1985) A 5' Spliced Leader is Added in Trans to Both α - and β -Tubulin Transcripts in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5695-5699
182. Schimke, R. T., Alt, F. W., Kellems, R. E., Kaufman, R. J., and Bertino, J. R. (1978) Amplification Of Dihydrofolate Reductase Genes In Methotrexate-Resistant Cultured Mouse Cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2, 649-657
183. Schwartz, D. C., and Cantor, C. R. (1984) Separation Of Yeast Chromosome-Sized DNAs By Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. *Cell* 37, 67-75
184. Schweitzer, B. I., Srimatkandada, S., Gritsman, H., Sheridan, R., Venkataraghavan, R., and Bertino, J. R. (1989) Probing the Role of Two Hydrophobic Active Site Residues in the Human Dihydrofolate Reductase by Site-Directed Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 264, 20786-20795
185. Schweitzer, B. I., Dicker, A. P., and Bertino, J. R. (1990) Dihydrofolate Reductase As A Therapeutic Target. *FASEB J.* 4, 2441-2452
186. Sharkey, A., Langsley, G., Patarapotikul, J., Mercereau-Puijalon, O., McLean, A. P., and Walliker, D. (1988) Chromosome Size Variation in the Malaria Parasite of Rodents, *Plasmodium chabaudi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24,
187. Simpson, L. (1987) The Mitochondrial Genome Of Kinetoplastid Protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication And Evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 363-382
188. Simpson, L., and Shaw, J. (1989) RNA Editing And The Mitochondrial Cryptogenes Of Kinetoplastida Protozoa. *Cell* 57, 355-366
189. Simpson, L. (1990) RNA editing- a novel genetic phenomenon? *Science* 250, 512-513
190. Sirawaraporn, W., Sertsriwanich, R., Booth, R. G., Hansch, C., Neal, R. A., and Santi, D. V. (1988) Selective Inhibition Of *Leishmania* Dihydrofolate Reductase And *Leishmania* Growth By 5-Benzyl-2,4-Diaminopyrimidines. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31, 79-85
191. Sirawaraporn, W., Sirawaraporn, R., Cowmna, A., Yuthavong, Y., and Santi, D. V. (1990) Heterologous Expression of Active Thymidylate Synthase-Dihydrofolate Reductase from *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry* 29, 10779-10785
192. Sirawaraporn, W., Prapunwattana, P., Sirawaraporn, R., Yuthavong, Y., and Santi, D. (1993) The Dihydrofolate Reductase Domain of *Plasmodium falciparum* Thymidylate Synthase-Dihydrofolate Reductase. *J. Biol. Chem.* 268, 21637-21644

193. Sirotnak, F. M., Moccio, D. M., Kelleher, L. E., and Goutas, L. J. (1981) Relative Frequency and Kinetic Properties of Transport Defective Phenotypes Among Methotrexate-Resistant L1210 Clonal Cells Derived *In Vivo*. *Cancer Res.* 41, 4447-4452
194. Snewin, V. A., England, S. M., Sims, P. F., and Hyde, J. E. (1989) Characterization of the Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Gene from *Falciparum Malaria* Parasites Highly Resistant to Pyrimethamine. *Gene* 76, 41-52
195. Soares, M. J., and de Souza, W. (1991) *Parasitol. Res.* 77, 461-468
196. Sogin, M. L., Elwood, H. J., and Gunderson, H. J. (1986) Evolutionary Diversity Of Eukaryotic Small Subunit rRNA Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1383-1387
197. Southern, E. (1975) Detection Of Specific Genes Among DNA Fragments Separated By Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503
198. Spithill, T. W., and Samaras, N. (1985) Variacion en el tamaño de los cromosomas. *Nucleic Acids Res.* 13, 4155-4169
199. Stammers, D. K., Champness, J. N., Beddell, C. R., Dann, J. G., Eliopoulos, E., Geddes, A. J., Ogg, D., and North, A. C. (1987) The Structure Of Mouse L1210 Dihydrofolate Reductase-Drug Complexes And The Construction Of A Model Of Human Enzyme. *FEBS Lett.* 218, 178-184
200. Stammers, D. K., Delves, C., Ballantine, S., Jones, E. Y., Stuart, D. I., Achari, A., Bryant, P. K., and Champness, J. N. (1993) Preliminary Crystallographic Data For *Pneumocystis carinii* Dihydrofolate Reductase. *J. Mol. Biol.* 230, 679-680
201. Stone, S. R., and Morrison, J. F. (1982) Kinetic Mechanism of the Reaction Catalyzed by Dihydrofolate Reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 21, 3757-3765
202. Stone, S. R., and Morrison, J. F. (1984) Catalytic Mechanism Of The Dihydrofolate Reductase Reaction As Determined By pH Studies. *Biochemistry* 23, 2753-2758
203. Stone, S. R., Montgomery, J. A., and Morrison, J. F. (1984) Inhibition of Dihydrofolate Reductase from Bacterial and Vertebrate Sources by Folate, Aminopterin, Methotrexate and their 5-deaza analogues. *Biochem. Pharmacol.* 33, 175-179
204. Stone, S. R., and Morrison, J. F. (1986) Mechanism of Inhibition of Dihydrofolate Reductase from Bacterial and Vertebrate Sources by Various Classes of Folate Analogues. *Biochim. Biophys. Acta* 869, 275-285
205. Stroud, R. M., and Finer-Moore, J. S. (1993) Stereochemistry of a Multistep/bipartite Methyl Transfer Reaction: Thymidylate Synthase. *FASEB J.* 7, 671-677
206. Stuart, K. (1991) RNA Editing in Trypanosomatid Mitochondria. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 327-344
207. Sturm, N. R., and Simpson, L. (1990) Kinetoplast DNA Minicircles Encode Guide RNAs for Editing of Cytochrome Oxidase Subunit III mRNA. *Cell* 61, 879-884
- 208.
209. Thillet, J., Absil, J., Stone, S. R., and Pictet, R. (1988) Site-Directed Mutagenesis of Mouse Dihydrofolate Reductase. Mutants With Increased Resistance to Methotrexate and Trimethoprim. *J. Biol. Chem.* 263, 12500-8

210. Urbina, J. A. (1994) Intermediary Metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today* 10, 103-110
211. Van der Ploeg, L. H. T., Cornelissen, A. W. C. A., Barry, J. D., and Borst, P. (1984a) The Chromosomes of the Kinetoplastida. *EMBO J.* 3, 3109-3115
212. van der Ploeg, L. H. T., Schwartz, D. C., Cantor, C. R., and Borst, P. (1984b) Antigenic Variation in *Trypanosoma brucei* Analysed by Electrophoresis Separation of Chromosome-Sized DNA Molecules. *Cell* 37, 77-84
213. Vieira, J., and Messing, J. (1982) The pUC Plasmids, an M13mp7-Derived System for Insertion Mutagenesis and Sequencing With Synthetic Universal Primers. *Gene* 19, 259-268
214. Volz, K. W., Matthews, D. A., Alden, R. A., Freer, S. T., Hansch, C., Kaufman, B. T., and Kraut, J. (1982) Crystal Structure of Avian Dihydrofolate Reductase Containing Phenyltriazine and NADPH. *J. Biol. Chem.* 257, 2528-2536
215. Wahba, A. J., and Friedkin, M. (1961) Direct Spectrophotometric Evidence for the Oxidation of Tetrahydrofolate During the Enzymic Synthesis of Thymidylate. *J. Biol. Chem.* 236, PC11-12
216. Wahle, E., and Keller, W. (1992) The Biochemistry of 3'-End Cleavage and Polyadenylation of Messenger RNA Precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 419-440
217. Walder, J. A. (1986) minixon. *Science* 233, 569-571
218. Washtien, W. L., Grumont, R., and Santi, D. V. (1985) DNA Amplification in Antifolate-Resistant *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* 260, 7809-7812
219. Washtien, W. L., and Santi, D. V. (1987) Studies Of The Bifunctional Thymidylate Synthase-Dihydrofolate Reductase From *Leishmania*. In *Molecular Strategies of Parasitic Invasion* (Alan R. Liss, I., ed) pp.65-76,
220. White, T. C., Rudenko, G., and Borst, P. (1986) Three Small RNAs Within the 10kb *Trypanosoma* rRNA Transcription Unit Are Analogous to Domain VII of Other Eukaryotic 28S rRNAs. *Nucleic Acids Res.* 14, 9471-9489
221. Wienand, U., Schwarz, Z., and Felix, G. (1978) Electrophoretic Elution of Nucleic Acids from Gel Adapted for Subsequent Biological Tests: Application for Analysis of mRNAs from Maize Endosperm. *FEBS Lett.* 98, 319-323
222. Williams, J. W., Morrison, J. F., and Duggleby, R. G. (1979) Methotrexate, a High-Affinity Pseudosubstrate of Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry* 18, 2567-2573
223. Williams, J. W., and Morrison, J. F. (1979) The Kinetics of Reversible Tight-binding Inhibition. *Methods Enzymol.* 63, 437-466
224. Winston, D. J., Lau, W. K., Gale, R. P., and Young, L. S. (1980) Trimethoprim-Sulfomethoxazole for Treatment of *Pneumocystis carinii* infection. *Ann. Intern. Med.* 92, 762-769
225. Woods, D. D. (1940) The Relation of para-Aminobenzoic Acid to the Mechanism of Action of Sulphonamide. *Br. J. Exp. Pathol.* 21, 7490
226. Yamauchi, K. (1991) The Sequence Flanking Translational Initiation Site in Protozoa. *Nucleic Acids Research* 19,

227. Yanish-Perron, C., Viera, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13mp18 and pUC19 Vectors. *Gene* 33, 103-119
228. Yen, J.-Y. J., Kellems, R. E. (1987) Independent 5'- and 3'- End Determination of Multiple Dihydrofolate-Reductase Transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3732-3739
229. Zomerdijk, J. C. B. M., Ouellette, M., ten Asbroek, A. L. M. A., Kieft, R., Bommer, A. M. M., Clayton, C. E., and Borst, P. (1990) The Promoter for a Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Site in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 9, 2791-2801