

00562



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

MUTAGENESIS EXHAUSTIVA DE LA CISTEINA 14
DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE
Trypanosoma brucei

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A :
GLORIA HERNANDEZ ALCANTARA

DIRECTOR DE TESIS DR RUY PEREZ MONTFORT



MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el instituto de Fisiología Celular, de la UNAM, departamento de Bioquímica, bajo la asesoría del Dr. Ruy Pérez Montfort. Este trabajo recibió apoyo DGAPA-UNAM (IN206297). Durante el desarrollo del presente trabajo recibí una beca de maestría DGAPA-UNAM para la realización de mis estudios.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis:

A mi mamá, con mucho amor.

A la memoria de mi padre (nunca te olvidare).

A mis queridos hermanos: Rafael, Miguel, Víctor, Margarita, Arely, Mariana y a mis dos sobrinos.

A Manuel por estar con migo TQM.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los miembros del comité tutorial integrado por:

Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Dr. Ruy Pérez Montfort

Agradezco al Jurado que revisó esta tesis integrado por:

Dra. Rosario A. Muñoz Clares
Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Dra. Gloria Saab Rincon
Dr. Lorenzo Segovia Forcella
Dr. Roberto Coria Ortega.

Gracias al Dr. Ruy Pérez Montfort por recibirme en su laboratorio y por su asesoría.

A Georgina Garza-Ramos por apoyarme en la parte experimental. Gracias Geo por todo lo que me enseñaste.

Al Dr. Gómez-Puyou y la Dra. Marieta Tuena de Gómez-Puyou por permitirme participar en sus seminarios y por sus buenas sugerencias.

A Nallely Cabrera por su gran amistad y por su asesoría técnica en Biología Molecular.

A Emma Saavedra Lira por enseñarme los pequeños trucos en Biología Molecular.

A Lino Méndez Franco por su gran apoyo en la preparación de reactivos y por su amistad.

Agradezco a la Dra. Amelia Farrés González-Saravia, coordinadora del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por todo el apoyo brindado.

A Leticia García mil gracias por apoyarme siempre en todos los trámites y por su amistad.

A mis amigos: Clara, Citlalli, Mary Chu, Bety, Clemen, Olga, Nallely y familia, Emma, Marcela, María Elena, Lorena, Adelaida, Geo, Andrea, Santiago, Ricardo, Juan Antonio, Norberto, Gerardo, Horacio, Lenin, Alfredo, Pedro y Eduardo. Gracias a todos por su amistad.

A la familia López Gaona gracias por su amistad y apoyo.

INDICE

	Pag.
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Ciclo de vida de <i>T. brucei</i>	3
2.2. El papel de la glucólisis en el ciclo de vida de <i>T. brucei</i>	4
2.3. Diseño de fármacos	7
2.4. Inhibidores específicos de especie	9
2.5. Triosafofato isomerasa	9
2.6. Cys14	12
3. Justificación	16
4. Objetivos	18
5. Materiales y métodos	20
5.1.1. Diseño de oligonucleótidos	21
5.1.2. Mutagénesis por PCR	24
5.1.3. Técnica de PCR	25
5.2. Obtención de clonas	28
5.3. Secuenciación del ADN	30
5.4. Clonación en el vector de expresión	30
5.5. Expresión de las proteínas mutantes	33
5.6. Purificaciones en extractos crudos	34
5.7. Determinación de la concentración de proteína	36
5.8. Determinación de la actividad catalítica	36
6. - Resultados	37
7.- Discusión	47
8.- Conclusiones	51
9.- Perspectivas	52
10.-Referencias	53

ABREVIATURAS

Cys14	Cisteína 14
TIM	Triosafosfato isomerasa
pI	Punto isoeléctrico
VSG	Glicoproteínas de superficie variable
Kda	Kilodaltones
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MMTS	Metil metano tiosulfonato
DTNB	Acido ditiobisnitiobenzoico
Pb	Pares de bases
LB	Luria Bertani
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
SDS	Dodecil sulfato de sodio
MES	Acido (2(N-morfolino) etensulfónico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetra-acético
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
BCA	Acido bicinconínico
TEA	Trietanolamina
NADH	Nicotinadeninucleótido (reducido)
K_m	Constante de Michaelis-Menten
V_{max}	Velocidad máxima de la reacción

1. Resumen

En este trabajo se realizó una mutagénesis exhaustiva de la cisteína 14 (Cys14) de la triosafosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma brucei* cambiando este residuo por los 19 aminoácidos restantes. Por PCR con oligonucleótidos mutagénicos, logramos obtener 19 genes mutantes en la posición 14 del gen TIM de *T. brucei*. Se clonaron los genes mutantes en el vector de expresión pET-3a y se expresaron las proteínas en un sistema bacteriano en la cepa BL21DE3pLysS. La expresión de las diferentes proteínas mejoró a una temperatura de 21 y 30°C. Se realizó una purificación en extractos crudos para medir su actividad enzimática y compararla con la enzima silvestre.

De acuerdo a la actividad enzimática determinada a cada enzima mutante, se formaron cuatro grupos:

- 1.- Enzimas con baja actividad y que forman agregados.
- 2.- Enzimas con baja actividad.
- 3.- Enzimas con actividad intermedia.
- 4.- Enzimas con actividad similar a la silvestre.

La posible explicación a por qué 5 (C14A, C14P, C14S, C14T y C14V) de las 19 enzimas mutantes presentan una actividad enzimática similar a la TIM silvestre, indica que los 5 aminoácidos sustituidos presentan un tamaño e hidrofobicidad similares al de la cisteína. Estos 5 aminoácidos probablemente mantienen a la enzima bien estructurada y no afectan su catálisis.

2. Introducción:

Los tripanosomas son parásitos protozoarios que causan serias enfermedades en los humanos y animales domésticos en África y en América Central y del Sur (1).

Dependiendo del modo de transmisión por el insecto vector, el género *Trypanosoma* (orden Kinetoplastida) se subdivide generalmente en dos grupos: el grupo estercolaria (transmisión fecal) y el grupo salivaria (transmisión salival).

Entre los parásitos de transmisión fecal está *Trypanosoma cruzi*, que es el causante de la enfermedad de Chagas. Se estima que este parásito infecta a más de 10 millones de personas en América del Sur.

Los parásitos de transmisión salival causan la enfermedad del sueño en los humanos (*T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense*), la enfermedad del nagana en el ganado (*T. brucei brucei*, *T. brucei vivax*, *T. brucei congolense*), la surra en caballos y camellos (*T. brucei evansi*) y la dourina en caballos (*T. brucei equiperdum*) (2).

Aunque se reportan cerca de 10,000 nuevos casos cada año de la enfermedad del sueño humana, el padecimiento tiende constantemente a alcanzar proporciones epidémicas, como ha ocurrido desde el principio de siglo (3).

T. brucei es un parásito extracelular, que se reproduce en los fluidos del tejido, la base de los capilares y el sistema vascular del hospedero. Se transmite por la mosca tsetsé (*Glossina sp*) cuya ubicación geográfica limita la distribución de la tripanosomiasis (4). La enfermedad del sueño se distribuye principalmente en el centro, oeste y oriente de África (5). Como *T. brucei brucei* no infecta al hombre, ha sido la especie más comúnmente estudiada. (2).

2.1. Ciclo de vida de *T. brucei*

El ciclo de vida de *T. brucei* se muestra en la figura 1. Se puede dividir en dos partes.

1) En la primera fase el protozoo vive en la mosca tsetse. Los tripanosomas son ingeridos por la mosca durante su alimentación hematófaga al picar al mamífero. En un principio se localizan en la sección posterior del intestino del insecto y tienen una forma procíclica, posteriormente los parásitos migran a través de las paredes del intestino hasta llegar a las glándulas salivales, en donde se transforman en epimastigotos y al cabo de varias generaciones se convierten en tripomastigotos metacíclicos. Los tripomastigotos metacíclicos son el único estadio infeccioso para el huésped. El ciclo completo en la mosca se realiza entre 15 y 35 días.

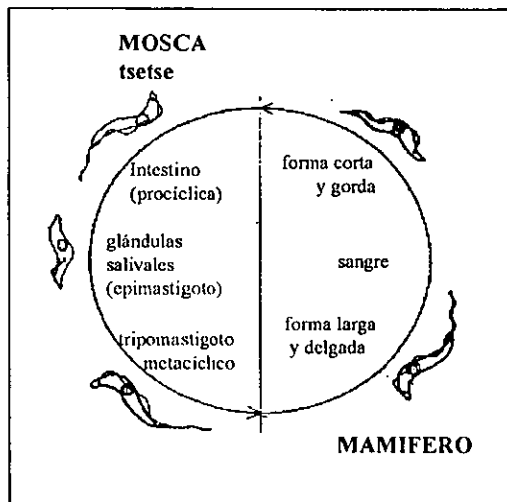


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. Se describe con detalle en el texto.

2) La segunda parte es cuando se encuentra en los mamíferos. Usualmente cuando una mosca tsetse pica al humano para alimentarse de su sangre le inyecta los tripanosomas en el torrente sanguíneo y de esta forma lo infecta. Ya en la sangre del hospedero esta especie muestra dos formas:

- a) Una forma larga y delgada que se está dividiendo constantemente y que tiene un flagelo libre.
- b) Una forma corta y gruesa que no presenta el flagelo libre y que no se divide constantemente. Esta última forma se está preadaptando para volver a empezar el ciclo. Los parásitos se transmiten a otro hospedero mamífero cuando la mosca tsetse se alimenta nuevamente (2).

En un principio el parásito se encuentra en el torrente sanguíneo, después invade el sistema nervioso central y finalmente el estado terminal de la tripanosomiasis es el resultado de una meningoencefalitis crónica.

En *T. brucei gambiense* el intervalo entre el inicio de la infección y el estado encefalítico es de cerca de 2 años, pero el lapso puede ser de hasta 8 años.

En *T. brucei rhodesiense* el intervalo es más corto. El promedio es de 8 meses y más de un año es raro. La enfermedad del sueño causada por *T. brucei rhodesiense* es la más virulenta (5).

2.2. El papel de la glucólisis en el ciclo de vida de *T. brucei*.

El metabolismo del tripanosoma en su forma larga y delgada, que es la que predomina en la sangre de los mamíferos, carece de ciclo de Krebs, mitocondrias funcionales y citocromos (por lo que no lleva a cabo la fosforilación oxidativa). También carece de una reserva significativa de polisacáridos y de fosfatos de alta energía, como los creatinofosfatos o polifosfatos. Por lo tanto, los tripanosomas son completamente dependientes de la conversión aeróbica de glucosa a piruvato para generar el ATP que necesitan para vivir (2, 6). Sin embargo la reoxidación del NAD⁺ es necesario para continuar la producción de energía. Este es reoxidado durante la reducción de la dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato (fig. 2, paso 12).

Las formas que se encuentran en el intestino de la mosca poseen mitocondrias completamente funcionales con ciclo de Krebs activo y cadena de citocromos. Debido a que los tripanosomas dependen absolutamente de la glucólisis cuando infectan al humano o a los animales, varios grupos de investigación han iniciado estudios para tratar de inhibir diversas enzimas glucolíticas.

Muchas de las enzimas glucolíticas en los tripanosomas se encuentran localizadas en un organelo llamado glicosoma. Esto contrasta con las células de casi todos los organismos en donde las enzimas glucolíticas se encuentran localizadas en forma soluble en el citosol.

Esta compartimentalización subcelular de la glucólisis en el glicosoma de los tripanosomas la hace fundamentalmente diferente de todos los demás organismos eucariotes (ver figura 2) (7).

En los tripanosomas las enzimas de la vía glucolítica, que se encuentran localizadas en el glicosoma, tienen la característica peculiar de que poseen puntos isoeléctricos altos (pIs de 9-11). Esto hace que tengan una carga positiva a pH fisiológico, a diferencia de las enzimas glucolíticas de los demás organismos (8,9).

Esta característica ha permitido diseñar péptidos contra estas enzimas de la glucólisis para su inhibición. Para la triosafosfato isomerasa (TIM) de *T. brucei* se han realizado estudios con diferentes péptidos, entre ellos ciclohexapéptidos, de entre los cuales los hidrofóbicos son los más efectivos. Sin embargo, debido a la compartimentalización de la TIM en el glicosoma, estos péptidos tienen problemas de accesibilidad (8, 10).

Existe también el caso del fármaco suramin, que es una molécula cargada negativamente a pH fisiológico. Se ha sugerido que el suramin interacciona con los grupos cargados positivamente de las enzimas glucolíticas de los glicosomas inhibiendo su actividad.

El suramin ha sido el medicamento de elección para la enfermedad del sueño en las fases iniciales durante los últimos 70 años. Sin embargo, los efectos secundarios que produce generalmente son graves (8, 10, 11).

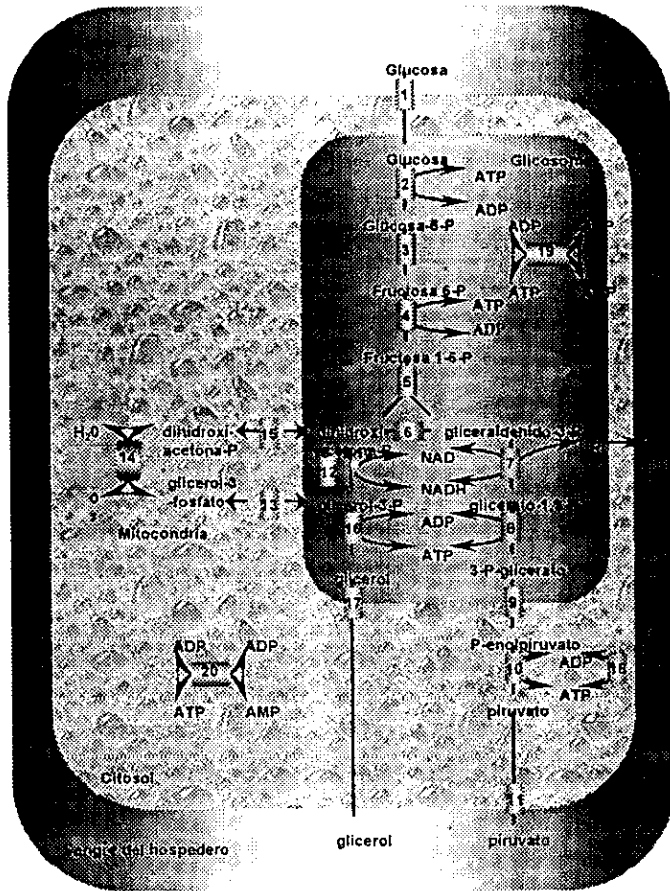


Figura 2. La figura muestra la vía metabólica de la glucólisis en *Trypanosoma brucei* cuando se encuentra en la sangre del hospedero mamífero. Los números indican a las enzimas como sigue: 1. transportador de la glucosa, 2. hexocinasa, 3. hexosa-fosfato isomerasa, 4. fosfofructocinasa, 5. aldolasa, 6. triosa-fosfato isomerasa, 7. gliceraldehido-3-fosfato isomerasa, 8. 3-fosfoglicerato quinasa, 9. fosfoglicerato mutasa, 10. piruvato quinasa, 11. transporte del piruvato, 12. glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, 13. transporte del glicerol 3-fosfato, 14. Oxidación mitocondrial del glicerol-3-fosfato, 15. transporte de la dihidroxiaceton-3-fosfato, 16. glicerol quinasa, 17. transporte del glicerol, 18. procesos que convierten ATP en ADP, 19. miocinasa glicosomal, 20. miocinasa citosólica.

2.3. Diseño de fármacos

Se ha intentado controlar la tripanosomiasis, tanto en el hombre como en la mosca tsetse.

Se ha atacado a la mosca tsetse destruyendo su hábitat, utilizando repelentes contra la mosca o matándola con insecticidas, pero hasta la fecha, no se ha tenido mucho éxito (5, 12, 13).

También se ha intentado atacar al tripanosoma, cuando éste ha infectado al hombre. Esto se ha buscado principalmente por el diseño de vacunas y también por el diseño de fármacos. El diseño de una vacuna contra la enfermedad del sueño es mucho muy difícil debido a que los tripanosomas en la sangre tienen un ingenioso mecanismo para evadir la respuesta inmune del hospedero.

Cuando el tripanosoma está en la sangre del mamífero, está cubierto por una capa densa de glicoproteínas de superficie variable (VSG), que protegen a las proteínas de membrana y previenen la lisis del parásito por los componentes del suero. La variación antigénica del parásito en la sangre, y su consecuente evasión de la respuesta inmune del hospedero, se debe a la expresión consecutiva de aproximadamente 1000 genes VSG diferentes (14). Como consecuencia, los anticuerpos que se generan contra la VSG que está expresando el tripanosoma en esos momentos, resultan inservibles en pocos días. El tripanosoma reemplaza estas glicoproteínas por otras, que en estructura son similares a la primera, pero que son diferentes en su secuencia de aminoácidos y tienen diferentes propiedades antigénicas (1). Este mecanismo de evasión de la respuesta inmune hace muy difícil el desarrollo de una vacuna para prevenir la enfermedad.

Por esta razón se piensa que el “diseño racional de drogas” o “diseño de drogas basado en la estructura” para el tratamiento de la enfermedad tiene mayores probabilidades de éxito (15). Este método se basa en diseñar fármacos utilizando para ello el conocimiento de la estructura tridimensional de ciertas proteínas blanco.

El diseño racional de drogas puede complicarse por el efecto de la modulación de la actividad de las enzimas, ya que el flujo metabólico depende de las propiedades de todas las enzimas en la vía metabólica.

Sin embargo, algunos avances recientes pueden brindar más información para el diseño de fármacos. Con el paso de las décadas se han purificado y caracterizado extensamente, tanto estructural como cinéticamente, muchas enzimas de *T. brucei* (16, 17). Por otra parte, existen muy pocos fármacos contra esta enfermedad. Los fármacos de elección son altamente tóxicos y tienen numerosos efectos secundarios.

Entre ellos están la pentamidina, que es usado en las fases tempranas de la infección. Este fármaco ha dado resultados muy satisfactorios en la mayoría de los casos. Sin embargo el pronóstico es malo si ya está invadido el sistema nervioso central.

El melarsoprol se usa en las fases tardías pero presenta efectos secundarios que pueden ser fatales (5). La efornitina, el fármaco más reciente, tiene efectos severos (5, 1) y es menos activo en infecciones causadas por *T. rhodesiense*, la forma más virulenta (5). Generalmente, el tratamiento con efornitina requiere de administración intravenosa de grandes cantidades bajo hospitalización del paciente.

Considerando esta situación es necesario diseñar un fármaco más efectivo para este tipo de enfermedades (18).

El diseño de un fármaco requiere de un conocimiento profundo de los aspectos bioquímicos del metabolismo, tanto de las células del parásito, como de las células del hospedero.

Algunas investigaciones que se están realizando para encontrar nuevos fármacos se enfocan sobre enzimas que existen sólo en el parásito (19). Otros trabajos intentan producir inhibidores de enzimas que existen tanto en el parásito como en el hospedero (18). Generalmente estas moléculas están dirigidas contra el sitio activo de la enzima y se procura diseñar un medicamento con un efecto de inhibición enzimática diferencial. Esto es muy difícil porque el sitio activo de una enzima generalmente está altamente conservado, aún en especies muy separadas por la evolución.

Otro acercamiento al problema ha sido el diseño de inhibidores específicos de especie de enzimas (20). El problema aquí es predecir que región o regiones de la proteína son importantes para la actividad enzimática o para la estabilidad de la enzima.

2.4. Inhibidores específicos de especie.

Un enfoque basado en el diseño de inhibidores específicos de especie, propuesto por Gómez-Puyou y col. (20), propone un protocolo para la localización de residuos no-conservados cuya modificación perturbe o disminuya la catálisis y/o la estabilidad de la enzima, sin ser aminoácidos del sitio activo. Ellos demostraron que es posible producir inhibición enzimática específica de especie por modificación de aminoácidos no-conservados que son importantes para la función de la enzima de una especie en particular (20).

Este trabajo pudiera ser aprovechado de la siguiente manera:

Sabemos que *T. brucei* depende totalmente de la glucólisis para generar el ATP que requiere para su proliferación y maduración celular, ya que en su forma larga y delgada permanece y se multiplica en el torrente sanguíneo de los mamíferos, en donde sus mitocondrias no son funcionales (21), por lo que su única fuente de energía la obtiene de la glucólisis (ver el papel de la glucólisis en el ciclo de vida de *T. brucei*). Una estrategia adecuada para resolver una infección por estos parásitos es bloquear alguna o algunas de las enzimas de la glucólisis, para impedir la generación de energía que los tripanosomas necesitan para su sobrevivencia. Una de esas enzimas es la TIM (16, 22, 23,24,25).

2.5. Triosafosfato isomerasa

En los tripanosomas la TIM se encuentra en el organelo llamado glicosoma. En la figura 2, se observa la ruta metabólica de la glucólisis del tripanosoma, en la que se observa que la conversión de la glucosa hasta 3-fosfoglicerato se realiza en el glicosoma. El resto de la ruta hasta piruvato se lleva a cabo en el citosol, como ocurre en otras células eucariotas.

La TIM cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) (26), según la reacción que se muestra en la figura 3. En todas las especies conocidas, la TIM es una enzima homodimérica con un peso molecular de aproximadamente 54 Kda, excepto en algunos casos como la arqueobacteria hipertermófila *Pyrococcus woesei*, en que la TIM es un homotetrámero de 100 Kda (27).

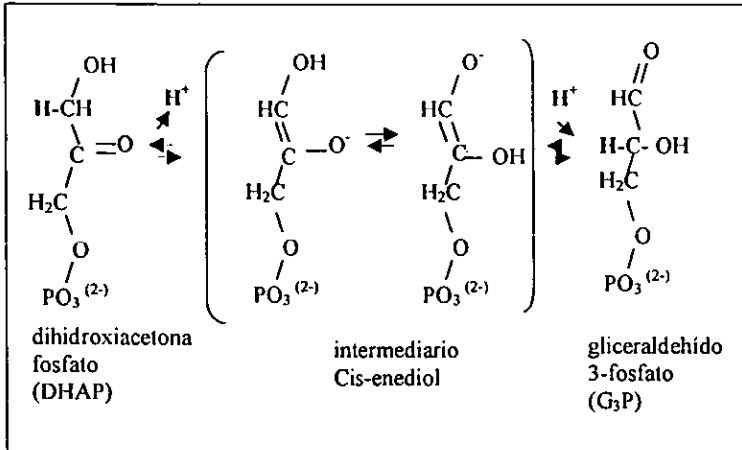


Figura 3. Mecanismo de la reacción de isomerización catalizado por la triosafosfato isomerasa.

En el caso de *T. brucei* cada subunidad tiene 250 residuos y forma la estructura característica de barril α/β , que consiste en un plegamiento de 8 hojas- β paralelas alternando con 8 α -hélices y unidas por asas. Las 8 hojas- β paralelas forman un barril en el interior de la proteína, rodeado por las α -hélices (28,29) (figura 4). En estudios de TIMs de varias especies se ha observado que todas las TIMs tienen propiedades catalíticas similares (30, 31) y que todas conservan los residuos del sitio activo (29,32).

Actualmente se conoce la secuencia de aminoácidos de la TIM de más de 62 especies y también se conoce la estructura cristalográfica de las TIMs de *Escherichia coli* (33), *Bacillus stearothermophilus* (34), *Vibrio marinus* (35), *Plasmodium falciparum* (36), *T. brucei brucei* (37), *T. cruzi* (38), *Leishmania mexicana* (39), *Saccharomyces cerevisiae* (40), *Gallus gallus* (41) y *Homo sapiens* (42), entre otras.

Todas estas enzimas muestran una estructura muy similar. Los datos de estas estructuras tridimensionales nos permiten visualizar los residuos de interés en las enzimas y sus relaciones espaciales con otros aminoácidos.

Cada monómero o subunidad de la enzima tiene un sitio activo completo, localizado cerca de la interfase, el cual no interacciona directamente con el otro monómero. La TIM es activa sólo como dímero (46), sugiriendo que los residuos de una subunidad son cruciales para mantener la integridad del sitio activo de la otra subunidad (29). La interfase de la TIM, está formada por 32 residuos que se distribuyen en 4 asas (asa1 al asa 4) en cada monómero (ver figura 4).

Muchos de los contactos entre las 2 subunidades se encuentran en el asa3, también conocida como asa de la interfase o asa de interdigitación (29). Algunos residuos de esta asa, tienen interacciones de tipo van der Waals con residuos del sitio activo de la otra subunidad (37, 40).

Aunque se pudiera pensar que la interacción monómero-monómero debería haberse conservado en la escala evolutiva, los residuos involucrados en la interacción de la interfase muestran una variabilidad considerable en las secuencias. A pesar de esa variabilidad en los residuos de la interfase, la estabilidad de asociación de los monómeros no cambia significativamente entre especies (29).

2.6. Cys 14

La Cys14 es un residuo que se encuentra localizado en la interfase de la TIM de *T. brucei*.

En el alineamiento de secuencias de aminoácidos que se muestra en la tabla 1, se observa que existen principalmente 6 aminoácidos que se alinean en esa posición, de más de 62 especies secuenciadas. Es notorio que exclusivamente plantas y protozoarios parásitos poseen una cisteína que coincide en el alineamiento con la posición 14. En muchas bacterias y levaduras se encuentra una leucina y en mamíferos y otros organismos más evolucionados una metionina. En esa posición también se han observado treonina, que parece ser una característica de micoplasmas, y glutamina y serina. Estos últimos 2 aminoácidos se han observado sólo en una ocasión por lo que no es posible hacer una observación generalizada sobre ellos.

La Cys14 en la TIM de *T. brucei* es un aminoácido no-conservado y es un residuo que forma parte de la interfase de la enzima. Este residuo se localiza en el asa 1, uniendo a la primera hoja- β con la primera α -hélice (ver figura 4). La estructura de la TIM de *T. brucei* muestra que la Cys14 está rodeada estrechamente por el asa 3 del otro monómero y que hace contacto con los residuos Ile68, Phe74 y Glu77 del asa 3 de la otra subunidad (figura 5).

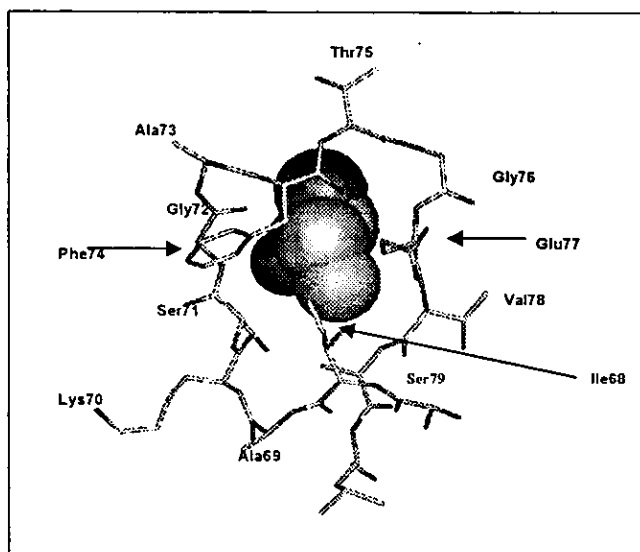


Figura 5. Acercamiento del asa 3 de una subunidad, que ininterdigita con la Cys14 (mostrada en superficie de van der Waals) del asa 1 de la otra subunidad de la TIM de *T. brucei*.

TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI	-----MSKQPPIAAANWKCNGSQ- ¹⁴ QSLSELIDL	28
TRYPANOSOMA CRUZI	-----MASKQPPIAAANWKCNGSE-SLLVPLIETL	29
LEISHMANIA MEXICANA	-----MSAKQPPIAAANWKCNGTT-ASIEKLVQVF	29
SECALE CEREALE	-----AAQR---LVAMAGSGKFFVGGNWKNGTK-ESISKLVSDL	36
SPINACIA OLERACEA	LRLSSSSRRCPRGVVAMAGSGKFFVGGNWKNGTK-ESITKLVSDL	45
SPINACIA LONGIPES	-----MGR-KFFVGGNWKNGTQ-ESVS	21
COPTIS JAPONICA	-----MGRKFFVGGNWKNGTGS-EEVKQIVTLL	27
HORDEUM VULGARE	-----GRKFFVGGNWKNGTV-EQVEAIVQTL	26
ZEA MAYS	-----GRKFFVGGNWKNGTT-DQVEKIVKTL	26
CAENORHABDITIS ELEGANS	-----MTRKFFVGGNWKMGNDY-ASVDGIVTFL	27
CULEX TARSALIS	-----GRKFCVGGNWKMGNDK-AS IADLCKVL	26
HOMO SAPIENS	-----APSRKFFVGGNWKMGNRK-QSLGELIGTL	28
MACACA MULATTA	-----APSRKFFVGGNWKMGNRK-KNLGELIGTL	28
ORYCTOLAGUS CUNICULUS	-----APSRKFFVGGNWKMGNRK-QNLGELIGTL	28
MUS MUSCULUS	-----APTARKFFVGGNWKMGNRK-KCLGELICTL	28
RATTUS NORVEGICUS	-----APSRKFFVGGNWKMGNRK-KCLGELICTL	28
GALLUS GALLUS	-----AP-RKFFVGGNWKMGNDK-KSLGELI	25
LATIMERIA CHALUMNAE	-----AP-RKFFVGGNWKMGNDK-KSLGELI	25
SCHISTOSOMA JAPONICUM	-----MSGSRKFFVGGNWKMGNSR-ADNKVLIHSL	29
COPRINUS CINEREUS	-----MTRSFFVGGNWKLNPTLSLAAKAPVEAL	28
EMERICELLA NIDULANS	-----MPRKFFVGGNFKMGNGNA-ESTTSIKNL	27
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE	-----ARKFFVGGNFKMNG-SLESMKTIIEGL	26
SCHIZOSACCHAROMYCES CEREVISIAE	-----ARTFFVGGNFKLNG-SKQSIKEIVE	24
GIARDIA LAMBLIA	-----MPARRPFIGGNFKMGNSL-DFIKSHVAAI	28
PLASMODIUM FALCIPARUM	-----MARKYFVAANWKCNGTLL-ESTIKSLTNSF	27
ARABIDOPSIS THALIANA	-----MARKFFVGGNWKNGTA-EEVKQIVN	25
PETUNIA HIBRIDA	-----MGRKFFVGGNWKNGTA-EEVKQIVN	24
BACILLUS MEGATERIUM	-----M-RKPIIAGNWKMNKVL-SEATSFVEEV	26
BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS	-----M-RKPIIAGNWKMHKTL-AEAVQFVEDV	26
BACILLUS SUBTILIS	-----M-RKPIIAGNWKMNKTL-GEAVSFVEEV	26
LACTOBACILLUS DELBRUECKII	-----MSRTPPIIAGNWKLMNP-KETVEFVNAV	27
LACTOCOCCUS LACTIS	-----MSRKPIIAGNWKMNKTL-SEAQAFVEAV	27
BORRELIA BURGENDORFERI	-----M-RKTPLAGNWKMHYTS-AEASIVAKKI	26
CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM	-----MARKPLIAGNWKMNLDH-QQAI GTVQKL	27
MYCOBACTERIUM LEPRAE	-----MSRKSIIAGNWKMNLNH-FAEIALVQKI	27
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	-----MSRKPLIAGNWKMNLNH-YEAIALVQKI	27
TREPONEMA PALLIDUM	-----M-RGYFIAGNWKMHKTC-AEAVALAQEL	26
BUCHNERA APHIDICOLA	-----MKKKIIAANWKLNGSI-KTISYFLTFL	26
ESCHERICHIA COLI	-----MRHPLVMGNWKLNGSR-HMVHELVSNL	26
HAEMOPHILUS INFLUENZAE	-----MARPLVMGNWKLNGSK-AFTKELIEGL	27
VIBRIO MARINUS	-----PVVMGNWKLNGSK-MVVDLLN	21
PSEUDOMONAS SYRINGAE	-----MRRPMVAGNWKMHGTR-ASVAELIEGL	26
XANTHOBACTER FLAVUS	-----MTAERRPLIAGNWKMNGLR-AAKSELRTV	28
SYNECHOCYSTIS SP	-----MRKII IAGNWKMHKTO-AEAQAFIQGP	26
MORAXELLA SP	-----MQAWVII GNWKQNPATSHDVNALDDLCAA	30
MYCOPLASMA FLOCCULARE	-----MK-KII IGNWKMNKTV-HETRDFIQKF	26
MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE	-----MK-KII IGNWKMNKTV-SETRDFIQKF	26
MYCOPLASMA HYORHINIS	-----MSK-TII IGNWKMNKTF-TQTKDFIQKF	26
MYCOPLASMA GENITALIUM	-----MRTRYLIGNWKTNKQL-KDAVSFVEQF	27
MYCOPLASMA PNEUMONIAE	-----MRTKYLIGNWKTNKDL-HQALAFVEQF	27
(FRAG)-CHLOROFLEXUS AURANTIACUS	-----MYKTVEATTLVRDLLAGL	19
(FRAG)-RHIZOBIUM ETLI	-----MNPMQADAKQLL---QEFKQLQE	21
HELICOBACTER PYLORI	-----MTKIAMANPKSAMPPI-FKSHAYLKE	25
(FRAG)-AEDES TOGOI	-----SIAELCKVL	9
(FRAG)-CULEX PAPIENS	-----SITELCKVL	9
GRACILARIA VERRUCOSA	-----NWKCNLSKADIAELVSFA	18
(FRAG)-ANOPHELES MERUS	-----SITELCKTL	9
DROSOPHILA MELANOGASTER	-----MSRKFCVGGNWKMGDQKSI AEI	23
(FRAG)-HELIOTHIS VIRESCENS	-----MNGDKKQVTDIVETL	15
METHANOCOCCUS JANNASCHII	-----MLIVINYKTYNESIGNRGLIAKI	24
(FRAG)-MYCOPLASMA PIRUM	-----MKKRI I IGNWKTNKTO-KEVKEFPKIL	26
(FRAG)-STREPTOCOCCUS MUTANS	-----MSRKPIIAGNWKMNKTA-AEAREFIDAV	27

Tabla 1. Alineamiento de 62 secuencias de la TIM, principalmente el aminoácido que alinea con la posición 14 de la secuencia de la TIM de *T. brucei*.

Además, la Cys14 es un aminoácido vecino al residuo catalítico Lys13, que forma parte del sitio activo y es el aminoácido responsable de la especificidad de la enzima por su sustrato natural (31). La Cys14 influye significativamente en la estabilización de la estructura de la enzima. Maldonado y col. (38) calcularon que este aminoácido contribuye con el 8% del área total de la interfase, lo que lo hace uno de los tres aminoácidos que contribuyen en forma más importante a la interacción entre los dos monómeros. La importancia del residuo que alinea en la posición 14 y su interacción con los residuos del asa3 en la estabilidad del dímero se ha demostrado con los siguientes experimentos:

Mainfroid y col. mutaron la Met14 en la TIM de humano por una Gln (30) y Gómez-Puyou y col. reemplazaron en la TIM de *T. brucei* a la Cys14 por Leu (20). Como resultado de estas sustituciones se obtuvieron enzimas inactivas.

Gómez-Puyou y col. (20) además encontraron que la TIM de especies que no tienen una cisteína en la posición 14, no se derivatizan o sólo se afectan parcialmente por la acción de reactivos que modifican grupos sulfhidrilos como el metil metano tiosulfonato (MMTS) y ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB). Sin embargo, aquellas enzimas que poseen una Cys14 como *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. mexicana*, se inactivan completamente al derivatizar la Cys14 (47,48, 49).

La TIM de humano (con Met14) casi no se inactiva con los agentes derivatizantes. Además también encontraron que el mecanismo de acción de los agentes derivatizantes, es que provocan una desestabilización y un cambio conformacional importante en la enzima, que probablemente causa la monomerización de la misma (20,47,48).

En conclusión, hay diversas evidencias que apuntan a que la Cys14 de la TIM de *T. brucei* es un residuo fundamental en la estabilización de la estructura dimérica y por lo tanto también para la actividad catalítica de esta enzima.

3. Justificación:

Actualmente hay un gran interés en el diseño de inhibidores contra enzimas de organismos que afectan la salud de los humanos, como es el caso de *T. brucei*. Como se mencionó anteriormente, se han descrito diversos fármacos para el tratamiento de la enfermedad, pero todos ellos tienen efectos secundarios severos y sólo son de utilidad en fases iniciales o en formas más benignas. Hasta ahora, no existen medicamentos efectivos para las fases tardías y más graves de la enfermedad (1, 5, 18).

Una de las estrategias para abordar este problema es el diseño racional de moléculas que puedan afectar selectivamente a los organismos patógenos del humano (15).

Este diseño puede ser posible gracias a un conocimiento profundo de la estructura tridimensional, así como de la funcionalidad de proteínas de los organismos patógenos y del humano.

Tal es el caso para la TIM de *T. brucei* y de humano. Como ya se indicó, se conoce la estructura cristalográfica de varias enzimas, lo que nos permite visualizar los residuos de interés en la estructura tridimensional.

Por otra parte, se sabe que la estructura tridimensional de enzimas de especies filogenéticamente alejadas, y que llevan a cabo la misma función, tiene un grado de homología relativamente alto, a pesar de que existen variaciones en las secuencias de aminoácidos que las conforman. En general, estas variaciones son menos frecuentes en el sitio activo que en el resto de la secuencia.

Como ya se mencionaba anteriormente, Gómez-Puyou y col. (20) sugirieron que es posible inactivar de forma **específica de especie** a enzimas homólogas con un alto nivel de selectividad. Esto se logra en residuos que no han sido conservados dentro de la evolución, pero que son importantes para la estructura y función de la enzima (20). Gómez-Puyou y col. lograron inhibir la TIM de *T. brucei* con agentes derivatizantes de grupos sulfhidrilos, sugiriendo que el aminoácido Cys14 puede ser un blanco excelente para lograr inhibir a la TIM de *T. brucei*, sin inhibir a la TIM de humano y así poder eliminar al parásito del torrente sanguíneo.

En base a este planteamiento, el objetivo de nuestro grupo a largo plazo, es diseñar un fármaco que inhiba selectivamente a la enzima glucolítica TIM de *T. brucei* y que muera el parásito como consecuencia de su inhibición.

Sin embargo, para cumplir con el objetivo es necesario conocer más el comportamiento de la enzima y del parásito ante la presencia del posible fármaco.

Es por ello que surgen algunas preguntas que son:

- 1.- ¿Existe alguna mutación de la Cys14 que produzca una enzima igual a la silvestre?
- 2.- ¿Qué pasa, con la actividad y estabilidad de las enzimas mutantes, si sabemos que la Cys14 forma parte de los aminoácidos de la interfase que estabilizan los dímeros?
- 3.- ¿Qué podría pasar con la TIM si el parásito llegara a mutar la Cys14 por otro aminoácido para defenderse del fármaco?

En este trabajo nos proponemos hacer una mutagénesis exhaustiva de la Cys14 de la TIM de *T. brucei* (ver objetivos). Pensamos que este enfoque experimental nos proporcionara información, para contestar las preguntas anteriores.

Cabe mencionar que mutaciones en aminoácidos en posiciones diferentes a la Cys14 pudieran generar enzimas y parásitos resistentes a los fármacos. Las posibilidades pueden ser muchas, pero en este trabajo sólo nos enfocaremos a una, la mutación de la Cys14.

Las posibles mutaciones que puede sufrir la Cys14 son todas las combinaciones que se muestran en la tabla 2; ya sea por el cambio del primero, segundo o tercer nucleótido correspondiente al codón de la Cys 14.

Además, no sólo descartaremos una posible resistencia al fármaco por una mutación en la posición 14, sino que este trabajo nos proporcionará más información estructural y de estabilidad sobre la interfase de la enzima.

# de cambios	Cys14 TGC									
	1	TGA Stop	TGG Trp	TGT Cys	TAC Tyr	TCC Ser	TTC Phe	AGC Ser	CGC Arg	GGC Gly
2	TAA Stop	TAG Stop	TAT Tyr	TCA Ser	TCG Ser	TCT Ser	TTA Leu	TTG Leu	TTT Phe	
	AAC Ans	ACC Thr	ATC Ile	CAC His	CCC Pro	CTC Leu	GAC Asp	GCC Ala	GTC Val	
	AGA Arg	AGG Arg	AGT Ser	CGA Arg	CGG Arg	CGT Arg	GGA Gly	GGG Gly	GGT Gly	
3	ACG Thr	CCG Pro	GCC Ala	AAG Lys	ATT Ile	ATG Met	ATA Ile	CTA Leu	GTA Val	
	AAA Lys	CTG Leu	GTC Val	ACA Thr	CCA Pro	GCA Ala	ACT Thr	CCT Thr	GCT Ala	
	GAA Glu	CAA Gln	GAT Asp	CAT His	AAT Asn	CAG Gln	GAG Glu	CTT Leu	GTT Phe	

Tabla 2. Posibles mutaciones que puede sufrir la Cys14. Los cambios están dados en una, dos o las tres bases.

4. Objetivos:

Los objetivos generales del proyecto consisten en:

- 1.- Hacer una mutagénesis exhaustiva de la cisteína 14 de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*, por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- 2.- Expresar las proteínas mutantes en un sistema bacteriano.
- 3.- Hacer purificaciones en extractos crudos de las proteínas mutantes para medir su actividad enzimática y compararla con la actividad de la TIM silvestre.

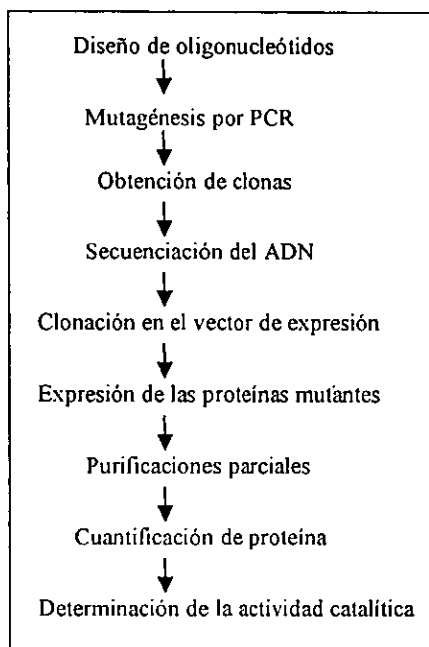
5. Materiales y métodos:

La metodología utilizada implica varios pasos a seguir mismos que podemos ver con más detalle en el esquema 1.

El gen de la TIM de *T. brucei* fue donado por el doctor P. A. M. Michels, del Research Unit for Tropical Diseases ICP-TROP, Bruselas Bélgica. Dicho gen está clonado en el vector pET-3a en el sitio de restricción para NdeI (50).

La mutagénesis exhaustiva se realizó por la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR).

Para esto fue necesario diseñar oligonucleótidos mutagénicos con posición degenerada, para lograr el cambio de la Cys14 por los 19 aminoácidos restantes.



Esquema 1. Diagrama de flujo que muestra la metodología utilizada.

5.1.1. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos mutagénicos se diseñaron con base en la secuencia del gen de la TIM con 21 pares de bases, 9 bases hacia el extremo 5' y 9 bases hacia el extremo 3' del codón sustituido.

Para lograr obtener los 19 genes mutantes fue necesario abordar el problema en 3 fases. En la primera fase se diseñaron oligonucleótidos con la posición mutante degenerada, para obtener el mayor número posible de genes mutantes (ver secuencia de oligonucleótidos 1a). En la segunda fase se analizaron cuáles mutantes se habían obtenido y se diseñaron oligonucleótidos también con la posición mutante degenerada, pero en mucho menor grado que la primera fase, para favorecer la obtención de las mutantes que faltaban (ver secuencia de oligonucleótidos 1b). En una tercera fase se diseñaron los 3 oligonucleótidos específicos y en posición dirigida de las mutantes que no se pudieron obtener en las dos fases anteriores (ver secuencia de oligonucleótidos 2).

secuencia de oligonucleótidos

1a) Oligonucleótidos con posición degenerada:

Oligonucleótido directo:

5' AACTGGAAGNNNAACGGCTCC 3'

Oligonucleótido reverso:

5' GGAGCCGTTNNNCTTCCAGTT 3'

Donde N=A+C+G+T

1b) Oligonucleótido con posición degenerada

Oligonucleótido directo:

5' AACTGGAAGVVNAACGGCTCC 3'

Oligonucleótido reverso:

5' GGAGCCGTTNBBCTTCCAGTT 3'

Donde V = A+C+G, B = T+G+C y N=A+G+C+T.

2.- oligonucleótidos con posición dirigida

C14A

Oligonucleótido directo:

5' AACTGGAAGGCGAACGGCTCC 3'

Oligonucleótido reverso:

5' GGAGCCGTTGCGCTTCCAGTT 3'

Donde GCG = Alanina

C14I

Oligonucleótido directo:

5' AACTGGAAGGCGAACGGCTCC 3'

Oligonucleótido reverso:

5' GGAGCCGTTGATCTTCCAGTT 3'

Donde GCG = Isoleucina

C14W

Oligonucleótido directo:

5' AACTGGAAGTGGAACGGCTCC 3'

Oligonucleótido reverso:

5' GGAGCCGTTCCACTTCCAGTT 3'

Donde TGG = Triptofano

Con estos oligonucleótidos mutagénicos generamos los 19 genes mutantes. Además, se necesitaron otros dos oligonucleótidos, uno directo (T7 promotor) y otro reverso (T7 terminador), los cuales se diseñaron tomando en cuenta que el gen está clonado en el vector pET-3a. Estos oligonucleótidos flanquean los extremos del gen y son necesarios para la amplificación completa del gen.

Oligonucleótido T7 promotor

5' CGATCAATAACGAGTCG 3'

Oligonucleótido T7 terminador

5' TAATACGACTCACTATA 3'

Los oligonucleótidos se mandaron sintetizar en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

5.1.2. Mutagénesis por PCR

Una vez diseñados los oligonucleótidos, se determinaron las condiciones óptimas para obtener productos de amplificación por PCR.

Esto implicó:

a) Determinar las concentraciones óptimas de oligonucleótido, templado (el gen insertado en vector) y cloruro de magnesio. Estas condiciones se resumen a continuación:

Condiciones estandarizadas para la obtención de productos de PCR

(ver técnica de PCR)

1^{er} PCR

2 μ l dNTPs 10mM
1 μ l T7promotor (200ng)
1 μ l oligo.directo mutagénico (200ng)
1 μ l DNA TbtIM (100ng)
10 μ l amortiguador de MgCl₂ 1.5mM
1 μ l enzima Expand High Fidelity
(3.5 u/ μ l)
75 μ l H₂O
100 μ l volumen total

2^{do} PCR

2 μ l dNTPs 10mM
1 μ l T7terminador (200ng)
1 μ l oligo.reverso mutagénico(200ng)
1 μ l DNA TbtIM (100ng)
10 μ l amortiguador de MgCl₂ 1.5mM
1 μ l enzima Expand High Fidelity
(3.5 u/ μ l)
75 μ l H₂O
100 μ l volumen total

3^{er} PCR

2 μ l dNTPs 10mM
1 μ l T7promotor (200ng)
1 μ l T7terminador (200ng)
X μ l 1^{er} PCR (200ng)
Y μ l 2^{do} PCR (200ng)
10 μ l amortiguador de MgCl₂ 1.5mM
1 μ l enzima Expand High Fidelity
(3.5 u/ μ l)
Z μ l H₂O
100 μ l volumen total

(X y Y = Vol. que contenga
200 ng de DNA).

(Z = Vol. para completar
100 μ l).

b) Determinar las condiciones de amplificación del PCR: temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, número de ciclos de amplificación y tiempo en cada paso en los ciclos de amplificación.

Las condiciones favorables para la amplificación de los fragmentos de PCR fueron las siguientes:

PASOS	TIEMPO (MINUTOS)	TEMPERATURA (°C)	NUMERO DE CICLOS
Desnaturalización	5	94	1
Desnaturalización	1	94	30
Alineamiento	1	55	30
Extensión	1	72	30
Extensión final	10	72	1

5.1.3. Técnica de PCR

Para obtener la amplificación completa del gen por la técnica de PCR se hicieron 3 PCRs como se menciona a continuación (ver figuras 6 y 7).

En el 1^{er} PCR, se sintetiza del extremo 5' del oligonucleótido T7 promotor hasta el extremo 3' del oligonucleótido mutagénico reverso. Se utilizan para esta reacción, el oligonucleótido T7 promotor, el oligonucleótido mutagénico reverso y el templado. El producto de PCR tiene un peso molecular de 134 pares de bases (pb), de las cuales 83 pb corresponden al vector pET-3a y 51 pb al inicio de la secuencia del gen.

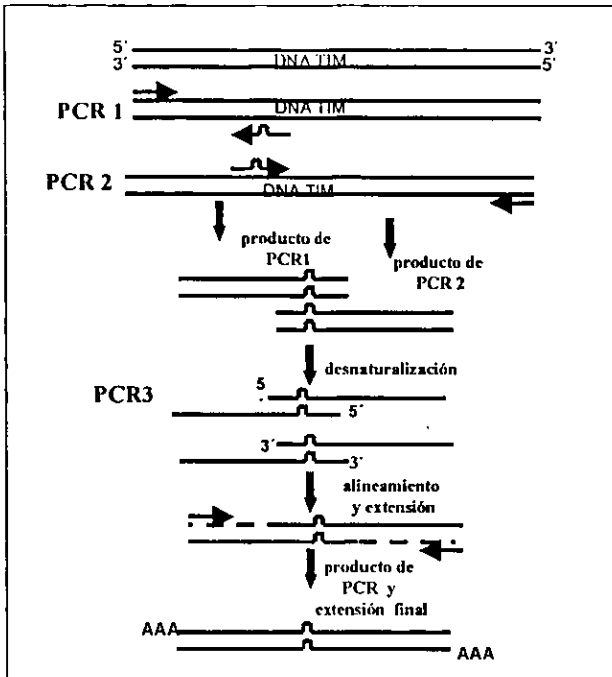


Figura 6. Mutagénesis por PCR. Los oligonucleótidos están representados con flechas que alinean en la secuencia de ADN. Oligonucleótido T7 promotor \rightarrow oligonucleótido T7 terminador \leftarrow oligonucleótido mutagénico directo \rightarrow oligonucleótido mutagénico reverso \leftarrow .

En el 2^{do} PCR, se amplificó del extremo 3' del oligonucleótido T7 terminador hasta el extremo 5' del oligonucleótido mutagénico directo. Se utilizan para esta reacción, el oligonucleótido T7 terminador, el oligonucleótido mutagénico directo y el templado. El producto de PCR tiene un peso molecular de 1,043 pb, de los cuales 103 pb corresponden al vector pET-3a y 940 pb a la secuencia del gen.

En el 3^{er} PCR se amplifica el gen completo de 1,156 pb, utilizando los productos del 1^{er} y 2^{do} PCR. Si consideramos la suma del 1^{er} y 2^{do} PCR son 1173 pb, pero debemos considerar que el 1^{er} y 2^{do} PCR son sintetizados a partir del extremo 5' de los oligonucleótidos mutagénicos lo que hacen que aumente 21 pb más (que corresponden a la secuencia de solapamiento entre los dos oligonucleótidos).

El gen completo de la TIM tiene un peso molecular de 970 pb, sin considerar los extremos del vector pET-3a. La extensión final durante 10 min a 72°C, se utilizó para agregar en los extremos del producto de PCR residuos de desoxiadenuinas (AA) mismos que nos permiten clonar fácilmente el producto de PCR. La enzima que se utilizó (Expand™ High Fidelity PCR System de Boehringer Mannheim) tiene como característica que agrega estas desoxiadenuinas al final del gen.

c) Una vez obtenido los productos de PCR, se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (figura 7).

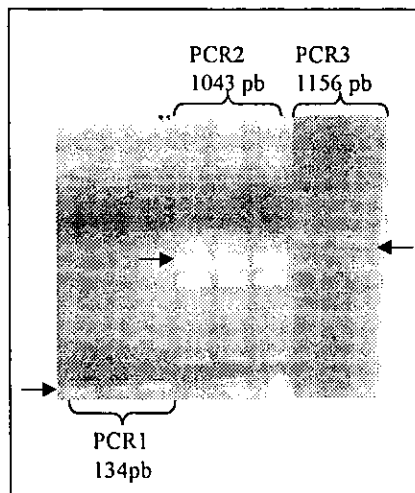


Figura 7. Gel de agarosa al 1%, que muestra los fragmentos de PCR obtenidos.

5.2. Obtención de clonas

Los productos de amplificación por PCR que se obtuvieron, se clonaron en el vector de replicación pCR 2.1 (TA Cloning Kit de Invitrogen), el cual tiene el promotor de LacZ, resistencia a ampicilina y kanamicina (figura 8). Otra característica del vector pCR 2.1 es que contiene un sitio para Eco R1, cerca del sitio de clonación, lo que permite realizar un análisis de restricción para confirmar que el gen está clonado.

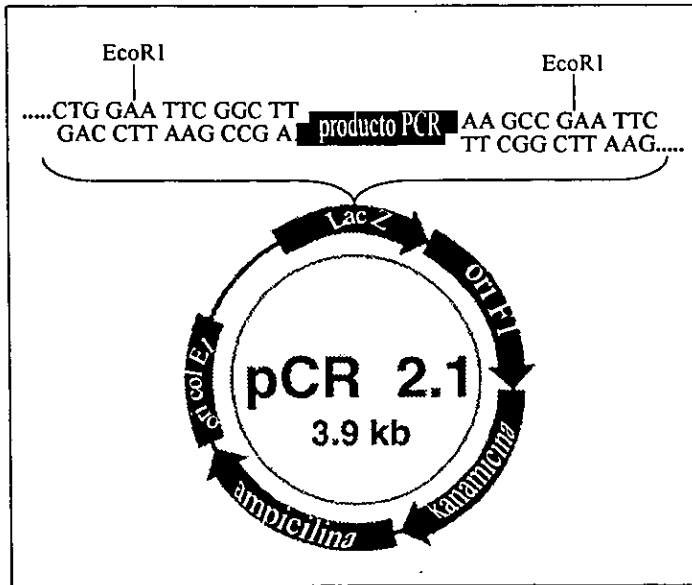


Figura 8. Componentes del vector pCR 2.1 y sitio de clonación del producto de PCR, flanqueado en cada extremo por el sitio de restricción de EcoRI.

Además es un vector lineal, que en sus extremos 5' y 3' contiene residuos de desoxitimidina (TT). Esta característica permite clonar fácilmente productos de PCR que en sus extremos 5' y 3' contengan residuos de desoxiadenina (AA) (figura 9).

El promotor LacZ permite la expresión de la β -galactosidasa que da como resultado colonias azules (vector religado) cuando se está expresando la enzima. La presencia de colonias blancas indica una interrupción en el promotor LacZ por la presencia del producto de PCR clonado.

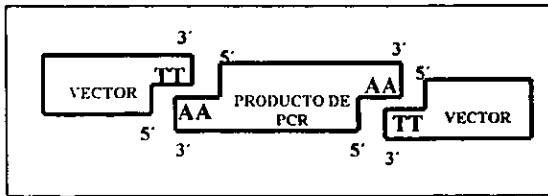


Figura 9. Clonación del producto de PCR poliadenilado en el vector pCR 2.1 por medio de las desoxitimidinas en los extremos 5' y 3' del vector.

La clonación se realizó con la enzima T4 ADN ligasa e incubando a 16°C durante 12 h y posteriormente se transformó en la cepa de *E. coli* TG-1 o DH α S'.

A las colonias blancas que se obtuvieron se les extrajo ADN (por QIAprep Plasmid de QIAGEN) y se les realizó un análisis de restricción con la enzima Eco R1. La digestión se analizó en un gel de agarosa al 1% con lo que se confirmó la clonación del gen (figura 10).

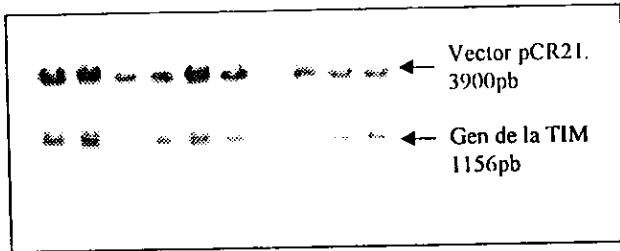


Figura 10. Digestión de las clonas blancas con la enzima EcoR1, para confirmar la clonación del gen.

5.3. Secuenciación del ADN

Las mutantes se seleccionaron por secuenciación del ADN. El método de secuenciación utilizado fue el de Sanger et al. (51) utilizando PCR para la reacción (AmpliCycle Secuencing Kit de PERKIN ELMER). Se confirmó por secuenciación del ADN que nuestras clonas contenían efectivamente el gen de la TIM y además se determinó que mutación tenía. También verificamos que el gen no tuviera algún otro error o mutación dentro de su secuencia.

5.4. Clonación en el vector de expresión pET-3a

Una vez que la secuencia del gen estaba correcta y tenía la mutación deseada, se realizó una digestión con la enzima NdeI (se debe considerar que el gen está clonado en el vector pCR 2.1 y que para la expresión de la proteína debemos subclonarlo en un vector de expresión, como el pET-3a).

Al mismo tiempo se digirió el vector pET-3a con la enzima de restricción NdeI, para así poder clonar el gen de la TIM en el vector (figura 11).

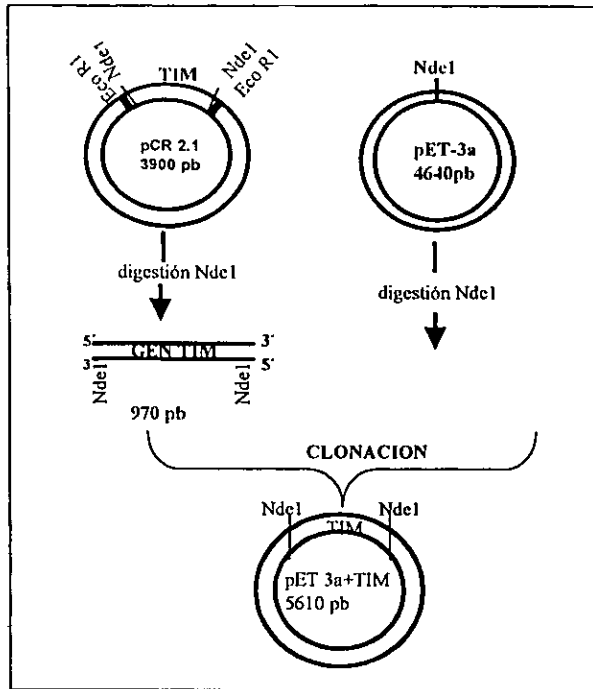


Figura 11. Subclonación del gen TIM pasando del vector pCR 2.1 al vector pET-3a.

Para la clonación utilizamos un sitio único (NdeI) en el vector pET3a. Es por ello que existe la posibilidad de que el gen se clone en cualquier dirección. Esto se refiere a que no se clone en dirección 5'-3' a partir del promotor (T7 promotor) del vector, por lo cual podría no expresarse la proteína.

Esta posibilidad la pudimos descartar de dos formas:

La primera secuenciando el gen hasta el promotor y la segunda por un análisis del gen con la enzima de restricción pST1. Esta enzima hace un corte en el gen de la TIM en el nucleótido 577 y un corte en el vector pET-3a en el nucleótido 3340.

Si el gen se clonó en dirección 5'-3', a partir del promotor (T7 promotor) del vector, se obtienen dos fragmentos uno con un peso molecular de 1877 pb y otro con un peso molecular de 3733 pb, como se observa en la figura 12a.

Si el gen se clonó en dirección 3'-5', a partir del promotor (T7 promotor) del vector, se obtienen dos fragmentos con pesos moleculares diferentes a los anteriores, un fragmento con un peso molecular de 1693 pb y otro fragmento con un peso molecular de 3917 pb, como se muestra en la figura 12b. Por este método y por secuenciación del ADN se seleccionan las clonas que tenían el gen en la dirección 5'-3', lo cual nos permitió expresar la proteína.

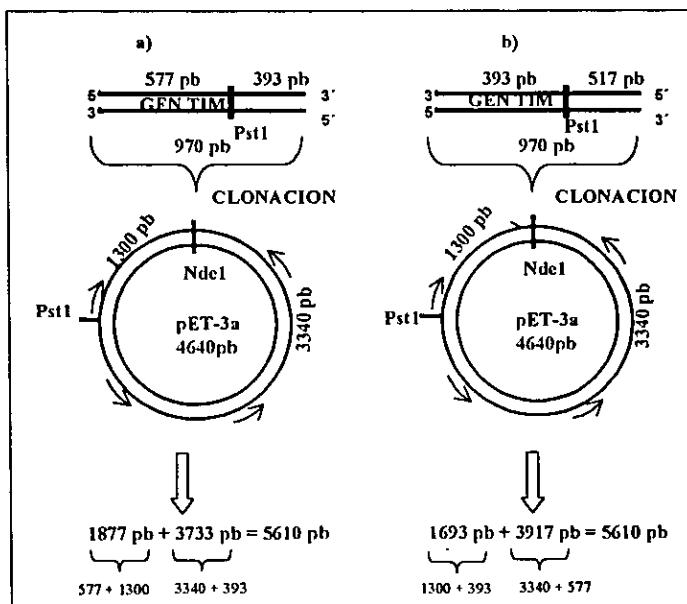


Figura 12. Mapa de restricción del gen TIM y el vector pET-3a con la enzima pST1.

5.5. Expresión de las proteínas mutantes

Después de haber clonado los genes mutantes en el vector de expresión pET-3a, se transformaron en la cepa BL21DE3pLysS de *E. coli* para su expresión.

El sistema de expresión utilizado (pET system de Novagen) ha sido desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los genes blanco se clonan en el vector pET-3a y se transforman en la cepa BL21DE3pLysS, que contiene una copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa del fago T7. El gen de la RNA polimerasa del fago T7 se encuentra bajo el control del promotor lac UV5, que a su vez es inducido por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), ver la figura 13. Esta cepa además contiene un plásmido pLysS que codifica para la lisozima del fago T7, la cual es un inhibidor de la RNA polimerasa del mismo fago, por lo que puede haber una expresión controlada del gen que está clonado en el pET-3a. La producción de lisozima por parte de la cepa, permite que la pared celular sea digerida por esta y sea mucho más sencillo romper las células. El plásmido pLysS confiere resistencia a cloramfenicol.

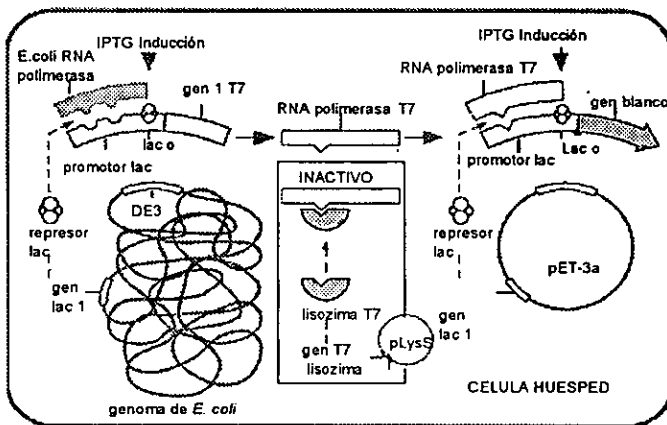


Figura 13. Elementos que componen el sistema de expresión pET.

La expresión de la proteína silvestre y de las proteínas mutantes se realizó de la siguiente manera: las cepas que expresaban los genes se crecieron a 37°C en medio de cultivo Luria Bertani (LB) con 100 µg/ml de ampicilina. Cuando los cultivos llegaron a una absorbencia a 600 nm=0.6, se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 0.4 mM. En el caso de la cepa silvestre se continuó el crecimiento a 37°C durante toda la noche (12h).

Para expresar las proteínas mutantes fue necesario realizar ensayos de inducción a diferentes temperaturas. Se realizaron inducciones a 21, 30 y 37°C, durante 3h y toda la noche. La expresión de las proteínas mutantes se confirmó por análisis electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, la expresión se consideró exitosa cuando se observó una banda con peso molecular de 27 Kda (figura 14).

5.6. Purificaciones en extractos crudos

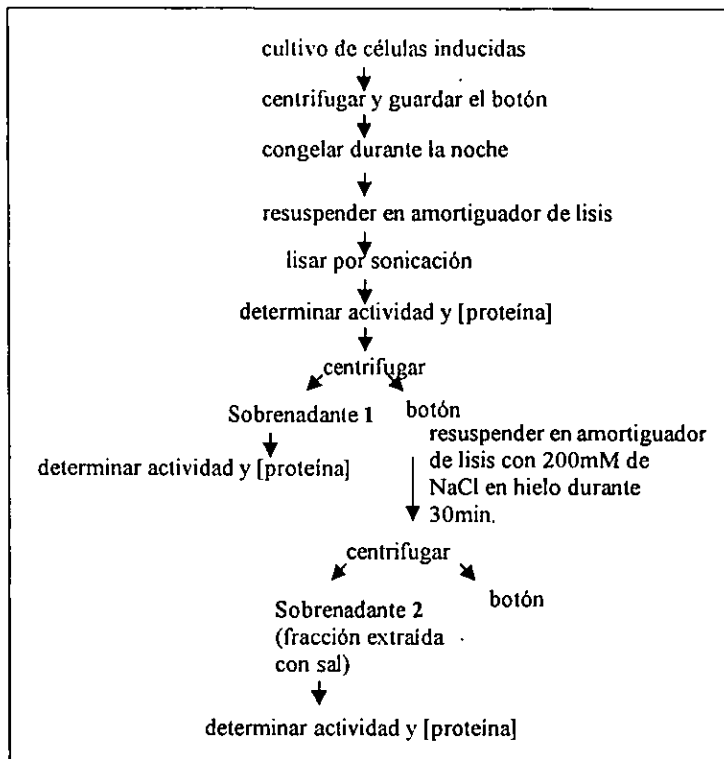
Para hacer un análisis del comportamiento de las diferentes TIMs mutantes realizamos una purificación en extractos crudos de cada una de ellas.

El protocolo para la purificación en extractos crudos, se realizó de acuerdo al protocolo de purificación para la enzima silvestre, pero sin llegar a completar la purificación (52), ver esquema 2.

Primero se realizó la inducción a partir de 250 ml de medio de cultivo LB por 3h, además de agregar ampicilina e IPTG se le agregaron 34 µg/ml de cloramfenicol.

Una vez realizada la inducción, el cultivo se centrifugó y el botón se guardó en congelación durante toda la noche, esto con el fin de facilitar el rompimiento de las bacterias después de un proceso de descongelación.

Posteriormente se resuspendieron las bacterias en amortiguador de lisis (MES/NaOH 25 mM pH 6.5, DTT 1mM, EDTA 1mM y PMSF 0.2mM) y se rompieron por sonicación. Es importante notar que en este paso, a diferencia del protocolo original de purificación de la enzima silvestre (52) las bacterias se lisan por sonicación y no por la French Press, debido a que trabajamos con cultivos más pequeños.



Esquema 2. Método utilizado para la purificación en extractos crudos de las TIMs mutantes.

El lisado de bacterias se centrifugo y el botón se resuspendió en amortiguador de lisis con una concentración alta de sal (NaCl 200 mM) durante 30 min. La función de la alta concentración de sales es liberar a la proteína de las membranas.

Posteriormente se centrifugó la suspensión y se obtuvo la enzima en el sobrenadante.

Es importante mencionar que a pesar de que no se terminó el proceso completo de purificación descrito para la TIM silvestre de *T. brucei* (52), las enzimas se obtuvieron bastante enriquecidas (figura 15).

5.7. Determinación de la concentración de proteína

Durante el proceso de purificación parcial la concentración de proteína de la TIM de *T. brucei* y de las diferentes proteínas mutantes se midió por el método BCA Protein Assay Reagent Kit. Esta técnica de cuantificación de proteínas está basada en la acción del ácido bicinconínico (BCA), que reacciona con cuatro aminoácidos (cisteína, cistina, triptofano y tirosina) dando el color a la reacción, con un máximo de absorbencia a 562 nm. El método mide proteína en un rango de 20 µg/ml a 200 µg/ml (53).

5.8. Determinación de la actividad catalítica

La actividad enzimática de las proteínas se siguió espectrofotométricamente por la disminución en la absorbencia a 340 nm, causada por la oxidación del NADH a 25°C. La mezcla de reacción tenía amortiguador TEA 100 mM/EDTA 10mM, pH 7.4, gliceraldehído-3-fosfato 1 mM, la enzima acopladora, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (20 µg/ml) y NADH 0.2 mM, en un volumen final de 1 ml. Para iniciar la reacción se agregó la proteína mutante. En el caso de las proteínas mutantes se agregaron diferentes concentraciones dependiendo del comportamiento de cada una de ellas. Para el ensayo con la enzima silvestre se usaron 5ng/ml de enzima.

6. Resultados

1.- Como resultados del primer objetivo, en el cual se propuso obtener proteínas mutantes que carecieran de la Cys14 y que la tuvieran sustituida por los 19 aminoácidos restantes utilizando la técnica de PCR, podemos concluir que se obtuvieron todas las proteínas mutantes por este método.

Para la obtención de las 19 mutantes, fue útil diseñar oligonucleótidos mutagénicos con posición degenerada.

Como se menciona en la sección de materiales y métodos, primero se diseñaron oligonucleótidos mutagénicos, en los que el codón que corresponde a la Cys14 (TGC) se había sustituido por NNN. Con esta mezcla de nucleótidos es posible generar todas las combinaciones de codones (64 codones) y de esta manera obtener los 19 aminoácidos restantes. Nuestros resultados no fueron totalmente satisfactorios, con estos primeros oligonucleótidos.

Esto se debió a que en los genes mutantes se repetían los mismos aminoácidos en la posición 14, después de obtener la 2^{da} generación de productos de PCR. Cabe mencionar que estos aminoácidos repetidos no siempre estaban codificados por el mismo codón. Por ejemplo: se obtuvieron tres mutantes para prolina con los codones CCA, CCG y CCC.

Al hacer esta observación, cuando ya contábamos con 19 clonas, decidimos tabular nuestros resultados para ver si se podía notar alguna preferencia en el uso de codones.

En la tabla 3a se observa que existe una gran preferencia por ciertos nucleótidos en el codón que corresponde a la Cys14 (TGC). En la primera y segunda posición, la mayor preferencia fue por el nucleótido T y en la tercera posición por el nucleótido G. De estas 19 clonas logramos obtener 7 mutantes diferentes: C14V (GTG), C14F (TTT), C14L (TTA), C14S (TCG), C14Y (TAC), C14P (CCG) y C14K (AAG).

La posibilidad de encontrar un codón diferente que codificara para un aminoácido que no teníamos en cada producto de PCR nuevo era muy baja, es por ello que decidimos diseñar otros oligonucleótidos mutagénicos con el codón VVN en el lugar de la secuencia que corresponde a la Cys14. Estos oligonucleótidos se diseñaron tomando en cuenta los resultados previos y la probabilidad de obtener los 12 aminoácidos restantes (tabla 3b).

Con estos nuevos oligonucleótidos de 18 clonas estudiadas, en las mismas condiciones que las anteriores, logramos obtener 8 mutantes (tabla 3c):

C14T (ACG), C14H (GAG), C14Q (CAG), C14N (AAC), C14D (GAC), C14E (GAA), C14R (CGC), C14G (GGT).

Con el propósito de obtener más fácilmente los 3 aminoácidos que no se pudieron obtener con los oligonucleótidos anteriores (Ala, Trp e Ile), se diseñaron oligonucleótidos mutagénicos específicos para cada uno. Cabe mencionar que la mutante C14M ya existía en el laboratorio y aunque no se obtuvo con los oligonucleótidos con posición degenerada, ya no fue necesario obtenerla.

Es así como logramos cumplir con nuestro primer objetivo.

Es importante notar que estamos concientes que el método que seguimos no es la única técnica para obtener una mutagénesis exhaustiva.

Sabemos que el diseño de oligonucleótidos se pudo hacer en forma diferente, pero en un principio, esta forma nos pareció la más adecuada, aunque quizá tomó más tiempo y esfuerzo.

	1 ^{ra} posición	2 ^{ra} posición	3 ^{ra} posición
G	4	1	8
A	2	3	3
T	9	11	2
C	4	4	6
total	19	19	19

Tabla 3a. Mutantes obtenidas con los oligonucleótidos NNN. Se muestra el número de nucleótidos obtenidos por posición, correspondiente a la 1^{ra}, 2^{da} y 3^{ra} posición del gen, en el codón que codifica para la Cys14. En negritas se muestra la posición de mayor preferencia.

	1 ^{ra} posición	2 ^{ra} posición	3 ^{ra} posición
G	12	10	7
A	8	10	7
T			7
C	8	8	7

Tabla 3b. Muestra el número de nucleótidos necesarios para generar nuevos codones. Se obtuvieron en base a los aminoácidos que faltaban por obtener, considerando todos los codones que codifican para esos aminoácidos.

	1 ^{ra} posición	2 ^{ra} posición	3 ^{ra} posición
G	6	9	5
A	5	8	4
T			1
C	7	1	8
total	18	18	18

Tabla 3c. Mutantes obtenidas con los oligonucleótidos VVN. Se muestra el número de nucleótidos obtenidos por posición, correspondientes a la 1^{ra}, 2^{da} y 3^{ra} posición del gen, en el codón que codifica para la Cys14. En negritas se muestra la posición de mayor preferencia.

2.- El segundo objetivo fue expresar las proteínas mutantes en un sistema bacteriano. Las expresiones para las proteínas mutantes se realizaron después de agregar el inductor IPTG a 3 temperaturas diferentes 21, 30 y 37°C, durante un tiempo de 3 h y toda la noche. Probamos estas condiciones debido a que en trabajos anteriores se ha observado que la expresión de algunas proteínas mutantes requieren de condiciones diferentes a la enzima silvestre para lograr una buena expresión (20, 52).

Los resultados más relevantes demuestran que 3 h de inducción es suficiente para obtener buena cantidad de proteína. (figura 14). Este comportamiento se repite en todas las proteínas mutantes y además se observa que las inducciones a temperaturas más bajas, como 21 y 30°C, son mucho mejores que a 37°C. En algunos casos se observa a 37°C una mayor proporción de una banda de menor peso molecular que la TIM. Esta proteína es difícil eliminar en un proceso de purificación y, en algunos otros casos, pudiera indicar una posible degradación de la TIM (figura 14).

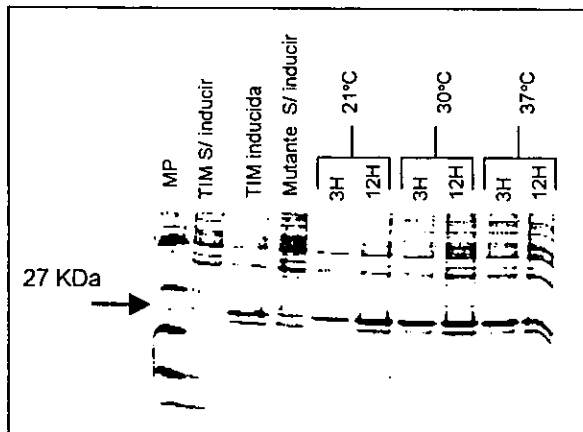


Figura 14. Expresión de la mutante C14S de la TIM de *T. brucei* a diferentes tiempos y temperaturas, comparada con la TIM silvestre expresada a 37°C. Analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida (16%) con SDS.

3.- El último objetivo planteado fue medir la actividad enzimática en extractos crudos para cada enzima mutante. Para realizar estos experimentos primero seguimos un protocolo de purificación parecido al de la TIM silvestre pero con algunas modificaciones, con el fin de obtener proteínas suficientemente puras para tener un buen estimado de su actividad específica (esquema 2 y figura 15).

De todo el grupo de proteínas mutantes algunas de ellas formaron agregados (cuerpos de inclusión), por lo que en estos casos fue necesario centrifugar a altas velocidades (45 min a 200 000 xg) para eliminar los precipitados (ver tablas 4a y b).

La actividad enzimática se midió tanto en lisados de bacterias (tabla 4a), como en las fracciones extraídas con sal (tabla 4b). Se determinaron la actividad total, la concentración de proteína total y la actividad específica en ambos casos. Las muestras extraídas con sal también se analizaron en electroforesis en geles de acrilamida SDS y densitometría del mismo gel (figura 15). Esto se muestra en la última columna de la tabla 4b como área relativa en por ciento, los valores corresponden a la intensidad de la banda del monómero de la TIM con un peso molecular de 27 Kda.

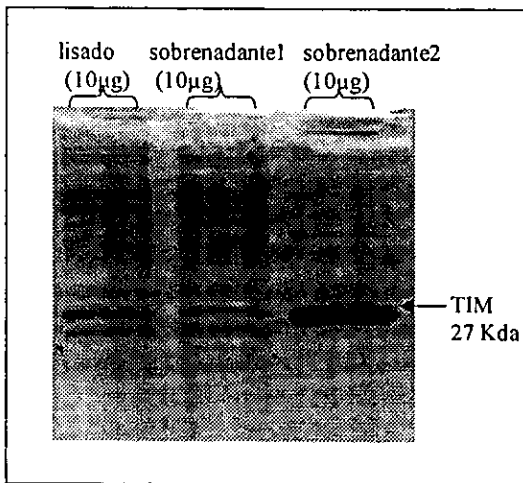


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida (16%) con SDS de la mutante C14A de la TIM de *T. brucei* obtenida después de las purificaciones en extractos crudos.

Es importante mencionar que durante la obtención de estas 19 proteínas mutantes la Dra. Georgina Garza-Ramos purificó a homogeneidad y caracterizó las proteínas mutantes C14S, C14V, C14L y C14F.

Este grupo de proteínas mutantes puras nos sirvieron como control de comparación con las actividades medidas para las mismas proteínas mutantes en extractos crudos. Sin embargo para estar más seguros de los resultados obtenidos, para algunas de estas enzimas se repitió el proceso de purificación en extractos crudos. Los resultados en actividad enzimática obtenidos fueron similares a los resultados mostrados en este trabajo. La comparación de ambas mediciones nos indica que podemos confiar en los valores de actividades enzimáticas de las enzimas mutantes obtenidas por el método de purificación en extractos crudos que se siguió.

Los resultados de las enzimas mutantes los podemos clasificar en 4 grupos, de acuerdo a la actividad enzimática que se obtuvo (tabla 4 a y b). Es importante mencionar que se midió la actividad de la TIM endógena de la cepa de *E. coli* utilizada (BL21DED3plysS), la cual se muestra como *E. coli* en las tabla 4 a y b.

1.- Grupo de enzimas mutantes que forman agregados (cuerpos de inclusión): C14D, C14H, C14L, C14M, C14K y C14Y. Además de formar agregados, estas proteínas presentan como característica baja actividad enzimática, algunas son inestables (se muestra en la tabla 4a y b como NC: actividad no constante) y el rendimiento en los extractos crudos es mucho muy bajo. Cabe mencionar que en experimentos anteriores con un miembro de este grupo de mutantes (C14L), la enzima se purificó parcialmente y el rendimiento final fue muy bajo (20).

2.- Hay un segundo grupo de enzimas que no forman agregados y que tienen actividad enzimática muy baja, que son: C14E, C14Q, C14I, C14F y C14W. Los resultados obtenidos con la proteína mutante C14F indican que es posible purificarla a homogeneidad, con bajo rendimiento y baja actividad enzimática. Además en experimentos de filtración en gel y ultra centrifugación con sedimentación al equilibrio se encontró que la enzima es un monómero (Garza-Ramos, G. y col, resultados no publicados). En base a estas observaciones podemos explicar varias características del comportamiento de la enzima.

ENZIMA	TOTAL μmol/min	PROTEINA TOTAL mg.	ACTIVIDAD ESPECIFICA μmol/min/mg
E.coli	1449	69	21

1.- TIMs mutantes que forman agregados y con baja actividad enzimática.

C14D	2964	52	57
C14H	1296	48 NC	27
C14L	242	22	11
C14M	187	17	11
C14K	1352	52 NC	26
C14Y	1008	48 NC	21

2) TIMs mutantes con baja actividad enzimática

C14E	1078	49	22
C14Q	780	39	20
C14I	1920	40	48
C14F	1540	70	22
C14W	1764	63	28

3) TIMs mutantes con actividades enzimáticas intermedias

C14G	6734	91 NC	74
C14N	8385	65 NC	129
C14R	28362	29 NC	978

4) TIMs mutantes con actividades enzimáticas similares a la enzima silvestre.

silvestre	49280	55	896
C14A	145340	86	1690
C14S	78720	64	1230
C14P	57860	55	1052
C14T	107901	57	1893
C14V	85008	88	966

Tabla 4a. Se muestran las actividades determinadas para las TIMs mutantes después de lisar las bacterias. NC (actividad no constante) significa que son enzimas inestables.

ENZIMA	ACTIVIDAD TOTAL $\mu\text{mol}/\text{min}$	PROTEINA TOTAL mg.	ACTIVIDAD ESPECIFICA $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	AREA RELATIVA %
E.coli	31	4.02	7.6	

1.- TIMs mutantes que forman agregados y con baja actividad enzimática.

C14D	208	11.7	17.8	46.7
C14H	54	8.8	6.13 NC	30.8
C14L	7.55	3.24	2.33	23.1
C14M	4.8	3	1.62	19.9
C14K	224	10.2	22 NC	28
C14Y	45.8	8.8	5.2 NC	44.5

2) TIMs mutantes con baja actividad enzimática

C14E	29	4.7	6.17	38.2
C14Q	29	6.9	4.2	44.1
C14I	58	9.3	6.2	40.3
C14F	168	7.3	23	59.8
C14W	40.6	6.5	6.25	15.2

3) TIMs mutantes con actividades enzimáticas intermedias

C14G	2251	14.3	157.4 NC	74.8
C14N	5504	9.9	556 NC	72.2
C14R	2524	4.7	537 NC	68.4

4) TIMs mutantes con actividades enzimáticas similares a la enzima silvestre.

Silvestre	36540	17.5	2088	85.9
C14A	111347.5	27.5	4049	87.4
C14S	22271	9.7	2296	73.3
C14P	25747	10.6	2429	85.9
C14T	92620	21.4	4328	91.6
C14V	34090	14.7	2319	82.5

Tabla 4b. Se muestran las actividades determinadas de las TIMs mutantes en las fracciones extraídas con sal. NC (actividad no constante) significa que son enzimas inestables.

3.- El tercer grupo lo constituyen enzimas con actividades enzimáticas intermedias y que presentan como característica particular velocidades de oxidación del NADH no constantes (NC) durante el tiempo en que se realizaron los experimentos (ver discusión). Estas mutantes son: C14G, C14N y C14R.

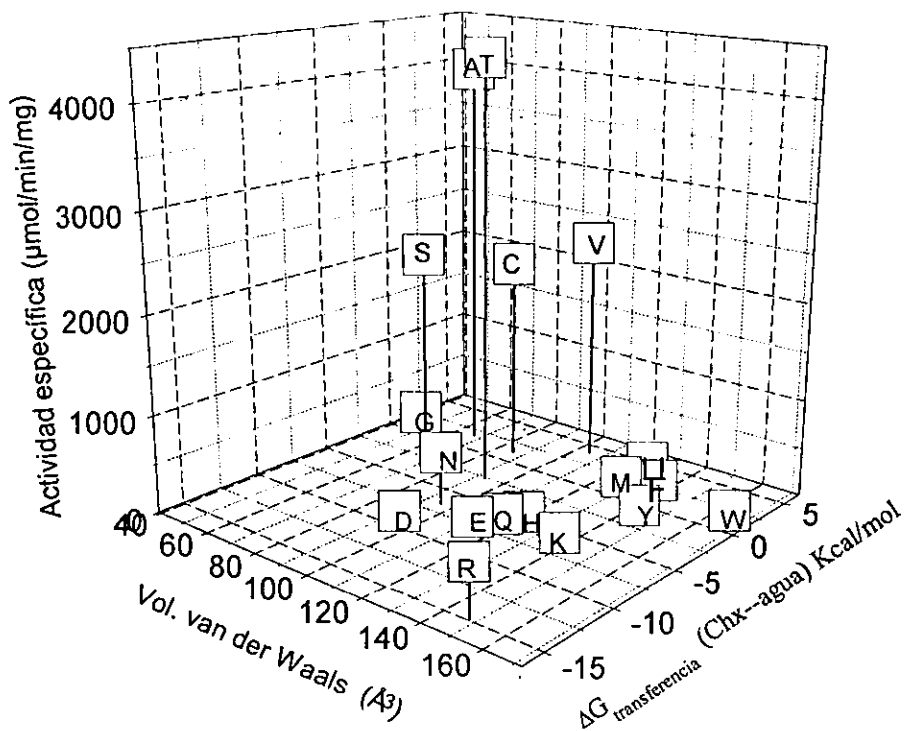
4.- El cuarto grupo es de proteínas que muestran actividad enzimática y rendimientos similares a la silvestre. Estas son las proteínas mutantes C14A, C14S, C14P, C14T y C14V. Los datos de la purificación y caracterización de las enzimas con las mutaciones C14S y C14V indican que estas proteínas presentan actividades iguales a la silvestre, pero con características de estabilidad y termoestabilidad diferentes (Garza-Ramos, G. y col., resultados no publicados).

Buscando explicar el comportamiento de las diferentes enzimas mutantes dentro de los cuatro grupos de mutantes descritos podemos basarnos en dos características de los aminoácidos.

La primera característica es el tamaño o volumen de van der Waals (medido en \AA^3) y la segunda la hidrofobicidad (determinado por el $\Delta G_{\text{transferencia}} (\text{Chx} \rightarrow \text{agua})$ Kcal/mol) de cada uno de los aminoácidos.

Cuando graficamos el volumen de van der Waals y la hidrofobicidad contra la actividad específica observada en cada mutante obtenemos la gráfica 1 (datos obtenidos de la tabla 4b). La enzima C14P no se muestra en la gráfica debido a que la prolina no se encuentra en las tablas de hidrofobicidad.

Se observa que aquellas enzimas que presentan actividad similar a la silvestre caen dentro de un rango de tamaño e hidrofobicidad muy cercano al de la cisteína ($67\text{-}105 \text{\AA}^3$). El resto de las proteínas mutantes, ya sea con mayor o menor tamaño e hidrofobicidad al de la cisteína presentan actividades enzimáticas bajas.



Gráfica 1. Se muestra la correlación entre el tamaño (volumen de van der Waals Å³), la hidrofobicidad ($\Delta G_{\text{transferencia}}(\text{Chx} \rightarrow \text{agua})$ Kcal/mol) del aminoácido sustituido y la actividad específica de la TIM (se muestra como C) y las enzimas mutantes (datos obtenidos de la tabla 4b).

7. Discusión:

En este trabajo reemplazamos por mutagénesis exhaustiva la Cys14 de la interfase de la TIM de *T. brucei* con el fin de dilucidar el efecto de la sustitución en la estabilidad conformacional de la enzima y para explorar una posible resistencia a fármacos por parte del parásito (ver justificación). La Cys14 contribuye a la estructura y estabilidad de la enzima. Esto se ha demostrado por mutaciones de la metionina 14 por glutamina en la TIM de humano (30) y la cisteína 14 por leucina en la TIM *T. brucei* (20). En ambos casos se produjeron enzimas inactivas.

Para obtener los 19 genes mutantes que posteriormente expresaran las diferentes proteínas utilizamos el método de PCR. Se diseñaron 2 oligonucleótidos mutagénicos con posición degenerada en la posición 14 (NNN y VVN) y 3 oligonucleótidos mutagénicos sitio dirigidos (ver diseño de oligonucleótidos). Con todos estos oligonucleótidos generamos los 19 genes mutantes y posteriormente expresamos la proteína en un sistema bacteriano. En la expresión de las 19 proteínas mutantes el paso más importante fue encontrar la temperatura de expresión. Para la mayoría de las TIMs mutantes las temperaturas óptimas de expresión fueron 21 y 30° C (ver Figura 14). Cabe mencionar que se ha observado que la expresión de algunas TIM mutantes requieren de condiciones diferentes a la enzima silvestre (20, 52).

Posteriormente se determinó la actividad enzimática para cada enzima mutante después de un proceso de purificación en extractos crudos (esquema 2). Con estos resultados observamos que el cambio por mutagénesis produjo enzimas con actividades catalíticas diferentes a la enzima silvestre.

Agrupamos a las diferentes proteínas mutantes con base en su capacidad para formar agregados durante la purificación en extractos crudos y también considerando cual era la actividad específica para cada enzima mutante. Se obtuvieron 4 grupos con estas características que se muestran en las tablas 4a y b.

Para explicar estos cambios en actividades de las 19 enzimas mutantes debemos considerar cómo se encuentra la Cys14 en la estructura tridimensional de la TIM (ver figura 5).

La Cys14 es un aminoácido de interfase en el asa 1 que hace contacto con aminoácidos del asa 3 de la otra subunidad y el espacio que ocupa debe ser apropiado para el tamaño de la cisteína. Esto nos lleva a pensar que otro aminoácido con características diferentes puede cambiar la estructura de la enzima, por lo que la estabilidad de la enzima se puede ver afectada al cambiar la interacción entre los dos monómeros. Existen reportes en la literatura que sugieren que al cambiar por mutagénesis un residuo se deben considerar el tamaño, la hidrofobicidad y la carga del aminoácido. Estas características ayudan a mantener las interacciones intramoleculares que se forman en la nueva proteína (54, 55, 56).

Consideramos que en las enzimas mutantes producidas en este trabajo el tamaño del aminoácido (determinado por su volumen de van der Waals en \AA^3) es una característica que influye en la estabilidad de la enzima. También es probable que además se necesite que la hidrofobicidad del aminoácido sea similar a la cisteína, para mantener bien estructurada a la enzima.

El nivel de actividad enzimática es función del tamaño e hidrofobicidad de los aminoácidos como observamos claramente en la gráfica 1. Ahí también se observa que un grupo de enzimas mutantes: C14A, C14S, C14V, C14T y C14P, (este último no se muestra en la gráfica 1 debido a que la prolina no está dentro de las tablas de hidrofobicidad, ver tablas 4a y b) presentan actividades catalíticas similares a la de la enzima silvestre. Sin embargo, los resultados muestran que las enzimas mutantes C14A y C14T tienen mayor actividad enzimática que la enzima silvestre. Aquí es importante mencionar que estas variaciones en actividad enzimática probablemente se deben a que las enzimas no están totalmente puras, pero aún tenemos que comprobarlo.

Pensamos que el hecho de que un grupo de enzimas mutantes tengan la actividad enzimática similar a la silvestre se debe a que sus aminoácidos tienen un tamaño similar a la cisteína (86\AA^3). Este oscila entre 67 y 105\AA^3 para las enzimas mutantes y, además, en la gráfica se observa que también la hidrofobicidad del aminoácido es importante para que la enzima sea catalíticamente activa.

Adicionalmente, datos que indican que la mutante C14F produce una proteína que forma monómeros (datos no publicados) apoyan la hipótesis de que el tamaño y la hidrofobicidad de ese aminoácido son importantes

En el caso de la glicina, el aminoácido más pequeño (48 \AA^3), es probable que su tamaño desestabilice la formación de los dímeros. Las enzimas mutantes C14G, C14N y C14R tienen actividades intermedias y presentan como característica velocidades de oxidación del NADH no constantes (en la tabla 4a y b se muestra como NC). En estos casos es posible que la mutación genere dímeros inestables y que esta inestabilidad sea la responsable del decaimiento de la actividad que se observa.

Para los otros dos grupos de enzimas mutantes (que forman agregados y poseen baja actividad específica) (tablas 4a y b) la explicación que podemos dar a su comportamiento es que tienen aminoácidos más grandes y/o con hidrofobicidad diferente a la cisteína, pero aún no sabemos más de su comportamiento.

Por otra parte, en estudios de mutagénesis exhaustiva de un residuo de la luciferasa de luciérnaga se encontraron enzimas mutantes más termoestables que la enzima silvestre (57). Los autores argumentan que el factor responsable de este aumento en la termoestabilidad de la enzima se debe a la hidrofobicidad del aminoácido por el cual se sustituyó (57). Este antecedente y los mencionados anteriormente (54, 55, 56) dejan clara la idea de que se necesitan ambas características en el aminoácido mutante para mantener la integridad de la estructura del dímero en la TIM de *T. brucei*.

Un dato interesante es que, a lo largo de la evolución no se han encontrado ni valina ni prolina ni alanina en la posición 14 de las 62 TIMs estudiadas (tabla 2), siendo estos aminoácidos que producen enzimas mutantes activas en la TIM de *T. brucei*. En cambio, si existen TIMs que poseen en esa posición serina y treonina. El por qué no se han presentado los primeros tres aminoácidos en la posición 14 son desconocidos.

Con los resultados obtenidos podemos contestar lo siguiente de las preguntas que surgieron en este trabajo (ver justificación):

- 1.- ¿Existe alguna mutación de la Cys14 que produzca una enzima igual a la silvestre?
Encontramos cinco enzimas mutantes que muestran una actividad enzimática igual a la enzima silvestre. Sin embargo, desconocemos si presentan otras características iguales.

2.- ¿Qué pasa con la actividad enzimática y estabilidad de las enzimas mutantes?

Las enzimas mutantes pudieron clasificarse en 4 grupos según su actividad enzimática. Un grupo de enzimas con actividad enzimática baja, un segundo grupo que también presentan actividad enzimática baja pero que forma agregados, el tercer grupo son enzimas con actividad enzimática intermedia y, finalmente, un grupo de enzimas que presentan actividad enzimática igual a la enzima silvestre.

En cuanto a la estabilidad de las enzimas mutantes sabemos que las enzimas C14G, C14N, C14R, C14H, C14K y C14Y son inestables. Esto se debe al decaimiento en la actividad enzimática que se observa a lo largo del tiempo en el cual se mide. Las otras enzimas no mostraron inestabilidad en las condiciones de medición utilizadas, pero es posible que sean inestables en otras condiciones.

3.- ¿Qué podría pasar con la TIM si el parásito llegara a mutar la Cys14 por otro aminoácido para defenderse del fármaco?

Por lo pronto se puede decir que hay 5 mutaciones posibles (C14A, C14P, C14S, C14T y C14V) que podrían conferir a la enzima resistencia contra un fármaco dirigido contra la Cys14.

Por otra parte, en estudios de resistencia a fármacos con otras enzimas se encontraron (por mutagénesis exhaustiva) genes mutantes que codifican para enzimas con una combinación favorable de resistencia a fármacos (58, 59, 60). Además se encontró que estas mutantes también poseen la misma actividad catalítica que la enzima silvestre. Para el caso de una de estas enzimas, la timidilato sintetasa (60), también se encontró que la unión del inhibidor a la enzima mutante es diferente que en la enzima silvestre.

Con estos antecedentes, es posible que las 5 mutaciones mencionadas anteriormente sean candidatos a producir enzimas que confieran al parásito resistencia a un fármaco dirigido contra la Cys14. Sin embargo, consideramos que podremos responder mejor a esta última pregunta estudiando más detalladamente las características cinéticas y fisicoquímicas de las mutantes activas (ver perspectivas).

8. Conclusiones:

- Por mutagénesis exhaustiva de la Cys14 de la TIM de *T. brucei* encontramos que el reemplazo de este residuo no sólo produce enzimas con baja actividad , sino que también produce enzimas con actividades enzimáticas similares a la silvestre.
- Para que las enzimas mutantes presenten actividad similar a la silvestre, la cisteína debe ser reemplazada por un aminoácido con características similares de tamaño e hidrofobicidad.
- De las 5 enzimas mutantes de la Cys14 con actividad enzimática similar a la silvestre, sólo serina y treonina son aminoácidos que se han encontrado en las 62 TIMs secuenciadas. Sin embargo, no se han encontrado ni valina ni prolina ni alanina que también producen enzimas activas en la TIM de *T. brucei*.
- Con base en estos resultados, pensamos que este trabajo es el fundamento para generar posteriormente la información tanto estructural y cinética de la enzima que puede explicar como podría producirse una posible resistencia a un fármaco dirigido contra la Cys14 de la TIM de *T. brucei*, ya que contamos con 5 enzimas mutantes con actividad similar a la TIM silvestre.

9. Perspectivas

Las perspectivas generadas por este trabajo son muy amplias. Debido a razones previamente expuestas en esta tesis, queremos concentrar nuestros esfuerzos en la caracterización de las enzimas con alta actividad. Nuestro plan de trabajo en los siguientes años es:

En un principio estudiaremos a las enzimas mutantes con actividades enzimáticas similares a la enzima silvestre: C14A, C14P, C14S, C14T y C14V.

Hasta el momento sabemos que este grupo de enzimas mutantes con aminoácidos de tamaño e hidrofobicidad similar a la TIM silvestre tienen actividades enzimáticas iguales, pero aún falta estudiar más a fondo a este grupo de enzimas y encontrar alguna explicación a su comportamiento.

Para lograr lo anterior, estudiaremos algunas propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de las enzimas mutantes como:

- Purificación a homogeneidad de las enzimas mutantes
- Determinar sus constantes cinéticas (K_m y V_{max})
- Determinar sus propiedades estructurales por fluorescencia y dicroísmo circular.
- Determinar la estabilidad a la temperatura y concentración de proteína.
- Determinar algunos de sus parámetros termodinámicos.
- Determinar la sensibilidad a agentes derivatizantes como el MMTS.

Es posible que este grupo de enzimas mutantes nos ayuden a entender mejor la importancia de la posición 14 para la actividad y estabilidad de la enzima.

Posteriormente estudiaremos a la enzima C14N. Esta enzima es bastante interesante, porque a pesar de que se encuentra dentro del rango de tamaño adecuado para que sea una enzima activa, se comporta diferente. Esta enzima es muy inestable.

La enzima C14G, es una enzima que queremos estudiar por ser la glicina el aminoácido más pequeño y por ser una proteína inestable.

Por otra parte se encontró que un aminoácido que tiene un tamaño muy grande (en volumen de Van der Waals), como C14F, dio como producto de la mutación una proteína en forma de monómero, creemos que la enzima C14W pueda comportarse de manera similar, es por ello que pensamos estudiarla.

10. Referencias:

- 1.- Boothroyd, J.C. (1985) Antigenic variation in African trypanosomes. *Ann. Rev. Microbiol.* 39, 475-502.
- 2.- Clarkson, A.B. and Böhn, F.H. (1976) Trypanosomiasis: an approach to chemotherapy by the inhibition of carbohydrate catabolism. *Science*, 194, 204-206.
- 3.- Fairlamb, A. (1982) Biochemistry of trypanosomiasis and rational approaches to chemotherapy. *Trends Biochem. Sci.* 249-252.
- 4.- Cross, G. A. M. (1996). Antigenic variation in trypanosomes: secrets surface slowly. *Bioessays*. 18 , 283-291.
- 5.- Manson-Bahr, P.E.C. and Apted, F.I.C. (1982) African trypanosomiasis. En: Cook, G. Manson's tropical diseases, chapter 5. Baillière Tindall Ed. London pp 72-75.
- 6.- Opperdoes, F.R. (1987) Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:127-151.
- 7.- Hannaert, V. and Michels, P.A.M. (1994) Structure, function, and biogenesis of glycosomes in kinetoplastida. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 2:205-212.
- 8.- Willson, M., Callens, M., Kuntz, D.A., Perié, J. and Opperdoes, F.R. (1993) Synthesis and activity of inhibitors highly specific for the glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 201-210.
- 9.- Wierenga, R. K., Swinkels, B., Michels, P. A. M., Osinga, K., Misset, O., Beeumen, J. V., Gibson, W. C., Postma, J. P. M., Borst, P., Opperdoes, F. R. and Hol, W. G. J. (1987) Common elements on the surface of glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei* may serve as topogenic signals for import into glycosomes. *EMBO J.* 6, 215-221.
- 10.- Kuntz, D. A., Osowski, R., Schudok, M., Wierenga, R. K., Müller, K., Kessler, H. and Opperdoes, F. R. (1992) Inhibition of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with cyclic hexapeptides. *Eur. J. Biochem.* 20, 441-447.
- 11.- Voogd, T. E., Vansterkenburg, E. L. M., Wilting J. and Janssen, L. H. M. (1993) Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacol. Rev.* 45, 177-203.
- 12.- Baylis, M. and Stevenson, P. (1998) Trypanosomiasis and tsetse control with insecticidal pour-ons- fact and fiction?. *Parasitol Today* 7, 287-291
- 13.- Bayles, M., Mbwabi, A. L. (1995) Feeding behavior of tsetse flies (*Glossina pallidipes austeni*) on trypanosoma-infected oxen in Kenya. *Parasitology* 110, 297-305

- 14.- Ruepp, S., Furger, A., Kurath, U., Renggli, C. K., Hemphill, A., Brun, R. and Roditi, I. (1997) Survival of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly is enhanced by the expression of specific forms of procyclin. *J. Cell. Biol.* 137, 1369-1379.
- 15.- Verlinde, C.L.M.J. and Hol, W.G.J. (1994) Structure-based drug design : progress, results and challenges. *Structure* 2, 577-587.
- 16.- Bakker, B.M., Michels, P.A.M., Opperdoes, F.R. and Westerhoff, H.V. (1997) Glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei* can be understood in terms of the kinetics of the glycolytic enzymes. *J. Mol. Chem.* 272, 3207-3215.
- 17.- Noble, M. E. M, Wierenga, R. K., Lambeir, A. M., Opperdoes, F.R., Thunnissen, A-M. W. H., Kalk, K. H., Groendijk, H. and Hol, W. G. J. (1991)The adaptability of the active site of trypanosomal triosephosphate isomerase as observed in the crystal structures of three different complexes. *Proteins* 10, 50-69.
- 18.- Verlinde, C.L.M.J., Merritt, E.A., Akker, V. A. F., Kim, H., Feil, I., Delboni, L.F., Mande, S.C., Sarfaty, S., Petra, P.H. and Hol, W.G.J. (1994) Protein crystallography and infectious diseases. *Protein Sci.* 3, 1670-1686.
- 19.- Fairlamb, A.H. and Cerami, A. (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 695-729.
- 20.- Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Dominguez, A., and Pérez-Montfort, R. (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action -studies with triosephosphate isomerase. *Chem. Biol.* 2, 847-855.
- 21.- Sommer, J.M. and Wang, C.C. (1994) Targeting proteins to the glycosomes of African trypanosomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 105-138.
- 22.- Verlinde, C.L.M.J., Callens, M., Van-Calenbergh, S., Van-Aerschot, A., Herdewijn, P., Hannaert, V., Michels, P.A.M., Opperdoes, F.R. and Holl, W.G.J. (1994) Selective inhibition of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: toward new drugs for the treatment of sleeping sickness. *J. Med. Chem.* 37, 3605-3613.
- 23.- Hanau, S., Rippa, M., Bertelli, M., Dallochio, F. and Barrett, M.P. (1996) 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* kinetic analysis and inhibition by trypanocidal drugs. *Eur. J. Biochem.* 240, 592-599.
- 24.- Wéry, M. (1994) Drugs used in the treatment of sleeping sickness (human African trypanosomiasis: HAT). *Int. J. Antimicrob. Agents* 4, 227-238.

- 25.- Eissenthal, R. and Conish-Bowden, A. (1998) Prospects for antiparasitic drugs. The case of *Trypanosoma brucei*, the causative agent of african sleeping sickness. J. Biol. Chem. 273. 5500-5505.
- 26.- Knowles, J.R. (1991) Enzyme catalysis : not different, just better. Nature 350, 121-214.
- 27.- Kohlhoff, M., Dahm, A. and Hensel, R. (1996) Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic archaea. FEBS lett. 383, 245-250.
- 28.- Wierenga, R.K., Noble, M.E.M. and Davenport, R.C. (1992) Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. J. Mol. Biol. 224,1115-1126.
- 29.- Putman, S.J., Coulson, A.F.W., Farley, I.R.T. Riddleston, B. and Knowles, J.R. (1972) Specificity and kinetics of triosephosphate isomerase from chicken muscle. Biochem. J. 129, 301-310.
- 30.- Mainfroid, V., Terpstra, P., Beaugard, M., Frère, J-M., Mande, S.C., Hol, W.G.J., Martial, J.A. and Goraj, K. (1996) Tree hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. J. Mol. Biol. 257, 441-456.
- 31.- Schliebs, W. Thanki, N. Eritja, R. and Wierenga, R.K. (1996) Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (mono TIM) as deduced from mutational and structural studies. Protein Sci. 5, 229-239.
- 32.- Farber, G. K. And Petsko, G.A. (1990) The evolution of α/β barrel enzymes. Trends. Biochem. Sci. 15, 228-234.
- 33.- Noble, M.E.M., Zeelen, J.P., Wierenga, R.K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A.C. and Martial, J.A. (1993) Structure of the triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. Acta Crystallogr. D49, 403-417.
- 34.- Delboni, L.F., Mande, S.C., Rentier- Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S. Vellieux, F.M.D., Martial, J.A. and Hol, W.G.J. (1995) Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. Protein Sci. 4, 2594- 2604.
- 35.- Alvarez, M., Zeelen, J.P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Wyns, L., Wierenga, R.K. and Maes, D. (1998) Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. J.Mol.Chem. 273, 2199-2206.

- 36.- Velanker, S.S., Ray, S.S., Gokhale, R.S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P. and Murthy, M. R. N. (1997) Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum* : the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* 5, 751-761.
- 37.-Wierenga, R.K., Noble, M.E.M., Vriend, G., Nauche, S. and Hol, W.G.J. (1991) Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 m-ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J. Mol. Biol.* 220, 995-1015.
- 38.-Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Pérez- Montfort, R. (1998) Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* 283, 193-203.
- 39.- Williams, J.C., Zeelen, J.P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P.A.M., Lambeir, A-M., Wierenga, R.K. (1999) Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* 12, 243-250.
- 40.- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C. and Petsko, G. A. (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution . *Biochemistry* 29, 6609-6618.
- 41.- Zhang, Z., Sugio, S., Komives, E.A., Liu, K.D., Knowles, J.R., Petsko, G.A. and Ringe, D. (1994) Crystal structure of recombinant chicken triosephosphate isomerase phosphoglycohydroxamate complex at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* 33, 2830-37.
- 42.- Mande, S.C., Mainfroid, V., Kalk, K.H., Goraj, K., Martial, J.A. and Hol, W.J. (1994) Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Sci.* 3, 810-821.
- 43.- Verlinde, C. L. M. J., Witmans, C. J., Pijning, T., Kalk, K. H., Hol, W. G. J., Callens, M. And Opperdoes, F.R. (1992) Structure of the complex between trypanosomal triosephosphate isomerase and n-hydroxy-4-phosphono-butamide: binding at the active site despite an "open" flexible loop conformation. *Protein Sci.* 1, 1578-1584.

- 44.-Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A. And Ringe, D. (1991). Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolhydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry* 30, 5821-5826.
- 45.-Noble et al, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A. C. And Martial, J. A. (1993). Structure of "open" and "closed" state of trypanosomal triosephosphate isomerase, as observed in a new crystal form: implications for the reaction mechanism. *Proteins* 16, 311-326.
- 46.- Waley, S. G. (1973) Refolding of triosephosphate isomerase. *Biochem. J.* 135, 165-172.
- 47.- Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Rojo-Dominguez, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1996) Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* 241, 114-120.
- 48.- Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R., and Gómez-Puyou, A. (1998) Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity. Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem.* 253, 684-691.
- 49.- Pérez- Montfort, R., Garza-Ramos, G., Hernández Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Xiu-gong G, Maldonado, E., Tuena de Gómez Puyou M. and Gómez Puyou A. (1999) Derivatization of the Interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry* 38, 4114-4120.
- 50.- Swinkels, B.W., Gibson, W.C., Osinga, K.A., Kramer, R., Veeneman, G.H., van Boom, J.H. and Borst, P. (1986) Characterisation of the gene for the microbody (glycosomal) triosephosphate isomerase of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 5, 1291-1298.
- 51.- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
- 52.- Borchert, T.V., Pratt, K., Zeelen, J., Callens, M., Noble, M.E.M., Opperdoes, F.R., Michels, P. A. M. and Wierenga, R.K. (1993) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur. J. Biochem.* 211, 703-710.

- 53.- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermason, G. T., Mallian, A. K., Gartner, F. H., Provezano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- 54.- Burks, E. A., Chen, G., Georgiou, G. and Inverson, B. L. (1997) In vitro scanning saturation mutagenesis of an antibody binding pocket. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 412-417.
- 55.- Fontaine, V., Savino, R., Arcone, R., De Wit, L., Brakenhoff, J. P. J., Content, J. and Ciliberto, G. (1993) Involvement of the Arg179 in the active site of human IL-6. *Eur. J. Biochem.* 211, 749-755.
- 56.- Lo, T. P., Murphy, M. E. P., Guillemette, J. G., Smith, M. and Brayer, G.D. (1995) Replacements in a conserved leucine cluster in the hydrophobic heme pocket of cytochrome C. *Protein Sci.* 4, 198-208.
- 57.- White, P. J., Squirrell, D. J., Arnaud, P., Lowe, C. R. and Murray, A. H. (1996) Improved thermostability of the North American firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354. *Biochem. J.* 319, 343-350.
- 58.- Mclvor, R. S. (1996). Drug-resistant dihydrofolate reductases: generation, expression and therapeutic application. *Bone Marrow Transplant.* 18, suppl 3.50-54.
- 59.- Mahdavian, E., Spencer, H. T. and Dunlap, R. B. (1999) Kinetic studies on drug-resistant variants of *Escherichia coli* thymidylate synthase: functional effects of amino acid substitutions at residue 4. *Arch. Biochem. Biophys.* 368, 257-264.
- 60.- Tong, Y., Liu-Chen, X., Ercikan-Abali, E. A., Zhao, S., Banerjee, D., Maley, F. and Bertino, J.R. (1998) Probing the folate-binding site of human thymidylate synthase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 31209-31214.