



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**INTERACCIONES DE LAS TIMIDILATO SINTASAS DEL
CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* Y DEL Virus del
Síndrome de la Mancha Blanca CON SU mRNA COMO
POSIBLE MECANISMO DE REGULACIÓN**

Por:

Jesús Salvador Carrasco Miranda

TESIS APROBADA POR LA:
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍAS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2010

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité asignados para revisar la tesis de Jesús Salvador Carrasco Miranda, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

Nombre y grado del sinodal

Director de Tesis

Nombre y grado del sinodal

Asesor

Nombre y grado del sinodal

Asesor

Nombre y grado del sinodal

Asesor

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del proyecto 48991-Z “ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN POR ANTIFOLATOS DE LA TIMIDILATO SINTETASA DEL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA DEL CAMARÓN” y de una beca para estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por el apoyo financiero para la realización de este estudio, a través del proyecto 48991-Z, así como por la beca de maestría otorgada.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo por todas las facilidades otorgadas durante mis estudios de maestría.

Agradezco al Dr. Rogerio Sotelo por todo su apoyo en la dirección de esta tesis, por sus consejos que han sido de gran ayuda en mi formación profesional y personal, por su confianza y su valiosa amistad.

Agradezco a cada uno de los miembros de mi comité de tesis, Dra. Gloria Yepiz Plascencia, Dra. María Islas Osuna y al Dr. Aldo Arvizu Flores (UNISON) por su disponibilidad, interés y sus acertadas aportaciones a mi tesis.

Agradezco el apoyo académico de la M. en C. Karina García por sus enseñanzas y consejos en el trabajo de laboratorio. También a la M. en C. Alma Peregrino por su disponibilidad para ayudarme siempre que la necesité y por su confianza.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de biología molecular que siempre estuvieron dispuestos a ayudar y de los cuales aprendí mucho, Enrique, Idania, José, Antonio, Bertha, Carlitos, Manuel, Max, Oliviert, Emanuel y a todos aquellos que ya salieron.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos de la maestría, que estuvieron conmigo en las buenas y en las malas, siempre apoyándome.

Y agradezco a todos aquellos que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios, que me ha dado todo.

A mi familia, por su apoyo incondicional.

A mi prometida Ma. Jesús Castro H. por todo su amor y comprensión.

CONTENIDO

	Página
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	2
APROBACIÓN	3
AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	6
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ANTECEDENTES	13
Enzimas Timidilato Sintetas.....	13
Función y Mecanismo de Acción de la TS.....	13
Estructura.....	15
Inhibición de la TS.....	16
Mecanismos de Regulación de Timidilato Sintetas.....	19
Regulación Transcripcional.....	19
Regulación Postranscripcional.....	20
Regulación Traduccional.....	20
El IRE (<i>iron responsive element</i>) como un Ejemplo de la Regulación de la Expresión.....	21
La interacción de la TS con su mRNA.....	21
Ensayos Para Detectar la Unión Proteína-RNA.....	23
Análisis de Retraso en Gel o Retardo Electroforético (EMSA)	23
Entrecruzamiento con Luz Ultravioleta.....	24
III. HIPÓTESIS	26

CONTENIDO (continuación)

	Página
IV. OBJETIVOS	27
Objetivo General.....	27
Objetivos Particulares.....	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS	28
Construcción de Plásmidos.....	28
Síntesis <i>in vitro</i> de mRNA.....	30
Purificación de la Enzima Timidilato Sintasa Recombinante.....	30
Ensayo de Movilidad Retardada en Gel (EMSA).....	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
Sobreexpresión y Purificación de Enzima Timidilato Sintasa Recombinante.....	34
Síntesis <i>in vitro</i> de mRNA.....	34
Ensayo de Movilidad Retardada en Gel (EMSA).....	35
VII. CONCLUSIONES	46
VIII. BIBLIOGRAFÍA	48

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación de la autoregulación de la TS en la traducción.....	23
Figura 2. Esquema de un EMSA mostrando una interacción mRNA-proteína.....	34
Figura 3. Gen de la TS viral y los mRNAs sintetizados <i>in vitro</i>	36
Figura 4. EMSA del mRNA correspondiente al gen completo de TS de 900 bases.....	38
Figura 5. Electroforesis de los mRNAs de 200 bases de la región 5' UTR del mensajero.....	39
Figura 6. Estructura secundaria del mRNA de la TS de <i>L. vannamei</i>	40
Figura 7. Estructura secundaria del mRNA de la TS del WSSV.....	41
Figura 8. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de tres TSs.....	42
Figura 9. Electroforesis de los mRNAs de ~200 bases ubicados en la región central del mRNA de la TS.....	43
Figura 10. Especificidad de la interacción mRNA-proteína.....	44
Figura 11. Especificidad de la interacción mRNA-proteína utilizando mRNA de lactato deshidrogenasa de camarón.....	45
Figura 12. Interacciones cruzadas entre mRNA y proteína TS del virus y del camarón.....	46

RESUMEN

La timidilato sintasa (TS) es una enzima clave para la síntesis *de novo* de timidina monofosfato, uno de los nucleótidos esenciales para la replicación del DNA. Debido a su importancia, ha sido objetivo de fármacos dirigidos a inhibirla selectivamente. Recientemente se demostró una regulación en la traducción de la TS por unión de la enzima a su propio mRNA. Este mecanismo de regulación ha sido descrito en la bacteria *Escherichia coli*, humanos y recientemente en embriones del pez cebra. El Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) constituye un problema de sanidad acuícola global que afecta la acuicultura de camarón *Litopenaeus vannamei*. Bajo la premisa que el conocimiento de los procesos regulatorios básicos de la expresión de genes y proteínas del WSSV permitirán encontrar estrategias para controlar este virus, el objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de este mismo mecanismo de regulación en la TS viral y de camarón. Mediante la técnica de ensayo de movilidad retardada en gel (EMSA) se demostró claramente la unión de la TS de camarón con un fragmento de 200 bases situado hacia la región 5' no traducida (5' UTR) de su propio mRNA, así como con un fragmento de la región central del mismo mensajero, sugiriendo este mecanismo de regulación. En contraste con lo observado en camarón, las mismas regiones en el mensajero de TS del virus presentan una unión muy débil, lo cual puede indicar que el virus esté regulado en la traducción de manera menos estricta que en su hospedero. Ya que se encontró evidencia de interacciones cruzadas entre las moléculas del virus y de su hospedero, es posible que exista regulación mutua en la traducción pero que finalmente se favoreciera más al patógeno.

I. INTRODUCCIÓN

La timidilato sintasa (TS) es una enzima muy importante para la replicación del DNA, lo que la hace un blanco importante de fármacos contra enfermedades proliferativas. Esta enzima participa en la síntesis *de novo* de desoxitimidina monofostato, uno de los nucleótidos requeridos para la síntesis de DNA. Se encuentra en la mayoría de los organismos vivos desde mamíferos hasta bacterias y algunos virus de gran interés. Solo se conocen pocos organismos que no tienen TS como *Giardia lamblia* que dependen del rescate de nucleótidos para la replicación de su DNA (Jarroll *et al.*, 1989). La función y estructura de dímero de la TS son muy conservadas dentro y entre las especies.

Uno de los virus de interés mundial en el ámbito de acuacultura en los que se ha encontrado la expresión de la enzima TS es el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (*White Spot Syndrome Virus* en inglés, WSSV) (Li *et al.*, 2004). Este virus se considera el patógeno más importante en la acuacultura de camarón y otros crustáceos, ya que ha afectado de manera dramática esta actividad en varios países desde 1992. La infección por WSSV en México fue reportada por primera vez en 1999 en cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Esta enfermedad es letal de los 3 a los 10 días a partir de los primeros signos de la infección. Hasta hoy sigue causando grandes pérdidas económicas y los trabajos sobre TS de este virus son escasos (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008; Bustillo-Ruiz *et al.*, 2009).

La TS del WSSV se identificó por análisis bioinformático de su genoma, existe un reporte sobre su caracterización bioquímica (Li *et al.*, 2004) y más recientemente un estudio bioquímico comparativo con la TS del huésped, el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Arvizu-Flores *et al.*, 2009).

Con ello se ha abierto la oportunidad de estudiar la TS de este virus más a fondo en búsqueda de entender su mecanismo de regulación y así sentar las bases para encontrar una inhibición selectiva que impida la replicación del virus.

II. ANTECEDENTES

Enzimas Timidilato Sintetas

Función y Mecanismo de Acción de la TS

La enzima timidilato sintasa (E.C. 2.1.1.45) es esencial en la síntesis de DNA. Su función es catalizar la metilación reductiva de desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxitimidina monofosfato (dTMP). El cofactor 5,10-metilen-tetrahidrofolato (MTHF) participa en esta reacción como donador del carbón y reductor. Por su función, es una enzima que se ha encontrado en la gran mayoría de los seres vivos donde se ha investigado (Carreras y Santi, 1995), desde bacterias, bacteriófagos, virus hasta humanos.

La TS es una de las enzimas más conservadas filogenéticamente en la naturaleza, lo que denota su gran importancia evolutiva (Stern *et al.*, 2010). Hasta el momento se conoce la secuencia de aminoácidos de cientos de enzimas TS de diferentes organismos incluyendo bacterias, hongos, protozoarios, mamíferos, plantas, invertebrados y virus; donde dentro de las especies y entre las mismas hay una gran similitud. La estructura y mecanismo de acción de la TS son bien conocidos (Carreras y Santi, 1995).

El mecanismo catalítico de la timidilato sintasa es secuencial ordenado y se ha demostrado por estudios cinéticos de la TS en *E. coli* que uno de los sitios activos es activo a la vez (Spencer *et al.*, 1997). La enzima se une primero con el dUMP para después formar un complejo ternario con el cofactor y así llevar a cabo la catálisis. La expresión del mecanismo es $TS + dUMP \rightarrow TS.dUMP + (6R)\text{-}5,10\text{-CH}_2\text{-H}_4\text{folato} \rightarrow TS.dUMP.(6R)\text{-}5,10\text{-CH}_2\text{H}_4\text{folato} \rightarrow TS.dTMP.H_2\text{folato}$

→TS.dTMP → TS (Carreras y Santi, 1995; Spencer *et al.*, 1997). Este mecanismo es consistente en la mayoría de las TS encontradas, más no en todas necesariamente, por lo que es importante realizar el estudio cinético detallado para cada enzima.

Existen otras formas de TS en las que varía un poco su mecanismo de acción. ThyA corresponde a la TS clásica que utiliza MTHF como cofactor donador de un carbón y agente reductor (Carreras y Santi, 1995). La ThyX utiliza FADH₂ como segundo cofactor para reducir el metileno donado por el primer cofactor, el MTHF. La ThyX es menos frecuente y se ha encontrado esporádicamente en microorganismos que generalmente carecen de ThyA. La diferencia principal es que la ThyX depende de flavo-adenin nucleótido reducido (FADH₂) para su actividad (Myllykallio *et al.*, 2002; Agrawal *et al.*, 2004). Una tercera forma diferente de TS existe en protozoarios como *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* y *Leishmania major* donde se encuentra un dímero de la TS fusionado con una región que ejerce la función de dihidrofolato reductasa (DHFR) en la misma cadena polipeptídica (DHFR-TS) (Trujillo *et al.*, 1996; Liang y Anderson, 1998). En este trabajo se hace referencia sólo a la ThyA, mencionada como TS, ya que es la más estudiada, la más común y la que se encuentra en las especies de camarón y virus de interés.

Los estudios biofísicos de la TS en diferentes especies aportaron datos más precisos sobre la estructura y detalles del mecanismo de acción. Existe una reorientación del dominio que contiene el carboxilo terminal de la enzima al formar el complejo ternario: enzima-sustrato-cofactor. De esta manera quedan sellados los sustratos dentro del sitio activo, excluyendo el agua de la reacción (Montfort *et al.*, 1990; Carreras *et al.*, 1994; Stroud y Finer-Moore 2003). Este cambio conformacional de la enzima que ha sido confirmado biofísica y cristalográficamente, permite la actividad de una subunidad a la vez, y que al unirse la primera subunidad a los sustratos de manera covalente, se impide que

la segunda subunidad se una al cofactor por la incapacidad de formar enlaces covalentes en ese momento (Anderson *et al.*, 1999).

Estructura

Los resultados obtenidos a partir de los estudios cristalográficos (Hardy *et al.*, 1987; Stroud y Finer-Moore 2003) concuerdan con los análisis biofísicos realizados utilizando difracción de rayos X donde se observó que la estructura secundaria de TS de *Lactobacillus casei* contiene 33% de hélices alfa, 25% de hojas beta, 20% de lazos y 16% de otras estructuras desordenadas. Los lazos juegan un papel importante confiriendo flexibilidad a la molécula (Stroud y Finer-Moore 2003).

La conservación del plegamiento permite que las TSs de la familia ThyA siempre se encuentren formando homodímeros de aproximadamente 35 kDa cada uno. Esta enzima es un dímero obligado ya que los residuos de un monómero forman parte del sitio activo del otro monómero (Hardy *et al.*, 1987; Carreras y Santi 1995). Las comparaciones estructurales de TS demuestran que existen regiones específicas de la enzima que son muy conservadas a nivel de secuencia y estructura. El sitio catalítico, sitio de unión al sustrato, sitio de unión al cofactor y la región transportadora de protones, son invariantes a través de las especies (Stroud y Finer-Moore 2003). También se han investigado los aminoácidos específicos del sitio de unión al sustrato en TS de humano (Phan *et al.*, 2001).

La timidilato sintasa de humano (hTS) tiene residuos muy conservados en su sitio activo. Los aminoácidos Ile 108, Leu 221 y Phe 225 no varían debido a que sus estructuras son indispensables para la función que desempeñan y juegan un papel muy importante en la unión de la enzima con su cofactor por su alta flexibilidad en sus cadenas laterales (Phan *et al.*, 2001). En el 2001, Phan y colaboradores publicaron la TS de humano cristalizada en unión con sus sustratos, donde existe una conformación cerrada en la unión con el sustrato

similar a lo observado en la TS de *E. coli*. En contraste con lo encontrado en la TS de humano, la TS cristalizada de rata no muestra una conformación cerrada al unirse con el sustrato y un antifolato (Sotelo-Mundo *et al.*, 1999).

En la TS cristalizada aislada de rata se observó por primera vez la unión de la enzima con sus sustratos en una enzima proveniente de mamíferos. La estructura presenta un cambio conformacional inducido por el ligando, similar al cambio observado en la TS de *E. coli*, con la diferencia de que no se indujo una conformación completamente cerrada. Esto puede ser atribuido a que algunos ligandos análogos del cofactor utilizados en la cristalización, se unen mejor que otros. El ligando CB3717 unido a la TS de rata cristaliza de manera diferente al Tomudex (raltritrexed) reportado en el análisis publicado y se une mejor en el sitio activo en una conformación cerrada. También pueden explicarse las diferencias encontradas por características puntuales de las TS de cada especie (Sotelo-Mundo *et al.*, 1999).

Las diferencias entre las TS se han descrito en zonas que no participan directamente en la función. Se pueden encontrar algunas regiones periféricas de aminoácidos muy variables en las enzimas. Las más notorias son dos lazos en la superficie, que en eucariotas contienen secuencias insertadas cuyas funciones aun no están bien definidas. Estas zonas variables específicas para cada especie podrían utilizarse como blanco de fármacos si se demuestra que son esenciales en la función (Munro *et al.*, 1998).

Inhibición de la TS

Las diferencias estructurales en las TS se convierten en potenciales puntos de inhibición selectiva de fármacos en su propósito de inhibir organismos o en procesos proliferativos cancerosos, que ponen en riesgo la salud. La TS es un objetivo atractivo para el diseño de fármacos antiproliferativos, esto se debe al papel que desempeña en la síntesis de DNA. La inhibición de la TS detiene la producción de DNA, interrumpe el progreso del ciclo celular y finalmente guía a

una muerte celular por falta de timidina. Ciertos análogos de folatos se pueden usar para distinguir entre la TS del hospedero y la del organismo infectante sea virus, bacterias u hongos. Sin embargo, no se ha aprobado un fármaco suficientemente específico para combatir una infección sin afectar al hospedero (Santi *et al.*, 1993; Stout y Stroud 1996).

En la constante investigación de la TS y la búsqueda de fármacos eficaces para su inhibición, es necesario un método rápido y eficiente para la obtención de esta enzima. Algunos procedimientos para la obtención de TS recombinante utilizan *E. coli* como microorganismo para su expresión. Esto se realiza a través de transformación bacteriana con plásmidos acarreadores del gen de la TS del organismo de estudio (Changchien *et al.*, 2000). Se han logrado obtener TS recombinantes de varios organismos tanto eucariontes como procariontes. En el 2004, West y colaboradores presentaron una posibilidad de inhibir la TS en células de manera alternativa a la inhibición por análogos de sustratos. Los autores utilizaron una mutante de TS que al expresarla en *E. coli* lograron que la TS nativa formara heterodímeros no funcionales. Esto sugiere una inhibición prometedora. Un buen atractivo en la búsqueda de inhibidores de esta enzima es que pueden funcionar incluso para combatir patógenos virales que codifican su propia TS (West *et al.*, 2004).

No todos los patógenos virales codifican su propia TS. La mayoría de los virus utilizan la enzima y los nucleótidos del hospedero. Sin embargo, existen algunos virus con genoma circular de DNA de doble cadena que tienen su propia TS, lo cual es intrigante ya que no se han establecido diferencias significativas entre las TSs virales y las del hospedero. Algunas TSs de patógenos virales en investigación son el herpes virus 8, varicela zoster virus en cuestiones de salud y el WSSV relacionado a problemas de acuicultura de camarón y otros crustáceos (Li *et al.*, 2004; Arvizu-Flores *et al.*, 2009).

Características de TS del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca

El WSSV es uno de los virus que tienen en su genoma la información necesaria para codificar su propia enzima TS, es decir, el gen de la TS. En su genoma hay un marco de lectura abierto (WSV067) que codifica para la TS. Cuando el gen de la TS se insertó en un plásmido que fue transformado en células de *E. coli*, se expresó un polipéptido de 289 aminoácidos que tiene una similitud de 50.2 – 64.2 % a secuencias conocidas para TS de organismos eucariontes y una similitud de 33.9 – 49.2% a TSs de procariontes. De esta manera, se asumió que la WSSV-TS es filogenéticamente mas parecida a las TS de células eucariotas que procariotas (Li *et al.*, 2004).

La expresión de la TS del WSSV en *E. coli* permitió una buena producción de la enzima recombinante pura y (Changchien, 2000). Se expresó la proteína fusionada con una cola de histidina en el amino terminal para una fácil purificación por cromatografía de afinidad. Este procedimiento fue necesario para los estudios realizados y sentó la guía para la producción eficiente de la enzima de este virus, utilizable en posteriores investigaciones (Li *et al.*, 2004). También ha sido expresada sin la etiqueta de histidinas por cromatografía de intercambio iónico y confirmada su identidad por espectrometría de masas (Arvizu-Flores *et al.*, 2009).

La publicación de Li y colaboradores en el 2004 fue un gran aporte en la identificación y filogenia de la TS del WSSV como estudios iniciales; sin embargo, queda bastante por conocer. Recientemente se publicó un trabajo sobre la TS de su hospedero, el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Arvizu-Flores *et al.*, 2009). En los últimos años se ha estado trabajando para conocer más sobre su estructura y su cinética, las cuales no difieren mucho entre el patógeno y el hospedero. Estos trabajos se han estado desarrollando en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Hermosillo, Sonora, México. La regulación de la TS en el virus como en el hospedero es un tema que no se ha abordado y que puede proporcionar información que

contribuya a esclarecer dudas como la necesidad del virus de expresar su propia TS. Así mismo podría sentar las bases para nuevas ideas en la lucha contra el WSSV. En otras especies, se han estudiado los mecanismos de regulación de TS desde el nivel de transcripción hasta el nivel de traducción.

Mecanismos de Regulación de Timidilato Sintetas

Regulación Transcripcional

La regulación en la transcripción es un tema muy estudiado en un gran número de sistemas biológicos y la TS no es la excepción. Muchas proteínas tienen la capacidad de ser reguladas positiva o negativamente a través de segmentos de DNA denominados promotores y operadores. Las proteínas reguladoras (factores de transcripción), tienen afinidad por esos segmentos de DNA y al unirse regulan la actividad de la RNA polimerasa (Alberts B. *et al.*, 2002)

En el caso de la TS existe una región corriente arriba del promotor de este gen que se presume es responsable del aumento de la transcripción cuando el metabolismo lo requiere. Esto lo hace de alguna manera favoreciendo la eficiencia en la síntesis del mRNA (Johnson, 1994). Posteriormente en hTS se ha identificado el promotor del SP1 y otras regiones como los sitios de regulación transcripcional (Horie y Takeishi, 1997).

La regulación por transcripción no es la única forma en que la expresión de la TS se puede modular. La velocidad de transcripción del gen de la TS no tiene correspondencia con el alto número de copias de TS mRNA encontrado, por tanto se esperaría que el mensaje tenga una alta estabilidad. Bajo un estímulo para que la célula produzca una mayor cantidad de TS, la regulación en la transcripción no es la forma más eficiente para adaptarse al cambio rápido en la necesidad de la enzima. Por ello se sugiere una regulación postranscripcional (Jenh *et al.*, 1985).

Regulación Postranscripcional

Los estudios sobre mRNA de TSs sugieren que una manera de regular su expresión es en la etapa postranscripcional, lo cual se lleva a cabo almacenando los mRNA citoplásmicos que van a ser traducidos por el ribosoma. Los TS mRNA, tras su producción, podrían ser “almacenados” en polisomas o en cuerpos P (*P-bodies*) de donde salen en grandes cantidades cuando el metabolismo así lo requiere (Jenh *et al.*, 1985; Newbury 2006). De esta forma hay una respuesta rápida de la célula al requerir un aumento drástico en la cantidad de enzima disponible. Debido a que cuando se estimula un aumento en la producción de la enzima TS se detecta también un aumento en las moléculas de TS mRNA, por mucho tiempo se descartó la posibilidad de que la TS estuviera regulada traduccionalmente. Sin embargo, los estudios de estabilidad y almacenamiento de mRNA en los cuerpos P sugieren más de un nivel de regulación para la expresión de la TS.

Regulación Traduccional

Existen varias formas de control en la traducción, siendo la unión de proteínas al mRNA una de las más reportadas para la regulación de la TS. La mayoría de los mRNAs de las TSs de diferentes especies pueden formar estructuras secundarias en la región 5' UTR, así como 3' UTR. Esto sugiere una forma de regulación por unión de proteína-mRNA (Alberts *et al.*, 2002). La regulación negativa de la expresión de proteínas por el mecanismo de unión proteína-mRNA, fue reportado inicialmente en células procariotas. En *E. coli* las proteínas ribosomales se unen a su propio mRNA cuando hay un exceso de las mismas, impidiendo su traducción. Este mecanismo no se había observado en células eucariotas hasta el descubrimiento del Elemento de Respuesta a Hierro (IRE, por sus siglas en inglés) (Alberts B. *et al.*, 2002).

El IRE (*iron responsive element*) como un Ejemplo de la Regulación de la Expresión

La respuesta rápida en la síntesis de la proteína intracelular que almacena hierro (ferritina) está regulada por un control en la traducción donde interactúan proteína-mRNA. Ante la presencia de hierro soluble en citoplasma, se observó que los niveles en la producción de ferritina aumentaban considerablemente, pero no así los niveles de mRNA (Casey, L. 1988). En estudios donde se removieron las regiones 5' UTR de los mRNAs, se llegó a la conclusión de que esa región es necesaria y suficiente para regular la expresión de la ferritina. Esto se logra por la unión de la proteína a la porción 5' UTR del mRNA impidiendo su propia traducción. A esta región del mRNA se le denominó IRE ó elemento de respuesta al hierro (Casey L., 1988).

El tamaño del IRE es de aproximadamente 30 nucleótidos del mRNA de la ferritina y puede formar una estructura secundaria de tallo y horquilla por complementariedad de bases. El apareamiento de las bases en el tallo es necesario para que la ferritina se una a la horquilla y de esta manera impedir la traducción de su propio mRNA. La mas alta afinidad de la proteína por su ligando (el hierro), que por el IRE hace que al aumentar la cantidad de hierro el mRNA sea liberado y la síntesis de ferritina aumenta hasta 100 veces (Alberts B. *et al.*, 2002).

La interacción de la TS con su mRNA

La mayoría de las publicaciones sobre interacción de TS con su propio mRNA son trabajos realizados con TS de humano como modelo de estudio de organismos eucariontes. La timidilato sintasa de humano (hTS) se une a una región de su propio mRNA similar al IRE, impidiendo su traducción a manera de auto regulación (Chu *et al.*, 1991). La enzima se une específicamente en una región que corresponde a los primeros 188 nucleótidos del mRNA de la TS. La

afinidad por el segmento que abarca del nucleótido 75 al 110, el cual incluye el inicio de la traducción, es igual a la afinidad por el fragmento completo de esos 188 nucleótidos. Una segunda región del mRNA a la cual se une la TS de humano comprende de la posición 434 a la 634. De las dos regiones, la que contiene los nucleótidos de inicio es la principal responsable de la regulación ya que es donde interactúan con mayor afinidad los aminoácidos responsables de la unión a su propio mRNA (Chu *et al.*, 1993). En la TS de humano el residuo no catalítico Cys 180 es esencial para el proceso de unión ya que su mutación resulta en una alteración de la traducción (Lin *et al.*, 2003).

De manera similar a la TS de humano, este proceso regulatorio también ocurre entre la TS y el mRNA de *E. coli*. Los ensayos de movilidad en gel confirman que en *E. coli* existe dicha unión también en dos sitios del mRNA, uno contiene la región correspondiente a los nucleótidos 207-460 y el otro a la 461-807. Ambos sitios tienen una afinidad similar a la ejercida por la secuencia completa del mRNA de la TS (Voeller *et al.*, 1995). Los dominios en la interface homodimérica de la enzima TS de *E. coli*, al igual que lo observado para la TS de humano son responsables de la unión de la enzima con su mRNA. Se han identificado al menos 4 dominios de unión a su mRNA en la TS de *E. coli* y 5 dominios en la TS de humano, encontrándose que tres dominios son similares entre las dos enzimas (Voeller *et al.*, 2002).

Recientemente se publicó un estudio sobre la regulación de TS en embriones del pez cebra. En dicho trabajo, un ensayo de retardo electroforético muestra la unión de la enzima a su propio mensajero hacia la región 5' UTR, siendo específicamente 20 ribonucleótidos con los que interactúa la proteína. La función de la unión como forma de regulación en el proceso de traducción se confirmó por ensayos de traducción *in vitro*. Estudios bioinformáticos que realizaron, predicen una estructura secundaria en forma de lazo del segmento específico responsable de la unión. Dicha estructura presenta similitud con la observada en el mRNA de la TS humano, tanto en la forma como número de ribonucleótidos que conforman el lazo. También se reportó que las mutaciones

que modifiquen la estructura secundaria del mRNA impiden la unión con la proteína (Zhang *et al.*, 2010).

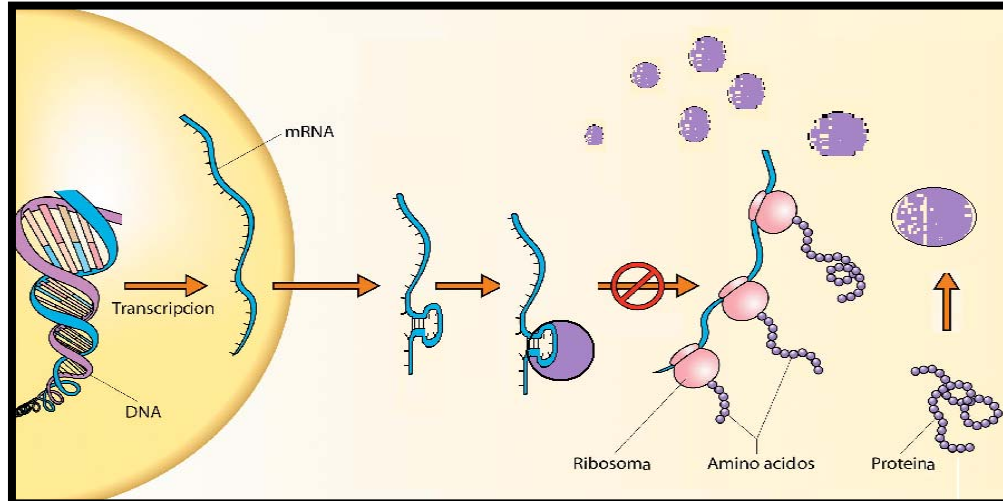


Figura 1. Representación de la autoregulación de la TS en la traducción. Cuando hay un exceso de proteína, ésta se une a su mRNA en una estructura secundaria en forma de lazo, lo cual impide que se ensamble el ribosoma y se traduzca el mensaje para sintetizar más proteína (Modificado de “*sense molecular biology*” en wikipedia.com”).

Ensayos Para Detectar la Unión Proteína-RNA

Existen varios métodos para comprobar si una proteína se une a una molécula de RNA. Algunos de los métodos son rápidos pero poco específicos, otros son más laboriosos y costosos pero aportan mucha información sobre la interacción. Dependiendo de los resultados preliminares del trabajo, se predice un resultado y se preparan las técnicas que sean muy probables a utilizar

Análisis de Retraso en Gel o Retardo Electroforético (EMSA)

El análisis de retraso en gel se basa en la diferencia de la migración de un fragmento de RNA en un gel de poliacrilamida. Una molécula de mRNA migrará una menor distancia si está unida a una proteína. Comúnmente el RNA es marcado radioactivamente y se hace migrar del polo negativo al polo positivo

movido por un flujo de corriente eléctrica. El ensayo se realiza en condiciones no desnaturizantes ya que la pérdida de la estructura nativa de la enzima puede reducir o anular la interacción proteína-RNA. La velocidad de migración depende del tamaño de la molécula, al unirse la proteína al RNA el tamaño del complejo hará que éste migre más lento. Los resultados se detectan en una película de rayos X que revelan el cambio en movilidad del mRNA marcado radioactivamente (Alberts B. *et al.*, 2002).

Esta técnica no aporta datos específicos sobre los sitios de unión RNA-proteína. No se puede conocer a través de ésta la secuencia específica de aminoácidos y ribonucleótidos que participan. Sin embargo, puede determinarse la afinidad de la proteína por el RNA si se conocen las concentraciones iniciales. Es una técnica sencilla, rápida y útil cuando lo que se pretende es solo demostrar la interacción de las moléculas para después realizar análisis más profundos (Garner y Revzin, 1981).

El ensayo de retraso en gel fue utilizado para demostrar la unión de proteína-mRNA para TS de humano (Chu *et al.*, 1991) y TS de *E. coli* (Voeller *et al.*, 1995). Se detectó la unión de la proteína con su propio mRNA después de pequeñas modificaciones al protocolo. En dichos experimentos utilizaron RNAsa T1, una enzima nucleasa que corta en sitios específicos en la secuencia de RNA que no está protegida por la unión de una proteína.

Entrecruzamiento con Luz Ultravioleta

Esta es una técnica estándar para la detección de uniones proteína-DNA o proteína-RNA. Es una técnica de EMSA que incluye la inducción de la formación de enlaces covalentes entre una proteína y una molécula de DNA o RNA al ser irradiados con luz ultravioleta cuando están interactuando. Después del entrecruzamiento, el complejo proteína-RNA es digerido por una enzima RNAsa. Esto produce una proteína asociada a un oligo ribonucleótido. Se utiliza RNA radio-marcado con ^{32}P para visualizar el complejo formado, generalmente

el nucleótido uridín trifosfato UTP es marcado (^{32}P -UTP) e incorporado a la molécula de RNA. Esto hace que se visualice el complejo en una radiografía. Algunas veces el mRNA es pobre en contenido del nucleótido marcado (^{32}P -UTP), lo que dificulta la visualización. El marcar todos los nucleótidos con ^{32}P es una ventaja al momento de visualizarlo porque la señal es más fuerte. Una vez visualizado el complejo pueden conocerse datos específicos de la unión (Hartley *et al.*, 2002).

La principal ventaja del entrecruzamiento con luz ultravioleta es que permite saber de manera específica los sitios de contacto durante la unión o interacción. Al obtener el sitio protegido por la enzima se pueden determinar los nucleótidos específicos para la interacción con la proteína. Además, se puede estimar la afinidad de la proteína por la molécula de RNA variando la concentración de proteína hasta conocer la mínima cantidad necesaria para la unión con la molécula de RNA (Brenowitz *et al.*, 1986).

La técnica de entrecruzamiento con luz ultravioleta fue utilizada en las investigaciones sobre los mecanismos de regulación en la traducción por unión proteína-mRNA en las enzimas TS de humano y *E. coli*. En el ensayo incorporaron el nucleótido ^{32}P UTP a la molécula de mRNA y fue suficiente para visualizar el complejo (Chu *et al.*, 1991; Voeller *et al.*, 1995).

III. HIPÓTESIS

El mRNA de la timidilato sintasa del WSSV así como el del camarón *Litopenaeus vannamei* forman interacciones específicas con su respectiva enzima timidilato sintasa. La interacción proteína-mRNA es un posible mecanismo de regulación en la traducción de la enzima.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Detectar la interacción específica entre la TS y su propio mRNA en el WSSV, al igual que en su hospedero el camarón *L. vannamei*

Objetivos Particulares

- Sobreexpresar y purificar la enzima timidilato sintasa recombinante de camarón *L. vannamei* y del WSSV a partir de su sobreexpresión en *E. coli*.
- Sintetizar *in vitro* el mRNA de la TS del WSSV y del camarón.
- Comprobar la existencia de una interacción específica entre la TS y su respectivo mRNA mediante un ensayo de retardo electroforético.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de Plásmidos

Para obtener los genes completos de las TSs, se diseñaron los iniciadores: VTSFWt (sentido) 5'-GACATCATTAACCATCATCAATATG-3' y VTSRt (antisentido) 5'-GTCGGATCCTCAAACAGCCATTTTCATCTGC-3', ubicados en las regiones 5' y 3' UTR del gen del WSSV (número de acceso en GenBank NC_003225), mientras que para el gen de la TS del camarón, (número de acceso del GenBank FJ972199.1), fueron LVTSUTRFW (sentido) 5'-GTTGTGAAAATGGAAATGAGC-3' y LVTSUTRRV (antisentido) 5'-TTACACGGCCATTTCCAT-3' ubicados también en las regiones 5' y 3'UTR. Adicionalmente y con el fin de identificar regiones importantes del gen de la TS para la unión, se diseñaron los siguientes oligos para el gen del virus:

VTSRVP (antisentido) 5'-TTGGTAGTGAGAACTGGAATAG-3'

VTSFWC (sentido) 5'-CGGGAATTTTTGGACAGTAGAG-3'

VTSRC (antisentido) 5'-TGCCGTCATAATCATCCTTC-3'.

Y para el gen de la TS del camarón se diseñaron los oligos:

LVTSSLRV (antisentido) 5'-CTCTTCAGCAACACCTCG-3'

LVTSINFW (sentido) 5'-CACATTTGGGATGGAAATTC-3'

LVTSRV (antisentido) 5'-TGCTACGTAGAACTGGCACAAGCAGT-3'

Después de diseñar los iniciadores, se obtuvo el gen completo de TS de camarón *Litopenaeus vannamei*, así como del WSSV desde su extremo 5' UTR hasta su región 3' UTR mediante amplificación por PCR, basados en información previamente depositada en GenBank por el grupo de investigación de CIAD. Los

templados para la reacción de PCR fueron cDNA de TS de camarón y DNA genómico de camarones infectados con el WSSV para obtener el gen de TS viral. También se amplificaron dos fragmentos de cada gen, uno correspondiente a los primeros 200 nucleótidos a partir de la región 5' UTR y otro que corresponden a una región del centro que comprenden los nucleótidos 272-566 para el gen de camarón y 289-490 para el del virus.

Los productos de PCR se limpiaron utilizando el kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). Se realizó la ligación de los productos de PCR al vector *T-Easy* (Promega) que contiene el promotor de la RNA polimerasa del fago T7. Posteriormente se insertó el plásmido recombinante en bacterias *E. coli* TOP 10 químicamente competentes (Invitrogen) mediante choque térmico. Las células se cultivaron en placas con Luria Agar y 100 µg/ml de ampicilina para obtener las colonias transformadas.

Se tomaron colonias aisladas para seleccionar las que contenían el constructo. La identificación se realizó por PCR utilizando los iniciadores específicos de cada gen o fragmento y aparte la combinación del iniciador reverso específico con el iniciador sentido del promotor de la RNA polimerasa T7. De esta forma la amplificación confirmó la presencia del inserto de interés en la dirección correcta del mismo en el sitio de clonación. En esta técnica es necesario confirmar la dirección del fragmento codificante para no alterar el marco de lectura en la transcripción *in vitro*.

Las colonias seleccionadas anteriormente se cultivaron en 50 ml de caldo Luria Bertani con ampicilina incubando de 18 a 24 horas a 37 °C con agitación. Siguiendo el protocolo anexo al kit Midipreps (QIAGEN) se extrajeron los plásmidos de las células del cultivo. Las muestras se cuantificaron por la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop y se verificó la

pureza de los plásmidos por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente se confirmó la presencia del inserto de interés mediante secuenciación como servicio externo por el laboratorio de secuenciación de la Universidad de Arizona, en Tucson, USA.

Síntesis *in vitro* de mRNA

Se realizó la síntesis de mRNA *in vitro* de cada uno de los clones de interés. Para ello, a partir de los plásmidos puros se amplificó por PCR un fragmento de DNA que contiene el inserto unido al sitio promotor de la polimerasa del fago T7. En la reacción se usaron los iniciadores antisentido específicos de cada inserto y el iniciador sentido del promotor de la RNA polimerasa T7. Se utilizaron los fragmentos de DNA sintetizados (5 nanogramos de cada uno) como molde para la síntesis de mRNA. La síntesis de mRNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo anexo al kit RiboMax (Promega). La cuantificación se realizó mediante absorbancia a 260 nm en un equipo Nanodrop y se verificó la integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

Purificación de la Enzima Timidilato Sintasa Recombinante

Se sobreexpresaron las enzimas TS en células transformadas de *E. coli*, las cuales contienen el gen sintético que codifica la TS de camarón o del WSSV dentro del vector pET11a (Novagen) y reportado por Arvizu-Flores y col. (2009). La extracción de la enzima recombinante se realizó por lisis bacteriana a través de sonicación con 6 pulsos de 60 s. Se sonicó por separado cada 7 g de bacterias suspendidas en un buffer de lisis que contiene 100 ml de Tris-HCl 20 mM pH 7.5, DTT (ditiotreitól) 5 mM y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0.5 mM. Se centrifugó a 35000 x g por 30 min manteniendo siempre una temperatura de 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se utilizó estreptomycinina al

5% en proporción de 15 ml por cada 100 ml de precipitado bacteriano para precipitar los ácidos nucleicos y las proteínas ribosomales. Se centrifugó de nuevo a 35000 x g por 30 min. En cada centrifugación se obtuvo a la TS disuelta en el sobrenadante.

Para el proceso de purificación se realizó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio, se agregó 39.8 gr de sulfato de amonio por cada 100 ml para saturar la solución al 65%. Se centrifugó a 35000 x g por 30 min y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente se agregó 9.7 gr de sulfato de amonio por cada 100 ml para saturar al 80% y se centrifugó de nuevo, descartó el sobrenadante y se tomó el precipitado para disolverlo en buffer de fosfatos de potasio 25 mM pH 7.5. Se midió actividad enzimática de TS por oxidación de MTHF (Arvizu-Flores *et al.*, 2009) y se dializó contra un buffer de fosfatos de potasio 25 mM a pH 7.5 para remover el sulfato de amonio remanente. Una vez dializada la muestra, se llevó a cabo la separación por cromatografía de intercambio iónico donde se utilizó el buffer mencionado para la diálisis. Para el gradiente de elución se usó NaCl 1 M. Se identificaron las fracciones que contenían TS mediante actividad enzimática cualitativa.

Para el análisis de la TS se usaron geles de poliacrilamida al 12% en donde se cargaron por separado cada una de las fracciones con actividad de TS. La electroforesis fue en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Laemmli, 1970). El gel se tiñó con azul de Coomassie sumergiendo el gel durante dos horas en una solución que contiene azul de Coomassie brillante R-250 al 0.025 %, 40 % de metanol y 7 % de ácido acético. Posteriormente se destiñó por 1 hora en una solución que contiene 40 % de metanol y 7 % de ácido acético. Por último se pasó a una solución que contiene 7 % de ácido y 5 % de metanol en la cual se dejó permanentemente. Todo el procedimiento de la tinción se realizó a temperatura ambiente.

Ensayo de Movilidad Retardada en Gel (EMSA)

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 8% donde se cargaron las muestras en condiciones nativas. Se hizo el ensayo colocando un control de proteína pura, un control de mRNA puro y la muestra con la mezcla de proteína y mRNA en un buffer de unión. El buffer de unión contiene HEPES 10 mM, beta-mercaptoetanol 250 mM, $MgCl_2$ 3 mM, H_2O tratada con DEPC (dietil pirocarbonato), KCl 40 mM y 5 % de glicerol (Chu *et al.*, 1993). Se tiñó el gel según el protocolo de tinción con nitrato de plata para ácidos nucleicos que permite visualizar tanto el mRNA como la proteína. Se utilizó una solución que contiene 10 % de etanol y 0.5 % de ácido acético donde se mantuvo el gel con agitación por 6 min. Posteriormente se enjuagó con agua deionizada y se sumergió en una segunda solución de nitrato de plata al 0.1 % por 15 min. Se reveló con una solución de 1.5 % de NaOH y 0.15 % de formaldehído. Por último se detuvo la reacción de revelado con Na_2CO_3 al 0.75 % (Taylor, 1997). Alternativo a la tinción con plata descrita, se utilizó bromuro de etidio a una concentración de 1 $\mu g/ml$ para visualizar solo el mRNA con luz ultravioleta en un fotodocumentador.

Un retraso en la migración de las moléculas en el ensayo de unión con respecto a los controles de mRNA y proteína indica que existe una interacción proteína-mRNA (Fig. 2). La especificidad de unión se contrastó utilizando un fragmento de mRNA de 200 bases (no específico) del gen lactato deshidrogenasa (LDH) de camarón (donado por la Dra. Gloria Yepiz y Bertha Leal, del CIAD, datos no publicados), sintetizado en las mismas condiciones ya mencionadas.

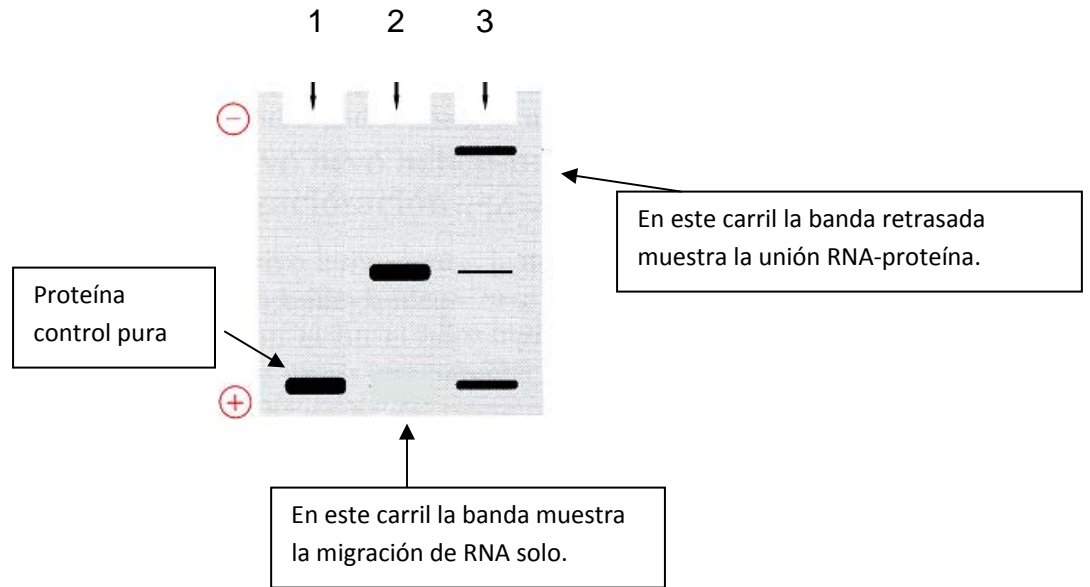


Figura 2. Esquema de un EMSA mostrando una interacción mRNA-proteína. Los primeros dos carriles corresponden a las muestras de proteína y RNA puras. En el tercer carril se muestra la mezcla de ambas muestras donde se visualiza un retraso en la migración por la unión de proteína-RNA.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobreexpresión y Purificación de la Enzima Timidilato Sintasa Recombinante

Se logró purificar a homogeneidad la enzima TS del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca, así como la de su hospedero el camarón *Litopenaeus vannamei*. La enzima de ambas especies se obtuvo en su forma nativa y funcional, esto se corroboró por un ensayo de actividad cualitativo y se mantuvo de esa manera durante todos los ensayos realizados. El almacenamiento de la enzima por periodos largos (varios días) requirió precipitar la proteína pura con sulfato de amonio al 90 % de saturación y congelarla en forma precipitada a -80°C para evitar que perdiera actividad.

Síntesis *in vitro* de mRNA

Se sintetizaron los mRNAs completos incluyendo los extremos 5' UTR y 3' UTR del gen de TS a partir del gen de TS viral, así como el cDNA en el caso del camarón. Al mismo tiempo se sintetizaron dos fragmentos de cada mRNA, uno que contiene los primeros 200 nucleótidos desde la región 5' UTR y otro situado hacia el centro de la molécula (Fig. 3). Todos los templados utilizados en la síntesis de mRNA fueron obtenidos por PCR a partir de un plásmido recombinante construido que contiene el promotor de la RNA polimerasa del fago T7.

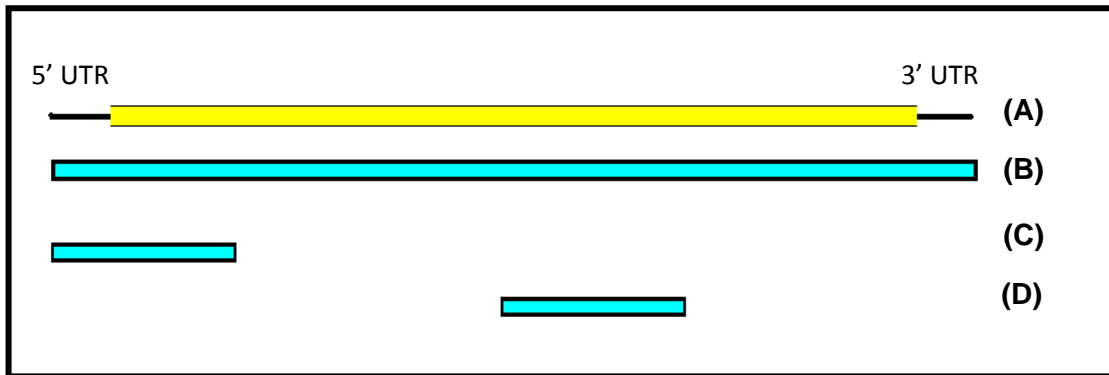


Figura 3. Gen de la TS viral y los mRNAs sintetizados *in vitro*. **(A)** Gen de la TS completo, incluyendo los extremos 5' UTR y 3' UTR. **(B)** mRNA de ~ 900 bases que comprende toda la región codificante y las UTRs. **(C)** mRNA que comprende las primeras 200 bases desde el extremo 5'UTR. **(D)** mRNA de ~ 200 nucleótidos ubicado entre las bases 289-490 en el virus y 272-566 en el camarón.

Ensayo de Movilidad Retardada en Gel (EMSA)

Se utilizó la técnica de electroforesis para detectar la unión de la enzima TS con su propio mRNA. En un primer ensayo se analizó la interacción TS-mRNA del virus y del camarón con los mRNAs de aproximadamente 900 bases correspondiente al transcrito del gen completo desde el extremo 5' UTR hasta el 3' UTR mezclado con la proteína TS respectiva. Los resultados observados en ambos casos no fueron concluyentes. Las bandas de migración no fueron consistentes en cada repetición del ensayo. Por la diferencia en el tamaño de las moléculas (proteína 66 kDa y mRNA 270 kDa aproximadamente) fue más factible detectar la migración del mRNA mediante tinción del gel de poliacrilamida con bromuro de etidio (Fig. 4).

En la figura 4 se puede apreciar la migración electroforética de la molécula completa de mRNA tanto del camarón como del virus, sola y con proteína. No se detecta una banda que defina una diferencia entre la muestra que no tiene proteína y la mezcla de mRNA y proteína. Sin embargo, en algunas repeticiones del experimento, el carril de la mezcla de mRNA de camarón con su proteína

mostraba algunas bandas tenues que podrían indicar un retraso. Estas observaciones carecen de reproducibilidad, por lo que no fueron concluyentes para asegurar que existe una unión proteína-mRNA.

Los estudios realizados por Eduard Chu y col. (1991), al igual que los de Voeller y col. (1995) reportan la unión de la molécula completa de mRNA de la TS a su proteína correspondiente utilizando el EMSA. Sin embargo, antes del ensayo electroforético digieren el mRNA donde tienen la mezcla proteína-mRNA con RNasa T1, reduciendo la molécula de mRNA al tamaño de la región protegida de la degradación por la enzima TS.

La dificultad para evidenciar la unión de la proteína con su mRNA en el presente trabajo, puede deberse al gran tamaño de la molécula de mRNA utilizado. A pesar de que esta molécula puede migrar lento a través del gel de poliacrilamida al 8%, es complicado prevenir algún tipo de degradación que confunda resultados. De esta manera es conveniente utilizar los mRNA pequeños que se sintetizaron anteriormente y que son parte de la molécula completa. Estos fragmentos pertenecen a zonas que forman estructuras secundarias posiblemente necesarias para la unión con la proteína.

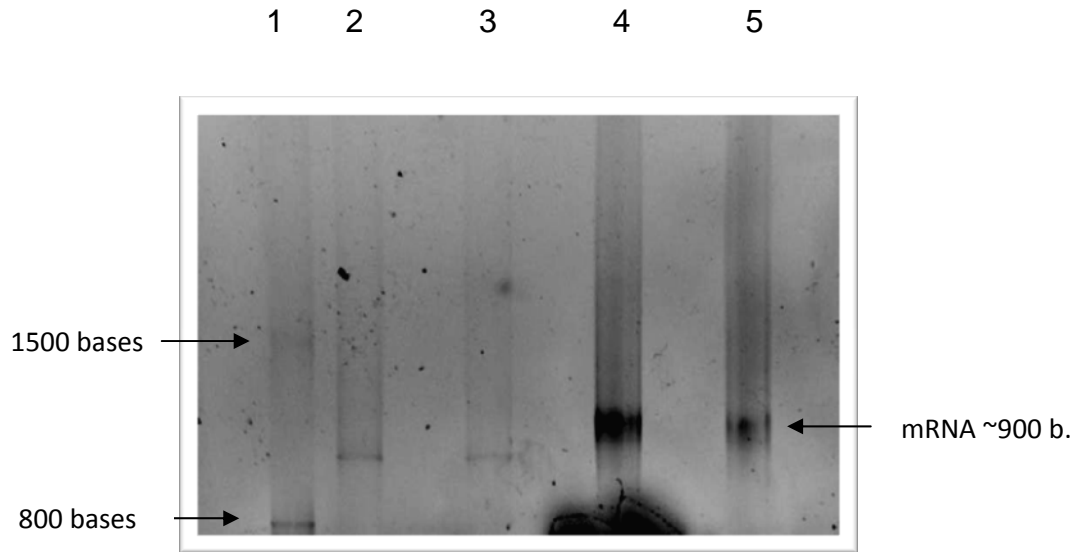


Figura 4. EMSA del mRNA correspondiente al gen completo de TS de 900 bases. El mensajero contiene la región 5' UTR y la 3' UTR. Se realizó la electroforesis en un gel homogéneo de poliacrilamida al 8%. Carril 1, marcador de peso molecular de RNA. Carril 2, mRNA de camarón. Carril 3, mezcla de mRNA y la TS correspondiente a camarón. Carril 4, mRNA del WSSV. Carril 5, mezcla de mRNA y la TS del WSSV.

Se llevó a cabo un ensayo utilizando un fragmento del mRNA que corresponde a los primeros 200 nucleótidos de la región 5' UTR, correspondiente a la región donde se encuentra la principal estructura secundaria (tallo-horquilla) necesaria para la unión con la proteína. Finalmente, se evidenció un retraso en la migración de los complejos proteína-mRNA de camarón, demostrando con ello una unión entre el fragmento de mRNA TS y su proteína cognada. Este resultado se detectó inicialmente con tinción con nitrato de plata (Fig. 5 A), donde el carril 3 muestra una banda señalada por una flecha que corresponde al complejo proteína-mRNA el cual migró más lento que el mRNA solo (carril 2) ó la proteína sola (carril 4). El resultado anterior se corroboró utilizando bromuro de etidio para teñir el mRNA (Fig. 5 B). El fragmento de mRNA de TS de WSSV de 200 bases en la región 5' UTR presentó una banda de retraso en la migración mucho mas tenue en las mismas condiciones que la del camarón. Este resultado pudiera sugerir que la afinidad de la proteína al mRNA de la TS en el virus es menor que en el camarón.

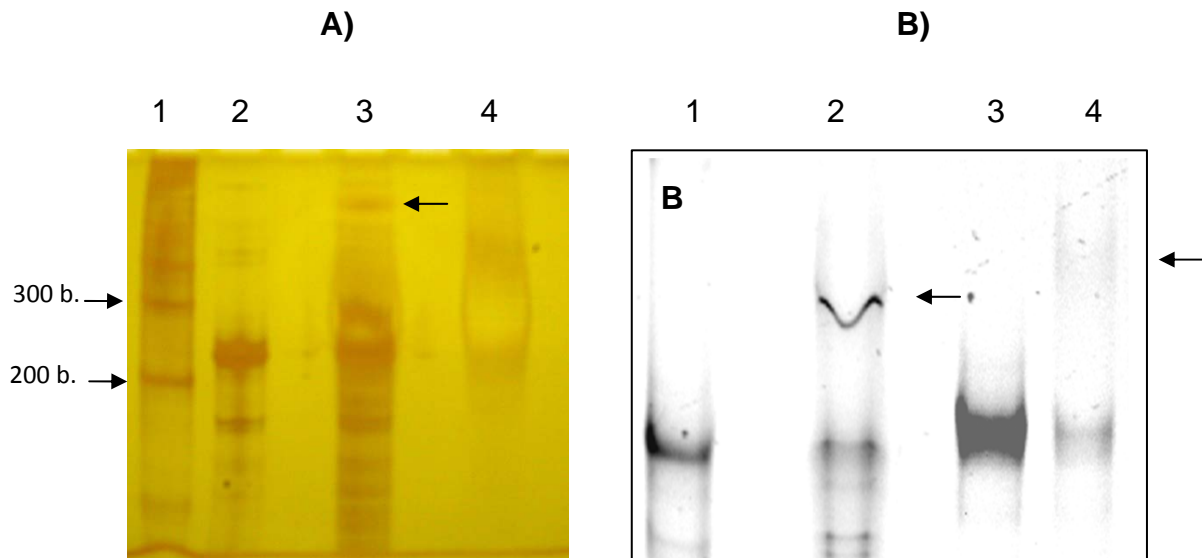


Figura 5. Electroforesis de los mRNAs de 200 bases de la región 5' UTR del mensajero. **(A)** Gel de poliacrilamida al 8% teñido con nitrato de plata; carril 1, marcador de peso molecular de RNA; carril 2, mRNA de camarón; carril 3, mRNA de camarón mezclado con su proteína cognada; carril 4, proteína TS de camarón. **(B)** Gel de poliacrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio; carril 1, mRNA de TS de camarón; carril 2, mRNA de camarón mezclado con su proteína cognada; carril 3, mRNA del virus; carril 4, mezcla de mRNA viral con su proteína correspondiente. Las flechas señalan una banda retrasada.

Eduard Chu y col. en 1993 mencionan la formación de una estructura secundaria similar al elemento de respuesta al hierro (IRE) hacia la región 5' UTR que incluye el codón de inicio posicionado en el lazo de la estructura. Reportan esta estructura como la principal responsable de la formación del complejo proteína-mRNA para TS de humano. Lo anterior denota la importancia de formar determinada estructura secundaria para que la proteína sea afín a la molécula de mRNA .

Análisis bioinformático realizado en el presente trabajo muestran que la molécula de mRNA de camarón puede potencialmente formar una estructura secundaria similar al IRE hacia la región 5' UTR que puede ser responsable de la formación de un complejo con la proteína (Fig. 6). En contraste con el camarón, la estructura secundaria que se forma en el mRNA del virus hacia la región 5' UTR no es similar al IRE (Fig. 7). Para la predicción de las estructuras

secundarias que fueron analizadas se utilizó el programa “mfold” (Zuker, 2003) disponible en línea en: mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi. Lo anterior puede explicar la diferencia en la interacción proteína-mRNA entre camarón y en el virus, donde la unión es aparentemente de menor afinidad. Ya que en el presente trabajo se sugiere que la unión de la proteína-mRNA sucede como posible mecanismo de regulación en la traducción, se podría pensar que la TS del WSSV no se regula con la misma intensidad que su hospedero a nivel de traducción. El hecho de que la TS viral se regule de una manera menos estricta que la de su hospedero, podría representar una ventaja evolutiva para el patógeno.

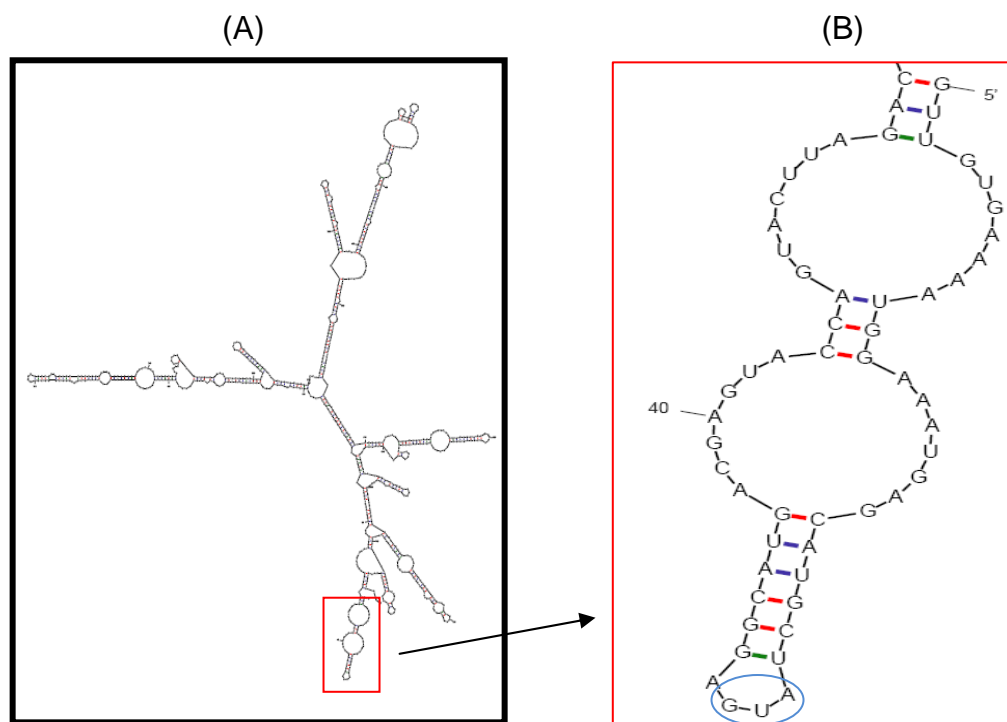


Figura 6. Estructura secundaria del mRNA de la TS de *L. vannamei*. (A) Estructura secundaria del mRNA completo incluyendo los extremos 5' y 3' UTR, predicha con el programa “mfold”. (B) Estructura secundaria en forma de lazo hacia la región 5'UTR que contiene el codón de inicio (encerrado en un círculo) similar al IRE y a la descrita en el mRNA de la TS de humano, donde es la responsable de la unión a la TS.

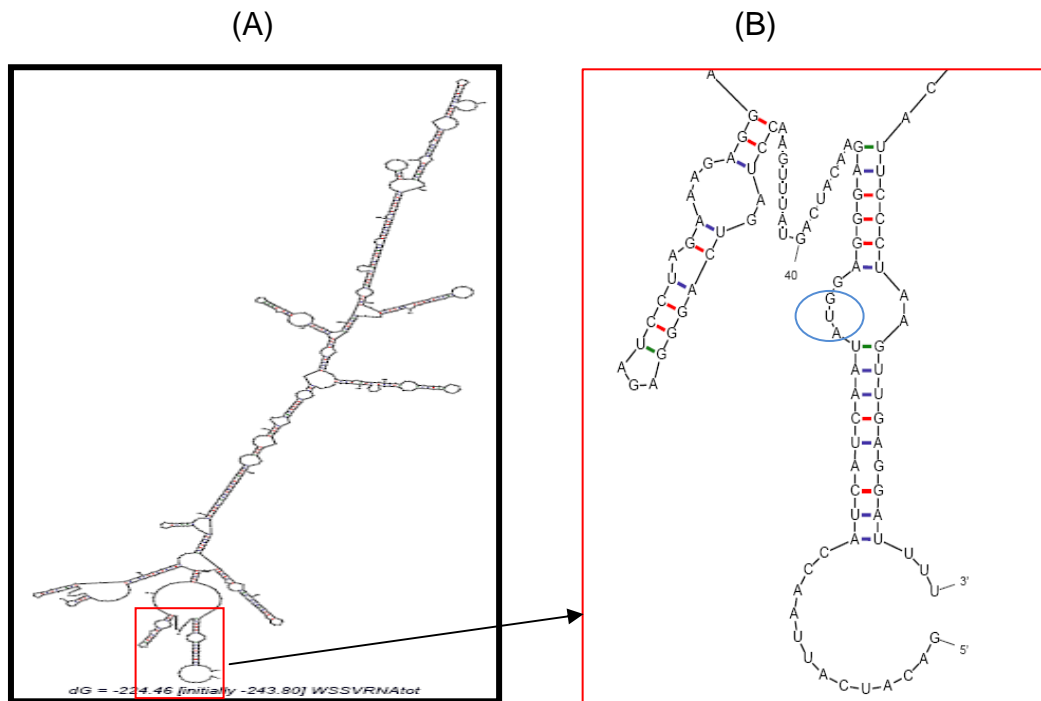


Figura 7. Estructura secundaria del mRNA de la TS del WSSV. (A) Estructura secundaria putativa presente en el mRNA de la TS desde el extremo 5' UTR hasta el extremo 3' UTR predicha con el programa "mfold". (B) Estructura secundaria formada hacia la región 5' UTR donde el codón de inicio (encerrado en un círculo) forma parte de una estructura diferente a la descrita como IRE.

Existe otra región reportada dentro del mensajero de TS de humano y de *E. coli* que es capaz de unirse a la proteína. Esta región está dentro de 200 nucleótidos ubicados hacia el centro del mRNA. Voeller y colaboradores (1995) proponen que las regiones responsables de la unión son conservadas. En este trabajo se ubicó un probable segundo sitio de unión en el mRNA del virus y del camarón basados en las regiones centrales ya descritas en la TS de humano (Chu *et al.*, 1993). Dichas regiones descritas en la TS de humano se tradujeron a sus correspondientes aminoácidos, lo que facilitó la ubicación de las regiones en la TS del virus y del camarón mediante alineamiento de las secuencias de aminoácidos (Fig. 8). Las regiones de aminoácidos resultantes corresponden a las bases 289-490 en el virus y 272-566 en camarón. Aunque los estudios realizados en embriones del pez cebra no mencionan un segundo sitio de unión a proteína dentro del mensajero (Zhang *et al.*, 2010), las predicciones en "mfold"

de las estructuras secundarias formadas en esas regiones muestran similitud a las estructuras secundarias formadas hacia la región 5' UTR. Es por ello que se probó si estas regiones también tienen la capacidad de unir a la enzima.

HUMANO	MPVAGSELPRRPLPPAAQERDAEPRPPHGELQYLGQIQHILRCGVRKDDRTGTGTLISVFG	60
CAMARON	-----MRHDEYQYLDLIRQIMRTGNRKGDRTGTGTISMFG	35
WSSV	-----MEGEHQYLNLVREILERGVKKDDRTGTGTLISIFG	34
HUMANO	MQARYSLRD-EFPLLTTRKRVFVKGVLEELLWFIKGSTNAKELSSKGVKIWDANGS	RDFLD 119
CAMARON	AQMRYSLRDGIFPLLTTRKRVFRGVAEELLWFVRGSTNAKELQEKDIHIWDGNSSKEFLN	95
WSSV	PQMRFSLRDDTIPVLTTKKIFWRGVVEELSWFIRGNTDAKELAKKKIHIWNANGS	REFLD 94
HUMANO	SLGFSTREEGDLGPVYGFQWRHFGAEYRDMESDYSGQGVQDLQRVIDTIKTNPDDRRIM	179
CAMARON	KMGFHDREEGDLGPVYGFQWRHFGAPYADMHTDYTGQGVQDLQQVIDTIKKNPDDRRIM	155
WSSV	SRGLYDRAEGDLGPVYGFQWRHFGAEYDTCSSDYTGKIDQLANILKTLRENPDDRMIM	154
HUMANO	CAWNPRLPLMALPPCHALCQFYVNSELSQCQYQRSADMGLGVPFNIAASYALLTYMIAH	239
CAMARON	CAWNPVDVPMALPPCHCLCQFYVANGELSCQYQRSADMGLGVPFNIAASYALLTYMIAH	215
WSSV	TAWNPMDLHLMALPPCHMTAQFYVANGELSCQYQRSADVGLGVPFNIAASYLLTHLMAS	214
HUMANO	ITGLKPGDFIHTLGDAAHIYLNHIEPLKIQLQREPRPFKLRILRKVEKIDDFKAEDFQIE	299
CAMARON	VTDLKPGDFVHTLGDAAHVSNHCEALEEQKREPRPFPSLKIKRKENISDFKFEDFELD	275
WSSV	MVGLKPGEFILTLGDAAHIYNTHIEVLKQKLCRVPRPFKLRILMAPEKIEDFTIDMFYLE	274
HUMANO	GYNPHP-TIKMEMAV	313
CAMARON	GYKPHP-KIKMEMAV	289
WSSV	GYOPHSGNLOMKMAV	289

Figura 8. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de tres TSs. Se alinearon las secuencias de aminoácidos de la TS de humano, camarón *L. vannamei* y WSSV remarcándose la región central que corresponde a los nucleótidos reportados como segundo sitio de unión a la proteína en humanos, traducidos a los aminoácidos correspondientes.

En la figura 9 se puede ver el resultado del EMSA donde se indican con flechas las bandas de retraso en la migración de mRNA de ~200 bases en complejo con la proteína. De nuevo, en el caso del mensajero que pertenece al camarón se observa una unión fuerte y definida en contraste con una unión casi imperceptible que presenta el complejo de mRNA de la TS viral con su proteína cognada o correspondiente. De esta manera se puede considerar que hay más de una región dentro del mensajero de TS que puede unir a la proteína. Sin embargo, aun no se puede asegurar que ambos sitios de unión participen en la regulación. El uso de métodos más exactos para medir afinidad, por ejemplo titulación calorimétrica, pudiera detectar diferencias entre las dos regiones que

podieran determinar cuál región juega un papel de mayor importancia en la regulación. En el caso de la TS de humano, la afinidad en la región 5' UTR es mayor que la observada en la región central (Chu *et al.*, 1993).

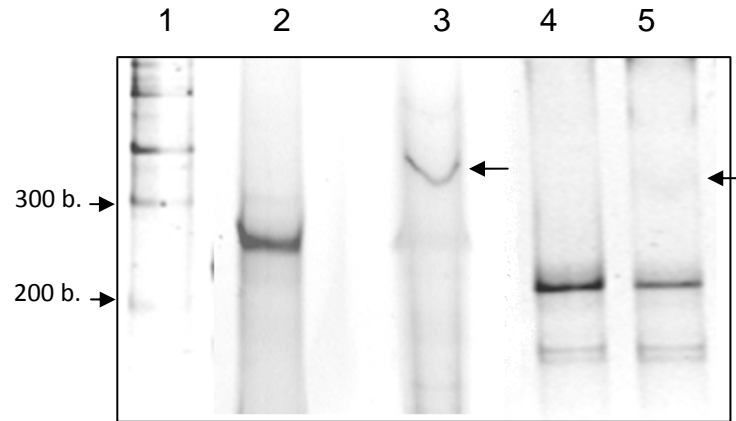


Figura 9. Electroforesis de los mRNAs de ~200 bases ubicados en la región central del mRNA de la TS. Carril 1, marcador de peso molecular de mRNA. Carril 2, mRNA del camarón. Carril 3, mezcla de mRNA y proteína TS del camarón. Carril 4, mRNA del virus. Carril 5, mezcla mRNA y proteína TS del virus.

Para asegurar la especificidad de la unión se probó si el fragmento de 200 bases que está hacia la región 5' UTR del mRNA de TS de camarón forma un complejo con una proteína no relacionada, como la albumina sérica bovina (BSA). En la movilidad electroforética presentada en la figura 10 podemos observar que no hay una unión proteína-mRNA. No se muestra diferencia alguna entre el patrón de migración del mRNA sin proteína, en el carril 2, del mRNA que se encuentra en la mezcla con BSA (carril 3). Esto indica que la unión de la TS de camarón con su propio mensajero es específica, característica necesaria para pensar en una función de regulación.

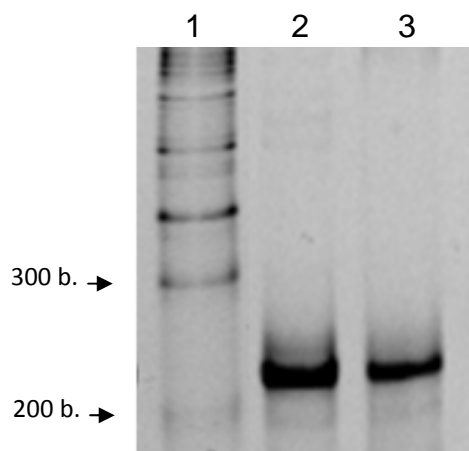


Figura 10. Especificidad de la interacción mRNA-proteína. Se utilizó BSA como proteína de unión y mRNA de 200 bases de la región 5'UTR. Carril 1, marcador de peso molecular de mRNA. Carril 2, mRNA de camarón. Carril 3, mRNA de camarón mezclado con BSA.

También se probó la especificidad de la unión utilizando proteína TS de camarón y un fragmento de mRNA no cognado como control negativo (lactato deshidrogenasa de camarón, datos no publicados). El mRNA de LDH es de tamaño similar al mRNA de TS de camarón. En lo observado no hay una diferencia en la migración del mRNA de LDH cuando se mezcla con proteína TS de camarón (Fig. 11). Los resultados concuerdan con lo observado por Zang y col. (2010) donde utilizaron un transcrito del gen de luciferasa como competidor en la unión y observaron que la TS presenta una afinidad más de 1000 veces mayor por su propio mRNA que por el competidor.

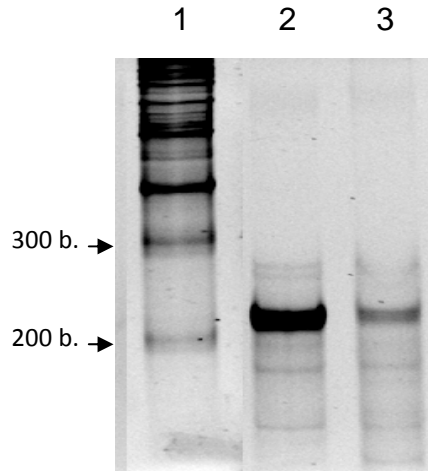


Figura 11. Especificidad de la interacción mRNA-proteína utilizando mRNA de lactato deshidrogenasa de camarón. Carril 1, marcador de peso molecular de mRNA. Carril 2, mRNA de LDH. Carril 3, mRNA de LDH y proteína TS de camarón.

Según el estudio realizado por Voeller y col. en 1995, existen interacciones cruzadas de la proteína de *E. coli* con mRNA de TS de humano y viceversa. En el caso del virus y su hospedero también se encontraron interacciones cruzadas (Fig. 12), su relevancia radica en que se pueden estar regulando mutuamente a nivel de traducción. Se detecta una diferencia en intensidades en las bandas de retraso señaladas con flechas, lo que indica que el mRNA de camarón y la TS viral forman un complejo de mayor afinidad que el mRNA viral y la TS camarón. Esto sugiere que la regulación mutua no es equitativa y tiende a ser más fuerte para la traducción del TS mRNA de camarón.

La regulación de la TS por unión a su mensajero es un proceso que sucede tanto en organismos simples, como procariotes, hasta en organismos muy complejos como el humano (Chu *et al.*, 1991). Sin embargo, en el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca, este tipo de regulación parece no ocurrir. A pesar de que el patógeno sintetiza una proteína prácticamente igual a la de su hospedero (Arvizu-Flores *et al.*, 2009), el mRNA forma una estructura secundaria que favorece mínimamente la regulación descrita. De esta forma, la enzima del patógeno puede ser sintetizada de manera más continua que la del

hospedero, favoreciendo la rápida síntesis de nucleótidos necesarios en la replicación viral y con ello un rápido daño al hospedero.

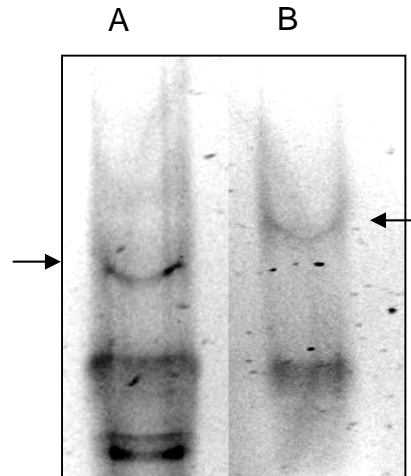


Figura 12. Interacciones cruzadas entre mRNA y proteína TS del virus y del camarón. En ambos carriles se utilizó mRNA de 200 bases situado hacia la región 5' UTR del mensajero. Carril A, mRNA de camarón y TS viral. Carril B, mRNA viral y TS de camarón. Las flechas indican el retardo electroforético causado por la formación del complejo mRNA-proteína.

El que la TS viral participe en la regulación en la traducción de la TS de su hospedero indica que, durante la infección, el camarón tal vez sufre de un desbalance en la síntesis de la enzima que favorece a la patogenicidad del virus. Este hecho pudiera ser más notable en estadios de alta división celular del hospedero como en poslarva y camarones juveniles. Se sabe que los camarones juveniles son más susceptibles a la infección que los adultos. Sería interesante medir la expresión de TS en camarones infectados y no infectados para establecer un vínculo entre una desregulación de la enzima en el hospedero y la patogenicidad viral.

VII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró estudiar el proceso de regulación postranscripcional en la TS del camarón blanco y el WSSV. Una premisa básica para estos estudios es la sobreexpresión recombinante de la enzima timidilato sintasa del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca, así como la de su hospedero *Litopenaeus vannamei* (Arvizu-Flores, 2009). Sin la aplicación de esta metodología, es prácticamente imposible obtener las cantidades necesarias para cumplir con el objetivo principal de este trabajo.

La síntesis de mRNA *in vitro* de ambas timidilato sintasas se realizó exitosamente obteniendo los mRNA desde la región 5' UTR hasta la 3' UTR de TS tanto del virus como del camarón. Además se sintetizaron dos fragmentos de alrededor de 200 bases para cada mensajero situados hacia las regiones 5' UTR y central del mensaje. Las metodologías para obtener el RNA sintético se han implementado en estudios sobre RNA de interferencia, en dos tesis doctorales recientes (Soñanez-Organis, 2010; Garcia-Triana, 2010). La obtención del mensajero y sus fragmentos fueron cruciales para demostrar la hipótesis en este trabajo.

Los ensayos de movilidad retardada en gel muestran que existe una interacción específica entre el mRNA de TS y su proteína cognada o correspondiente. Esta interacción fue notoria al ocurrir la interacción entre el RNA y la proteína. La interacción sucede con el extremo 5' UTR de la molécula y de la misma manera puede interactuar con un fragmento que está en la región central del mRNA. En el caso del WSSV, la interacción ocurre con menor afinidad en comparación con la de camarón. Se podría hipotetizar que la TS viral se regula de una forma menos estricta que la de camarón a nivel de traducción. Al observar interacciones cruzadas entre las moléculas del virus con la del

camarón, se podrían regular mutuamente aunque con diferente intensidad siendo el virus favorecido en su patogenicidad.

Los ensayos de traducción *in vitro* y la producción de mRNAs y proteínas mutantes, serían de gran utilidad para confirmar la función y especificidad de las interacciones, y destacar la importancia de este tipo de regulación en invertebrados marinos. Asimismo, es necesario estudiar la importancia de las interacciones proteína-RNA *in vivo* en organismos sanos y durante la infección viral. Mediciones de expresión de la TS en camarones infectados en diferentes estadios pueden aportar información significativa en el camino a entender el mecanismo patógeno del WSSV.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, N., S. A. Lesley, P. Kuhn yA. Kohen (2004). "Mechanistic Studies of a Flavin-Dependent Thymidylate Synthase†." Biochemistry **43**(32): 10295-10301.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. yW. J. (2002). Biología Molecular de la Célula. Barcelona, Ed. Omega.
- Anderson, A. C., R. H. O'Neil, W. L. DeLano yR. M. Stroud (1999). "The structural mechanism for half-the-sites reactivity in an enzyme, thymidylate synthase, involves a relay of changes between subunits." Biochemistry **38**(42): 13829-13836.
- Arvizu-Flores, A. A., E. Aispuro-Hernandez, K. D. Garcia-Orozco, A. Varela-Romero, E. Valenzuela-Soto, E. F. Velazquez-Contreras, A. Rojo-Dominguez, G. Yepiz-Plascencia, F. Maley yR. R. Sotelo-Mundo (2009). "Functional identity of the active sites of crustacean and viral thymidylate synthases." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **150**(3): 406-413.
- Arvizu-Flores, A. A. (2009). "Estudios de inhibición diferencial en timidilato Sintasa de camarón *Litopenaeus vannamei* y del virus del síndrome de la mancha blanca." Tesis doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Animal. Hermosillo, Sonora.
- Brenowitz, M., D. F. Senear, M. A. Shea yG. K. Ackers (1986). "Quantitative DNase footprint titration: a method for studying protein-DNA interactions." Methods Enzymol **130**: 132-81.
- Bustillo-Ruiz, M. I., C. M. Escobedo-Bonilla yR. R. Sotelo-Mundo (2009). "Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos." Revista de biología marina y oceanografía **44**(1): 1-11.
- Carreras, C. W., N. Naber, R. Cooke yD. V. Santi (1994). "A C-terminal conformational equilibrium in thymidylate synthase observed by electron paramagnetic resonance spectroscopy." Biochemistry **33**(8): 2071-2077.

- Carreras, C. W. yD. V. Santi (1995). "The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase." Annu Rev Biochem **64**: 721-62.
- Casey L., H. M., Koeller D., Caughman S., Rouault T., Klausner R., Harford J. (1988). "Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation." Science **240**(4854): 924-928.
- Changchien, L. M., A. Garibian, V. Frasca, A. Lobo, G. F. Maley yF. Maley (2000). "High-level expression of Escherichia coli and Bacillus subtilis thymidylate synthases." Protein Expression and Purification **19**(2): 265-270.
- Chu, E., D. M. Koeller, J. L. Casey, J. C. Drake, B. A. Chabner, P. C. Elwood, S. Zinn yC. J. Allegra (1991). "Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 8977-81.
- Chu, E., D. Voeller, D. M. Koeller, J. C. Drake, C. H. Takimoto, G. F. Maley, F. Maley yC. J. Allegra (1993). "Identification of an RNA binding site for human thymidylate synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 517-21.
- Escobedo-Bonilla, C. M., V. Alday-Sanz, M. Wille, P. Sorgeloos, M. B. Pensaert yH. J. Nauwynck (2008). "A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus." Journal of Fish Diseases **31**(1): 1-18.
- Garcia-Triana, A. (2010). "Hipoxia, reoxigenación y silenciamiento de superóxido dismutasa citosólica manganesa (cMnSOD) y selenoproteína M (Sel M) en Litopenaeus vannamei: implicaciones en el metabolismo redox." Tesis doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Animal. Hermosillo, Sonora.
- Garner, M. M. yA. Revzin (1981). "A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system." Nucleic Acids Res **9**(13): 3047-60.
- Hardy, L. W., J. S. Finer-Moore, W. R. Montfort, M. O. Jones, D. V. Santi yR. M. Stroud (1987). "Atomic structure of thymidylate synthase: target for rational drug design." Science **235**(4787): 448-55.
- Hartley, R., V. Le Meuth-Metzinger yH. B. Osborne (2002). "Screening for sequence-specific RNA-BPs by comprehensive UV crosslinking." BMC Mol Biol **3**: 8.
- Horie, N. yK. Takeishi (1997). "Identification of functional elements in the promoter region of the human gene for thymidylate synthase and nuclear

- factors that regulate the expression of the gene." Journal of Biological Chemistry **272**(29): 18375.
- Jarroll, E. L., P. Manning, A. Berrada, D. Hare yD. G. Lindmark (1989). "Biochemistry and metabolism of Giardia." Journal of Eukaryotic Microbiology **36**(2): 190-197.
- Jenh, C. H., P. K. Geyer yL. F. Johnson (1985). "Control of thymidylate synthase mRNA content and gene transcription in an overproducing mouse cell line." Mol Cell Biol **5**(10): 2527-32.
- Johnson, L. F. (1994). "Posttranscriptional regulation of thymidylate synthase gene expression." Journal of cellular biochemistry **54**(4): 387-392.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Li, Q., D. Pan, J. H. Zhang yF. Yang (2004). "Identification of the thymidylate synthase within the genome of white spot syndrome virus." Journal of General Virology **85**: 2035-2044.
- Liang, P. H. yK. S. Anderson (1998). "Substrate Channeling and Domain-Domain Interactions in Bifunctional Thymidylate Synthase- Dihydrofolate Reductase†." Biochemistry **37**(35): 12195-12205.
- Lin, X., J. Liu, F. Maley yE. Chu (2003). "Role of cysteine amino acid residues on the RNA binding activity of human thymidylate synthase." Nucleic acids research **31**(16): 4882.
- Manavalan, P., D. M. Mittelstaedt, M. I. Schimerlik yW. C. Johnson, Jr. (1986). "Conformational analysis of thymidylate synthase from amino acid sequence and circular dichroism." Biochemistry **25**(21): 6650-5.
- Montfort, W. R., K. M. Perry, E. B. Fauman, J. S. Finer-Moore, G. F. Maley, L. Hardy, F. Maley yR. M. Stroud (1990). "Structure, multiple site binding, and segmental accommodation in thymidylate synthase on binding dUMP and an anti-folate." Biochemistry **29**(30): 6964-77.
- Myllykallio, H., G. Lipowski, D. Leduc, J. Filee, P. Forterre yU. Liebl (2002). "An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis." Science **297**(5578): 105-7.
- Newbury, S. F. (2006). "Control of mRNA stability in eukaryotes." Biochemical Society Transactions **34**(1): 30-34.
- Phan, J., S. Koli, W. Minor, R. B. Dunlap, S. H. Berger yL. Lebioda (2001). "Human Thymidylate Synthase Is in the Closed Conformation When Complexed with dUMP and Raltitrexed, an Antifolate Drug†,‡." Biochemistry **40**(7): 1897-1902.

- Santi, D. V., T. M. Ouyang, A. K. Tan, D. H. Gregory, T. Scanlan yC. W. Carreras (1993). "Interaction of thymidylate synthase with pyridoxal 5'-phosphate as studied by UV/visible difference spectroscopy and molecular modeling." Biochemistry **32**(44): 11819-11824.
- Soñanez-Organis, J. G., A. B. Peregrino-Uriarte, S. Gómez-Jiménez, A. López-Zavala, H. J. Forman yG. Yepiz-Plascencia (2009). "Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **150**(3): 395-405.
- . Soñanez-Organis, J. G. (2010). "Regulación de los genes glucolíticos hexocinasa y lactato deshidrogenasa por el factor inducido por hipoxia I en el camarón *Litopenaeus vannamei*." Tesis doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Animal. Hermosillo, Sonora.
- Sotelo-Mundo, R. R., J. Ciesla, J. M. Dzik, W. Rode, F. Maley, G. F. Maley, L. W. Hardy yW. R. Montfort (1999). "Crystal Structures of Rat Thymidylate Synthase Inhibited by Tomudex, a Potent Anticancer Drug†,‡." Biochemistry **38**(3): 1087-1094.
- Spencer, H. T., J. E. Villafranca yJ. R. Appleman (1997). "Kinetic Scheme for Thymidylate Synthase from *Escherichia coli*: Determination from Measurements of Ligand Binding, Primary and Secondary Isotope Effects, and Pre-Steady-State Catalysis†." Biochemistry **36**(14): 4212-4222.
- Stern, A., I. Mayrose, O. Penn, S. Shaul, U. Gophna yT. Pupko (2010). "An Evolutionary Analysis of Lateral Gene Transfer in Thymidylate Synthase Enzymes." Systematic biology **59**(2): 212.
- Stout, T. J. yR. M. Stroud (1996). "The complex of the anti-cancer therapeutic, BW1843U89, with thymidylate synthase at 2.0 Å resolution: implications for a new mode of inhibition." Structure **4**(1): 67-77.
- Stroud, R. M. yJ. S. Finer-Moore (2003). "Conformational dynamics along an enzymatic reaction pathway: thymidylate synthase, "the movie"." Biochemistry **42**(2): 239-47.
- Taylor, G. R. (1997). Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA, CRC Press.
- Trujillo, M., R. G. K. Donald, D. S. Roos, P. J. Greene yD. V. Santi (1996). "Heterologous Expression and Characterization of the Bifunctional Dihydrofolate Reductase- Thymidylate Synthase Enzyme of *Toxoplasma gondii*†." Biochemistry **35**(20): 6366-6374.

- Voeller, D. M., L. M. Changchien, G. F. Maley, F. Maley, T. Takechi, R. E. Turner, W. R. Montfort, C. J. Allegra yE. Chu (1995). "Characterization of a specific interaction between *Escherichia coli* thymidylate synthase and *Escherichia coli* thymidylate synthase mRNA." Nucleic Acids Res **23**(5): 869-75.
- Voeller, D. M., M. Zajac-Kaye, R. J. Fisher yC. J. Allegra (2002). "The identification of thymidylate synthase peptide domains located in the interface region that bind thymidylate synthase mRNA." Biochem Biophys Res Commun **297**(1): 24-31.
- West, D. K., D. C. Porter, R. L. Saxl yF. Maley (2004). "A Trojan Horse Approach for Silencing Thymidylate Synthase†." Biochemistry **43**(28): 9177-9184.
- Zhang, Y., S. Yang, M. Liu, C. Song, N. Wu, P. Ling, E. Chu yX. Lin (2010). "Interaction between Thymidylate Synthase and Its Cognate mRNA in Zebrafish Embryos."