

170  
zej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**Facultad de Ciencias**

**PURIFICACION DE LA TRIOSAFOSFATO  
ISOMERASA DE SCHIZOSACCHAROMYCES  
POMBE Y HUMANO**



**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G A**  
P R E S E N T A :  
**YOKASTA VERA RANGEL**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM**

**MEXICO, D. F.,**



**DIRECTORA DE TESIS: GEORGINA GARZA RAMOS MARTINEZ**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM**

**1987.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Purificación de la Triosafosfato Isomerasa de Schizosaccharomyces pombe  
y humano.  
realizado por Yokasta Vera Rangel

con número de cuenta 8916315-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez.

Propietario

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco.

Propietario

M. en I.B.B. Emma Cecilia Saavedra Lira.

Suplente

Dra. Alejandra Mainero Del Paso.

Suplente

Bióloga Marfa Elena Cháñez Cárdenas.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena

***Estudiante:***

***“Nunca consideres el estudio como un deber, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”***

***Albert Einstein***

## **Agradezco:**

**A la Dra. Georgina Garza-Ramos, por apoyarme en todo momento, por su confianza y paciencia.**

**A los doctores Marieta Tuena de Gómez-Puyou y Armando Gómez-Puyou, por ser excelentes personas.**

**A Lety, Pachis, Ernesto, José, Gerardo, Natasha, Sra. María Elena y Jesús, por su amistad y grata compañía, que hicieron muy ameno todo el tiempo que estuve en el laboratorio.**

**A los integrantes del jurado, por haberse tomado el tiempo en revisar este trabajo.**

**A mis padres Oscar y Elizabeth, que siempre me han apoyado y han confiado en mí. Por su amor y sus sabios consejos.**

**A mi hermana Ceci, por su compañía y cariño, y por ser la alegría de la casa.**

**A Francisco, por apoyarme en mis estudios.**

**A la Srita. Celia Paredes, por sus consejos siempre tan certeros y oportunos.**

**A mi maestra Graciela Basurto, por haberme motivado para continuar con mis estudios.**

**A toda mi familia y amigos por su interés y apoyo.**

**A la UNAM, la máxima casa de estudios, por haberme formado en sus aulas.**

## **ABREVIATURAS**

<b>Tris</b>	<i>Tris(hidroximetil)aminometano</i>
<b>KCl</b>	<i>Cloruro de Potasio</i>
<b>EDTA</b>	<i>Acido etilendiaminotetraacético</i>
<b>DTT</b>	<i>Ditiotreitol</i>
<b>PMSF</b>	<i>Fenilmetano Sulfonil Floruro</i>
<b>TLCK</b>	<i>Tosil-lisil Clorometil cetona</i>
<b>NaN<sub>3</sub></b>	<i>Azida de Sodio</i>
<b>NaCl</b>	<i>Cloruro de Sodio</i>
<b>TEA</b>	<i>Trietanolamina</i>
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<i>Sulfato de Amonio</i>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<i>Cloruro de Calcio</i>
<b>IPTG</b>	<i>Isopropil Tio-galactósido</i>
<b>DMSO</b>	<i>Dimetil Sulfóxido</i>
<b>NADH</b>	<i>Nicotinadenindinucleótido (reducido)</i>
<b>DEAE</b>	<i>Dietilaminoetil</i>
<b>pI</b>	<i>Punto Isoeléctrico</i>
<b>kDa</b>	<i>Kilodaltones</i>
<b>Km</b>	<i>Constante de Michaelis-Menten</i>
<b>Vmax</b>	<i>Velocidad máxima de la reacción</i>
<b>NaOH</b>	<i>Hidróxido de Sodio</i>

## INDICE

<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Triosafosfato isomerasa.....</i>	<b>1</b>
♦ <i>Propiedades catalíticas.....</i>	<b>1</b>
♦ <i>Propiedades estructurales y funcionales.....</i>	<b>5</b>
1.2 <i>Inhibidores especie-específicos.....</i>	<b>9</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>12</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>IV. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>15</b>
IV.1 <i>Purificación de la TPI de <u>S. pombe</u>.....</i>	<b>15</b>
♦ <i>Extracción.....</i>	<b>15</b>
♦ <i>Purificación.....</i>	<b>16</b>
IV.2 <i>Purificación de la TPI de humano.....</i>	<b>18</b>
♦ <i>Transformación y sobre-expresión de la TPI de humano.....</i>	<b>18</b>
♦ <i>Extracción.....</i>	<b>19</b>
♦ <i>Purificación.....</i>	<b>19</b>
IV.3 <i>Efecto de PTTS y del MMTS en la TPI de <u>S.pombe</u> y humano.....</i>	<b>21</b>
IV.4 <i>Determinación de Actividad.....</i>	<b>22</b>
IV.5 <i>Determinación de Proteína.....</i>	<b>22</b>
IV.6 <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecilsulfato de Sodio (SDS).....</i>	<b>23</b>

<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
V.1 Purificación de la TPI de <u>S. pombe</u> .....	<b>24</b>
♦ Fraccionamiento con sulfato de amonio.....	<b>24</b>
♦ Alternativas para obtener un Alto Rendimiento.....	<b>26</b>
♦ Alternativas para eliminar el contaminante de alto peso molecular.....	<b>28</b>
V.2 Purificación de la TPI de humano.....	<b>32</b>
V.3 Efecto del PTTS y del MMTS en la TPI de <u>S. pombe</u> y de humano.....	<b>36</b>
♦ Efecto del PTTS y MMTS en la Actividad de la TPI de <u>S. pombe</u> .....	<b>37</b>
♦ Efecto del PTTS y MMTS en la Actividad de la TPI de humano.....	<b>41</b>
<b>VI. DISCUSION</b> .....	<b>45</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>VIII. REFERENCIAS</b> .....	<b>49</b>

# **I. INTRODUCCION**

## **I.1 TRIOSAFOSFATO ISOMERASA**

### ***Propiedades catalíticas***

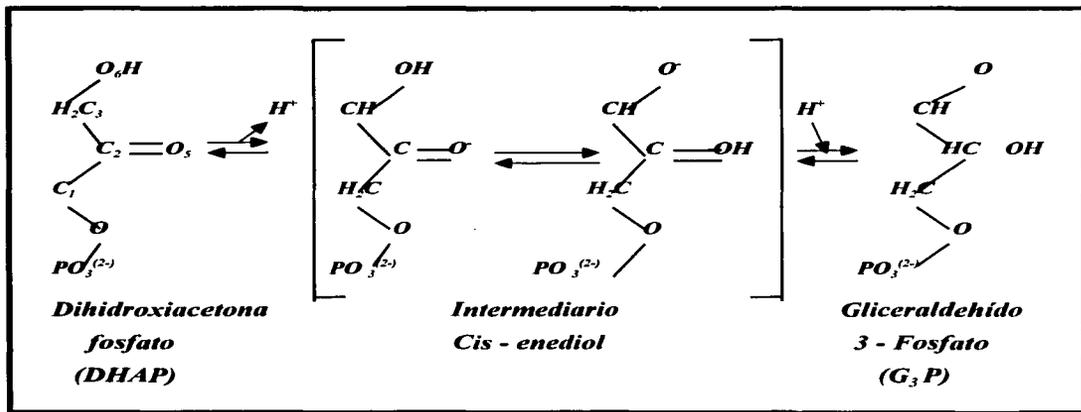
*La enzima Triosafosfato isomerasa (TPI) es una de las enzimas de la glucólisis que cataliza la conversión reversible del gliceraldehído 3-fosfato ( $G_3P$ ), una aldosa, en dihidroxiacetona fosfato (DHAP), una cetosa, a través de un intermediario cis-enediol. Esta reacción está presente en todos los organismos; la TPI es absolutamente esencial para la eficiente producción de energía. No se han reportado casos de organismos desprovistos de la TPI. De hecho, las personas que tienen defectuoso uno de los alelos del gen que codifica para la TPI sufren de anemia hemolítica crónica y trastornos neuromusculares. La TPI es un dímero de subunidades idénticas de 26 a 28 kDa y no se conoce que se requieran cofactores o reguladores alostéricos para su actividad. Sólo la forma dimérica es activa[1,2,3].*

*La TPI ha sido sujeto de extensos estudios biofísicos y bioquímicos. Debido a su importante papel en la glucólisis, la TPI también forma un blanco atractivo para diseñar fármacos contra parásitos que tengan la capacidad de sobrevivir en el torrente sanguíneo de los mamíferos.. El azúcar en la sangre es la principal fuente de energía para estos parásitos, y de esta manera se espera que al bloquear la glucólisis se pueda eliminar a estos parásitos del torrente sanguíneo. Entre las enfermedades que actualmente hacen estragos en el mundo tropical están: la*

*malaria causada por Trypanosoma cruzi y la enfermedad del sueño causada por Trypanosoma brucei.*

*Las propiedades catalíticas de la TPI se han estudiado en detalle, y se ha establecido que la velocidad de la reacción es controlada por la difusión (la velocidad de la reacción no se modifica si se acelera alguna de las reacciones intermediarias), por lo que se le ha definido como un "catalizador perfecto" [4,5]. El mecanismo de la reacción de isomerización catalizada por la TPI se ha estudiado ampliamente. La enzima es uno de los catalizadores más eficientes que se conocen, aumenta la velocidad de la reacción  $10^9$  veces [6]. Además, la TPI puede catalizar la degradación de los sustratos para dar metilglioxal y fosfato inorgánico [6]. Esta reacción de eliminación es lenta comparada con la reacción de isomerización [6]. Los valores de la relación  $K_{cat}/K_m$  obtenidos son de  $10^8$  a  $10^9 M^{-1} s^{-1}$  y  $14 M^{-1} s^{-1}$  para las reacciones de isomerización y eliminación respectivamente [7,8](Figura 1). El metilglioxal es un compuesto altamente reactivo; se desconoce su función biológica, aunque se considera como un compuesto tóxico [9]. Afortunadamente, el metilglioxal es metabolizado por dos enzimas de la vía de las glioxalidas, cuya función metabólica no está bien determinada. Es posible que esta vía se haya desarrollado con el propósito de remover el metilglioxal, el cual es formado como subproducto de la reacción de la triosafofosfato isomerasa [7].*

*En el sitio activo de la enzima se han identificado dos residuos, el ácido glutámico-165 (Glu-165) y la histidina-95 (His-95), que participan directamente en la reacción [1,2]. El carboxilato del Glu-165 actúa como base, sustrae y transfiere un protón del intermediario [1,2]. El anillo imidazol de la His-95 es un catalizador electrofílico que polariza el grupo carbonilo del sustrato, permitiendo su enolización*



**Figura I. Mecanismo de la reacción de isomerización de la Triosafosfato Isomerasa.**

[2]. Recientemente se ha sugerido que la His-95 cataliza la transferencia de un protón durante la interconversión de los dos intermediarios enediol, por lo que funciona también como un catalizador ácido-base [8].

Las propiedades fisicoquímicas y estructurales de la TPI varían de especie a especie, sin embargo, sus características cinéticas son muy similares [7,10,11,12]. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de la TPI de *T. brucei* y de pollo tienen 48.2% de similitud, mientras que sus parámetros cinéticos son prácticamente idénticos (Tabla I). La identidad entre las secuencias primarias varía desde 36% entre la TPI de *Bacillus stearothermophilus* y la de levadura [1], hasta 98% entre la de humano y conejo [1], y 100% entre la del chimpancé y el humano [13]. En la

tabla II se compara el porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos de la TPI de varias especies [10]. Estas diferencias se reflejan en sus propiedades

	<b>Km (G3P) (mM)</b>	<b>Km (DHAP) (mM)</b>	<b>Kcat (G3P) min</b>	<b>Kcat (DHAP) min</b>	<b>Referencias</b>
<b>Pollo</b>	0.47	0.97	$2.6 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-5}$	[11]
<b><u>T.brucei</u></b>	0.25	1.2	$3.7 \times 10^{-4}$	$6.5 \times 10^{-5}$	[10]
<b>Levadura</b>	0.56	3.6	$1.7 \times 10^{-4}$	$6.6 \times 10^{-5}$	[8]
<b>Conejo</b>	0.39	0.62		$5.4 \times 10^{-5}$	[7]
		0.98			[31]
<b>Humano</b>	0.43	0.82	$2.7 \times 10^{-4}$		[4,31]
<b><u>Leishmania mexicana</u></b>	0.31	1.2	$2.45 \times 10^{-4}$	$2.5 \times 10^{-5}$	[32]

**Tabla I. Parámetros cinéticos de la Triosafosfato isomerasa de varias especies.**

moleculares, tales como sus puntos isoeléctricos cuyos valores pueden variar desde valores de pH de 4.4 a 10. Por ejemplo: la TPI de T. brucei difiere de su alto punto isoeléctrico con respecto de sus homólogos (9.8 comparado con 6.5 y 5.4 de las enzimas de conejo y pollo respectivamente), lo que significa que la enzima tripanosomal está cargada positivamente bajo condiciones de máxima actividad mientras que sus homólogas no lo están [10]. También los pH óptimos y las termoestabilidades son diferentes para cada especie.

	<i>humano</i>	<i>conejo</i>	<i>T.brucei</i>	<i>pollo</i>	<i>levadura</i>
<b>%</b>					
<b><i>humano</i></b>	98		53	90	53
<b><i>conejo</i></b>			51	88	51
<b><i>T.brucei</i></b>		<b>86</b>		52	48
<b><i>pollo</i></b>		<b>97</b>	<b>83</b>		53
<b><i>levadura</i></b>		<b>83</b>	<b>84</b>	<b>84</b>	

**Tabla II. Porcentajes de identidad de la TPI de diferentes especies. Los números en negritas son los porcentajes de identidad de los residuos que se encuentran cerca del sitio activo. Los números en tipo normal son los porcentajes de identidad de los residuos de la secuencia completa.**

### **Propiedades estructurales y funcionales**

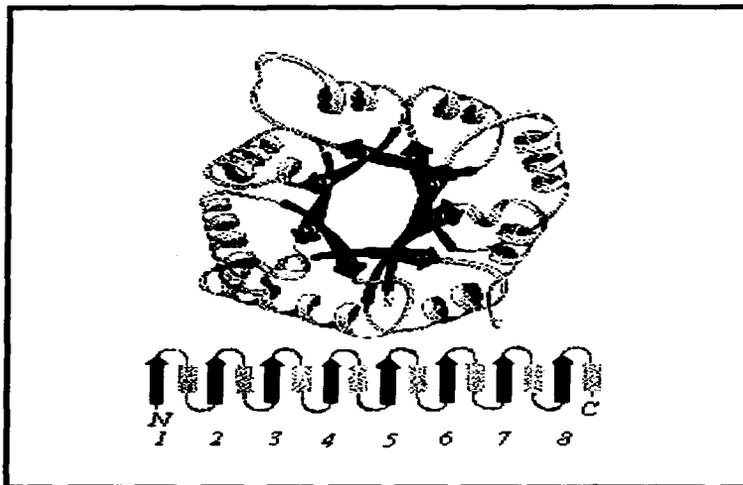
La triosafosfato isomerasa se considera una enzima modelo en el estudio de las relaciones estructura/función. Su mecanismo de acción se conoce con detalle. Se han identificado los residuos del sitio activo y se conocen las secuencias primarias de un gran número de especies. Estructuralmente la triosafosfato isomerasa pertenece a una familia bien caracterizada, siendo la TPI el prototipo de la estructura de barril  $\alpha/\beta$ . Se han elucidado las estructuras cristalográficas de la TPI de pollo [14], levadura [15], *T. brucei* [16], *E. coli* [17] y humano [4] entre otras. La proteína es un homodímero de alrededor de 250 residuos en el cual cada subunidad globular presenta una estructura característica de barril  $\alpha/\beta$  formada por 8 hebras  $\beta$  paralelas, rodeadas por 8  $\alpha$ -hélices [4,18] (Figura 2). El barril está situado en el interior de la proteína; las hebras están interconectadas por hélices anfipáticas que

*se empaquetan contra la superficie del barril. Los aminoácidos que forman el barril son predominantemente hidrofóbicos; algunas de estas cadenas laterales llenan el interior del barril y forman parte del centro hidrofóbico de la enzima. Únicamente los aminoácidos polares se encuentran en los extremos del barril, especialmente el extremo amino-terminal, donde el barril está expuesto al solvente [1]. A pesar de las diferencias en la secuencia primaria entre las enzimas, su estructura tridimensional está altamente conservada [15,19].*

*La TPI posee un asa cerca del sitio activo. El asa llamada "asa flexible", está formada por 10-11 aminoácidos y se localiza entre los residuos 166 a 176, el cual en presencia de un ligando específico se mueve 7Å de una posición "abierta" a una posición "cerrada" [1,15,16]. Este movimiento aísla al sitio activo del solvente que rodea a la enzima, estableciendo un puente de hidrógeno entre un residuo de glicina del asa y el grupo fosfato del sustrato que estabiliza al intermediario enediol de la reacción. En esta integración se asegura la transformación eficiente del sustrato y se inhibe la reacción de eliminación del grupo fosfato del intermediario, por lo que se previene la formación de metilglioxal [2,7]. Un único caso ha sido reportado en el cual el N-hidroxi-4-fosfono-butanamida, un inhibidor que es un átomo de carbono más grande que el sustrato, se une con la conformación del asa en posición "abierta" [20].*

*La Lys-12, que forma parte del sitio activo, es el aminoácido responsable de la especificidad de la enzima por su sustrato natural. La Lys 12 se une al carboxilato del Glu-97 a través de un puente de hidrógeno. Debido a la proximidad de la Lys-12 al Glu-97, y al  $pK_a$  usual del grupo amino de la Lys, se ha establecido que la Lys-12 está cargada. El Glu-97 establece un puente de hidrógeno con la amida de la Thr-75 de la subunidad vecina. Esta red de puentes de hidrógeno que involucra a la Lys-12*

puede explicar porque únicamente el dímero de la TPI es catalíticamente competente: cada una de las subunidades provee una "pared" sobre la cual se apoya el otro sitio activo [1].



**Figura 2.** Esquema que muestra la estructura de la Triosafosfato Isomerasa. La estructura característica de barril  $\alpha/\beta$  está formada por 8 hojas  $\beta$  (flechas) paralelas rodeadas por 8  $\alpha$ -hélices (rectángulos). (Tomado de Branden y Tooze, 1991).

*Un factor muy importante para la estabilidad de la enzima es el número de cavidades en la estructura y las cavidades ocultas en el área de la superficie. Analizando diferentes estructuras de TPI, se encontró que la TPI de B. stearothermophilus tiene un menor número de cavidades y de menor tamaño que otras TPI, favoreciendo de este modo su estabilidad térmica [12].*

*Los contactos entre las dos subunidades de la TPI se establecen a través de un asa formada por los residuos 71 al 78. Estos se extienden desde una subunidad hacia una hendidura localizada cerca del sitio activo de la otra subunidad. Además, parece que gran parte de la especificidad de una subunidad por la otra es debida a las interacciones polares de la interfase. De esta manera los dos sitios activos y las interfases entre las subunidades se mantienen estrechamente relacionadas [1]. De hecho, a excepción del asa, hay muy pocos residuos conservados en esa zona, sugiriendo que los monómeros de diferentes organismos no podrían formar heterodímeros activos. Esta observación puede ser usada para diseñar inhibidores especie-específico de la TPI. Ya que los residuos del sitio activo de la TPI son conservados entre diferentes organismos, es poco probable encontrar un inhibidor especie-específico teniendo como blanco al sitio activo. Sin embargo, ya que la TPI es activa únicamente como dímero, y es muy grande la diversidad de aminoácidos en la interfase de distintas especies, es posible diseñar un péptido u otra molécula orgánica que se una a la interfase de la TPI de un organismo patógeno y evitar su dimerización. La molécula puede unirse a la interfase sin proporcionar la "pared" necesaria para generar un sitio activo apropiado [1].*

## **I.2 INHIBIDORES ESPECIE-ESPECIFICOS**

*El desarrollo de nuevos medicamentos con acción específica contra las enfermedades parasitarias ha tomado gran relevancia. Los fármacos que se administran para curar las enfermedades parasitarias carecen de especificidad y generalmente son tóxicos para el hospedero. La mayoría de las investigaciones enfocan su atención a la modificación del sitio activo de la enzima para diseñar un medicamento con un efecto de inhibición enzimática diferencial.*

*Un nuevo enfoque para diseñar fármacos con efecto inhibitorio específico de especie ha sido propuesto por Gómez-Puyou y colaboradores [21].*

*El planteamiento hipotético se fundamenta en que la mayor diferencia entre dos enzimas homólogas de especies diferentes se puede encontrar en los aminoácidos no conservados; que no participan directamente en la catálisis enzimática porque no pertenecen al sitio activo, pero que, sin embargo, sean importantes en la actividad y/o estabilidad de la estructura de la enzima de esa especie en particular. Por lo tanto, al alterar la estructura y/o catálisis de la enzima como consecuencia de la modificación de un aminoácido no conservado permitirá diseñar fármacos que afecten de una manera muy selectiva a la enzima del parásito.*

*Todos los seres vivos dependen del proceso de generación de energía para mantener sus funciones biológicas. Los parásitos y específicamente los tripanosomas dependen de la glucólisis para generar el ATP que requieren para la proliferación y maduración celular [22]. Un punto adecuado para resolver una infección por estos parásitos, es bloquear alguna de las enzimas de la glucólisis para impedir la generación de energía [23,24,25,26].*

*Se propuso a la Triosafosfato isomerasa (TPI) como enzima modelo para demostrar la validez de la propuesta. La TPI es una enzima clave en la generación de la energía del parásito y presenta una composición de aminoácidos diferente en el parásito y en el hospedero. Específicamente, existe una cisteína en la posición 14 en la TPI de T. brucei, mientras que en la TPI de humano y de otros mamíferos existe una metionina. Esta cisteína 14 influye significativamente en la estabilización de la estructura de la enzima como se demuestra por la inactivación con el reactivo para grupos sulfhidrilo, el MMTS (Metil Metano tiosulfonato) [21,27]. Ya que la cisteína 14 forma parte del contacto entre las dos subunidades, es muy probable que las alteraciones producidas por el MMTS perturben las interacciones que mantienen la estabilidad del dímero.*

*Los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteínas de péptidos y proteínas son generalmente los más reactivos de todas las cadenas laterales de los aminoácidos bajo condiciones fisiológicas normales. Estos pueden ser fácilmente alquilados, acilados, arilados, oxidados y generalmente forman complejos con muchos iones de metales pesados [28].*

*En un trabajo posterior se obtuvo la inhibición específica de la TPI de especies que poseen una cisteína en la posición 217: conejo, pollo y Schizosaccharomyces pombe [29]. Esta cisteína localizada como aminoácido "blanco" fué modificada por un reactivo para grupos sulfhidrilo, el fenil tolueno tiosulfonato (PTTS), que forma fenildisulfuros y que inhibe totalmente la actividad de la TPI de estas tres especies. En este trabajo se demostró que, excepto por aquellas TPis que tienen una cisteína 14, el PTTS es un inhibidor selectivo de enzimas homólogas que poseen una cisteína 217, o en una posición equivalente a la cisteína 217 de la TPI de conejo. En la Tabla III se muestra la posición de cisteínas de la TPI de varias especies.*

<b>Especie</b>	<b>Cisteínas</b>			
<b><i>T. brucei</i></b>	14	40	126	217
<b><i>Levadura</i></b>		42	126	
<b><i>S. pombe</i></b>			126	217
<b>Pollo</b>	41	66	126	217
<b>Conejo</b>	41	66	86	126 217
<b>Humano</b>	41	66	86	126 217

**Tabla III. Posición de cisteínas de la TPI de diferentes especies.**

La posición de esta cisteína en el cristal de la TPI de pollo [14] muestra que se encuentra lejos de la interfase y del sitio activo y que es relativamente inaccesible al solvente, por lo que la derivatización de esta cisteína por el PTTS causa perturbaciones estructurarles algo sutiles, ya que únicamente se observaron alteraciones en la cinética. En las TPIs que tienen Cys 217, el MMTS el cual produce metil disulfuros, afecta de manera diferente, por ejemplo: en la enzima de pollo no produce ninguna inhibición, la de conejo se inhibe cerca del 25% y la de *S. pombe* se inhibe del 40-50% además, en estas tres enzimas el MMTS protege contra la fuerte acción inhibitoria del PTTS.

Estas observaciones sugieren que para obtener un inhibidor especie-específico de las TPIs que tengan una Cys 217, es necesario inhibir a la enzima con un grupo relativamente grande (un fenilo y no con uno metilo), y que cuando se usan aminoácidos no conservados como blanco es necesario buscar un grupo que produzca la respuesta deseada.

La localización de aminoácidos no conservados esenciales en una enzima es de gran utilidad para el diseño de inhibidores especie-específicos [21,29].

## **II. ANTECEDENTES**

*Algunos estudios han intentado diseñar fármacos especie-específicos enfocándose en las estructuras tridimensionales de enzimas homólogas. La estructura tridimensional de enzimas homólogas está generalmente bien conservada especialmente en el sitio activo, aunque la secuencia de aminoácidos a veces sea muy diferente. El Dr. Gómez-Puyou y col. [21] han propuesto que si un aminoácido no conservado es fundamental para la función o estabilidad de una enzima de una especie en particular, es posible inhibir únicamente la enzima de esa especie usando a ese aminoácido como "blanco".*

*De acuerdo a esta hipótesis se localizó en la TPI de T.brucei a la cisteína 14 como un aminoácido blanco, siendo derivatizada por el metil metano tiosulfonato (MMTS). Posteriormente se obtuvo la inhibición específica de la TPI de especies que poseen una cisteína en la posición 217: conejo, pollo y S.pombe [29].*

*El interés por purificar la TPI de S.pombe y tomarla como enzima modelo es porque posee sólo dos cisteínas: la 126, altamente conservada y que forma parte del sitio activo, y la 217 que presentan la mayoría de los mamíferos y que servirá para caracterizar de manera detallada la inhibición en la cisteína 217 por derivatización del PTTS. Se ha reportado que los organismos que tienen altos niveles de actividad glucolítica, incluyendo a las levaduras productoras de etanol como Saccharomyces cerevisiae y S.pombe, cerca del 2% del total de la proteína soluble puede ser TPI. A partir de células de S.cerevisiae se ha obtenido un alto rendimiento de purificación de la TPI [39]. Conviene señalar que el gen que codifica para la TPI de S.pombe y S.cerevisiae respectivamente son casi idénticos en tamaño y con un 59% de similitud en sus secuencias [30].*

*El alto rendimiento de purificación de la TPI obtenido en levadura y el grado de similitud que existe entre ambas especies es suficiente para esperar un alto rendimiento en la purificación de la TPI de S. pombe partiendo de un extracto de células.*

*La TPI de humano pura ofrece la posibilidad de un estudio comparativo con la TPI tripanosomal para diseñar inhibidores especie-específicos que produzcan inactivación enzimática selectiva de organismos parásitos, pero sin dañar la actividad catalítica de la TPI del hospedero.*

### **III. OBJETIVOS**

**1.- Purificar la Triosafosfato Isomerasa (TPI) de Schizosaccharomyces pombe y de humano.**

**2.- Utilizar a la TPI de S. pombe como enzima modelo para caracterizar de manera detallada la participación de la cisteína 217 por derivatización del fenil tolueno tiosulfonato (PTTS).**

**3.- Realizar los experimentos de inhibición con la enzima purificada de humano con la finalidad de establecer una comparación entre especies dañinas para diseñar fármacos que causen su inactivación selectiva y que el daño tóxico para el hospedero sea mínimo.**

## **IV. MATERIALES Y METODOS**

### **IV.1 PURIFICACION DE LA TPI DE S. POMBE**

#### ***Extracción***

*Se sembraron 2 litros de células de S. pombe (cepa 1-343) en medio YPD (glucosa 2%, extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 1% y agar 2%), se hicieron previamente 2 precultivos de 10 ml y de 100 ml respectivamente, y se dejaron crecer por 24 horas a 30°C en agitación constante a 250 rpm. Se cosecharon las células a 2 mil rpm durante 30 minutos y después el pellet se resuspende en agua destilada y se centrifugo por 30 minutos (se repite 1 vez más).*

*Se obtuvo el peso húmedo y se resuspendió en buffer de extracción 1:1 (peso/volumen). El buffer contiene Tris 0.1 M, KCl 0.15 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y TLCK (50 µg/ml) pH=7.5.*

*La pared de las células se rompió mecánicamente con un Bead-Beater (10 ciclos/min), manteniendo siempre la temperatura a 4°C con hielo y etanol. El pH se ajusta a 7.5 después de haber lisado las células. Posteriormente se centrifugaron a 15,000 rpm por 30 minutos para proceder con su purificación.*

## **Purificación**

*La purificación de esta enzima consistió principalmente en hacer precipitaciones diferenciales con sulfato de amonio y en pasar la proteína por columnas de filtración en gel y de intercambio iónico (Figura 3).*

*El sobrenadante obtenido en la extracción se precipitó con sulfato de amonio entre el 40% y 80%. El precipitado que se obtuvo, se resuspendió en un volumen mínimo (aproximadamente de 10 ml) de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM,  $\text{NaN}_3$  1 mM, NaCl 50 mM y TLCK (50  $\mu\text{g/ml}$ ) pH=8.0 y se dializó contra 2 litros del mismo buffer. Posteriormente se aplicó a una columna de filtración en gel (Sephadex-G100) equilibrada con el mismo buffer. La proteína que eluyó de la columna con actividad de TPI se concentró hasta un volumen de 9.5 ml con centripep-10 y se dializó contra 2 litros de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, y  $\text{NaN}_3$  1 mM pH=8.0, para posteriormente pasarla por una columna de intercambio aniónico (DEAE-Biogel) previamente equilibrada con el buffer. Se aplicó un gradiente de NaCl de 0-0.5 M para despegar a la proteína.*

*La muestra obtenida de esta columna se concentró a un volumen de 9 ml por medio de membranas de Amicon PM-10 y se dializó contra 2 litros de TEA 50 mM, EDTA 0.2 mM,  $\text{NaN}_3$  0.1 mM y PMSF 0.1 mM pH=8.3. La muestra se corrió en una segunda cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose (fast-flow)) previamente equilibrada con el buffer y al pH mencionados. Después de concentrarse en Amicon, la muestra se aplicó nuevamente por la columna de Q-Sepharose (fast-flow) pero equilibrada con TEA 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM,  $\text{NaN}_3$  0.1 mM a pH=7.5. En ambas columnas se aplicó un gradiente de 0-0.5 M de NaCl para eluir a la proteína.*

*Extracción de células de S. pombe (cepa 1-343)*

↓  
*Rompimiento mecánico con Bead-Beater*

↓  
*Centrifugación*

↓  
*Obtención del extracto crudo*

↓  
*Precipitación diferencial con  $(NH_4)_2 SO_4$*

↓  
*Sephadex-G 100 pH=8.0*

↓  
*DEAE-Biogel pH=8.0*  
*(Gradiente 0-0.5 M NaCl)*

↓  
*Q-Sepharose (fast-flow) pH=8.3*  
*(Gradiente 0-0.5 M NaCl)*

↓  
*Q-Sepharose (fast-flow) pH=7.5*  
*(Gradiente 0-0.5 M NaCl)*

***Figura 3. Método de purificación de la TPI de S. pombe.***

*La muestra que eluyó de ésta columna se concentró en centrifugación hasta un volumen de 1.5 ml, con la que se hicieron los experimentos de inhibición con PTTS y MMTS.*

## **IV.2 PURIFICACION DE LA TPI DE HUMANO**

### ***Transformación y sobre-expresión de la TPI de humano***

*Las células de E.coli (cepa BL21DE3) en su fase de crecimiento logarítmica, se cosecharon y se trataron con 100 mM de CaCl<sub>2</sub> dejándolas incubando durante una hora en hielo para hacerlas competentes para su transformación con el plásmido pARHS-htim (donado por Martial, J.A. del laboratorio de Biología Molecular y de Genética de la Universidad de Liege, Bélgica) para después darles un choque térmico a 42° C por 1:30 minutos. Las células una vez transformadas se plaquean en medio Luria Bertani (LB) con 100 µg/ml de ampicilina [4].*

*Se escogieron las mejores colonias y se crecieron en un cultivo de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina hasta obtener una absorbencia a 590 nm = 1. En este momento se les adiciona IPTG a una concentración final de 1 mM. Continúan en el cultivo durante 12 horas más y se procede a cosecharlas [4]. (Se agradece a la M. en I.B.B. Emma Saavedra-Lira del Laboratorio del Dr. Ruy Pérez-Montfort del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM haber proporcionado las células transformadas de E.coli que sobre-expresan la TPI de humano).*

## **Extracción**

*Partiendo de 1 litro de células que sobre-expresan la TPI de humano se resuspendieron en buffer de extracción Tris 20 mM, EDTA 0.2 mM,  $\text{NaN}_3$  0.1 mM, PMSF 0.1 mM, NaCl 100 mM pH=8.0 (BUFFER A). Las células se rompieron con tres ciclos en la French Press, para después centrifugarlas a 12,000 rpm por 20 minutos y proseguir con su purificación.*

## **Purificación**

*La purificación de la TPI de humano se realizó principalmente combinando métodos de precipitación diferencial y cromatografías de filtración en gel y de intercambio iónico (Figura 4), basándose en los protocolos utilizados por Mande, C. et.al [4] y Lu, H.S. et.al. [37].*

*El sobrenadante obtenido de la extracción se precipitó diferencialmente del 60% al 90% con sulfato de amonio. El precipitado se resuspendió en un volumen mínimo (aproximadamente 5 ml) de BUFFER A y se dializó contra 2 litros de este buffer. La muestra se filtró en una columna de Sephadex-G100 (2.6 X 100 cm) previamente equilibrada con el mismo buffer.*

*La TPI que eluyó de la columna se concentró por medio de membranas de Amicon PM-10 y se dializó contra 2 litros de BUFFER A sin NaCl 100 mM (BUFFER B). Esta muestra concentrada se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose (fast-flow)) equilibrada con el BUFFER B. Se aplicó un gradiente de NaCl de 0-0.3 M para eluir a la enzima.*

*Transformación y sobre-expresión de las células de E. coli (cepa BL21DE3) con el plásmido pARHS-htim.*



**Figura 4. Método de purificación de la TPI de humano.**

Una vez concentrada la proteína se precipitó al 70% con sulfato de amonio; la proteína se resuspendió y se dializó en BUFFER B pero a pH=8.3 para pasarla nuevamente por la columna de Q-Sepharose (fast-flow) previamente equilibrada con el BUFFER B; se usó el mismo gradiente para eluir a la enzima.

### **IV.3 EFECTO DEL PTTS Y DEL MMTS EN LA TPI DE S. POMBE Y HUMANO**

El efecto del PTTS y del MMTS sobre la actividad de la TPI de S. pombe, se midió incubando 0.085 mg/ml de la enzima en TEA 100 mM, EDTA 10 mM pH=7.4 con diferentes concentraciones de tiosulfonatos. Se utilizó un rango de 0-250  $\mu$ M. En vista de la solubilidad relativamente baja del MMTS y del PTTS en el buffer, fue necesario disolverlos en DMSO al 2.5%. Después de 1 hora de incubación se tomó una alícuota para medir la actividad. El efecto del MMTS y PTTS sobre la actividad de la TPI de humano se midió siguiendo el mismo protocolo que con la TPI de S. pombe, excepto que se usó una concentración de proteína de 0.01 mg/ml.

En el experimento de actividad contra tiempo, la TPI de S. pombe se incubó en las mismas condiciones del experimento anterior pero a una concentración fija de los tiosulfonatos (250 $\mu$ M). A los tiempos que se muestran en los resultados, se tomó una alícuota para medir la actividad.

En este mismo experimento pero con la TPI de humano, se usaron las mismas concentraciones de los tiosulfonatos pero la concentración de enzima fué de 0.01 mg/ml, utilizando los mismos intervalos de tiempo que en S. pombe se tomó una alícuota para medir la actividad.

*La TPI de levadura sirvió como control en los experimentos con distintas concentraciones de MMTS y de PTTS usando una concentración de 0.01 mg/ml de TPI.*

#### **IV.4 DETERMINACION DE ACTIVIDAD**

*La actividad de ambas enzimas se determinó siguiendo el decremento en la absorbencia del NADH a 340 nm a 25 °C. La mezcla de reacción contiene TEA 100/EDTA 10 pH=7.4, 1 mM de gliceraldehído 3-fosfato, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (20 µg/ml) y 0.2 mM de NADH en un volumen final de 1 ml.*

*Para la determinación de la Km y de la Vmax se varió la concentración de G<sub>3</sub>P de 0.08 a 2.5 mM.*

#### **IV.5 DETERMINACION DE PROTEINA**

*La concentración de proteína de S. pombe y de humano se midió con el método de Lowry [33], usando albúmina de bovino como estándar. En el caso de las columnas equilibradas con TEA/NaOH, la concentración de proteína se determinó con el método de Bradford [34], ya que el TEA interfiere con el folín si se usa el método de Lowry.*

*La concentración de TPI de humano pura, se determinó por absorbencia a 280 nm utilizando un índice de absorbencia  $A_{1\%}^{1\text{cm}}$  de 12.9 [37].*

#### **IV.6 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECILSULFATO DE SODIO (SDS)**

*Se hicieron geles de poliacrilamida con SDS al 12% usando el método de Laemmli [35]. Las muestras se colocaron en el gel con una solución desnaturalizante (1 ml de Tris-HCl pH=6.8 0.5 M, glicerol 1.6 ml, SDS (10%) 1.6 ml,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.4 ml, azul de bromofenol (0.1%) 0.2 ml, H<sub>2</sub>O desionizada 3.2 ml) dejándolas un tiempo de corrida de 1 hora 40 minutos a 125 V. El gel con la TPI de humano se tiñó con Azul de Coomassie R-250 al 0.1 % en 10% de ácido acético por 5 horas. Se lavo con ácido acético al 10% y etanol al 40% para retirar el exceso de Azul de Coomassie. El gel con la TPI de S. pombe se tiñó siguiendo la técnica de tinción con plata [36].*

## **V. RESULTADOS**

### **V.1 PURIFICACION DE LA TPI DE S. POMBE**

*En este trabajo se purificó la triosafosfato isomerasa de S. pombe y de humano. Como se mencionó en la metodología, la purificación se realizó combinando métodos de precipitación diferencial y cromatografías de filtración en gel y de intercambio iónico. El protocolo utilizado para la purificación de la TPI de S.pombe dió como resultado una muestra parcialmente pura con dos contaminantes de alto peso molecular tal y como lo muestra el gel de poliacrilamida con SDS (Figura 5).*

#### **Fraccionamiento con Sulfato de Amonio**

*Para tratar de obtener un buen rendimiento en la purificación se probó primeramente establecer un intervalo de fraccionamiento con sulfato de amonio. Como se observa en la tabla IV, el extracto crudo se dividió en dos alícuotas iguales y se precipitaron al 45% y 60% respectivamente con sulfato de amonio, obteniéndose un mayor rendimiento en el precipitado al 45% (32.7%). En la segunda parte del fraccionamiento, se obtuvo un aumento en la actividad específica en el precipitado al 80%, comparada con el precipitado al 65 %.*

	<b>EXTRACTO</b>	<b>CRUDO</b>	
<b>ACTIVIDAD TOTAL</b> ( $\mu\text{molmin}^{-1}$ )	<b>PROTEINA TOTAL</b> (mg)	<b>ACTIVIDAD ESPECIFICA</b> ( $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )	<b>RENDIMIENTO</b> (%)
1,967.6	649.4	3.03	100

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	45%	60%
<b>PROTEINA TOTAL</b> (mg)	84.4	24.5
<b>ACTIVIDAD TOTAL</b> ( $\mu\text{molmin}^{-1}$ )	634.9	158.8
<b>ACTIVIDAD ESPECIFICA</b> ( $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )	7.5	6.5
<b>RENDIMIENTO</b> (%)	32.7	8.1

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	65%	80%
<b>PROTEINA TOTAL</b> (mg)	85	13.6
<b>ACTIVIDAD TOTAL</b> ( $\mu\text{molmin}^{-1}$ )	467.5	170
<b>ACTIVIDAD ESPECIFICA</b> ( $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )	5.5	12.5
<b>RENDIMIENTO</b> (%)	23.7	8.63

**Tabla IV. Fraccionamiento con sulfato de amonio utilizado para obtener el mejor rendimiento en la TPI de *S. pombe*.**

*En base a estos datos se decidió utilizar un fraccionamiento del 40% al 80% con el fin de eliminar la mayor cantidad de contaminantes y asegurar que la enzima*

precipite en la fracción del 80% de saturación para tener así una menor pérdida de nuestra proteína y una ganancia en su actividad específica.

### **Alternativas para obtener un Alto Rendimiento**

Una vez establecido el intervalo de fraccionamiento con sulfato de amonio se decidió utilizar distintas cromatografías de intercambio aniónico para saber con cuál se obtenía un mayor rendimiento. A partir de la secuencia de aminoácidos de la TPI de *S. pombe* [30] se calculó el pI (6.53), y se comparó con el de levadura (5.86) para determinar así el tipo de intercambiador que se iba a emplear. Se utilizaron primero unas columnas de DEAE-Biogel con diferentes pHs=7.5 y 8.0, y se aplicó un gradiente de 0-0.5 M de NaCl para eluir a la enzima. Las fracciones que presentaron actividad de TPI se colectaron; se concentraron en centripep-10 y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

	<b>PROTEINA TOTAL (mg)</b>	<b>ACTIVIDAD TOTAL (<math>\mu\text{mol min}^{-1}</math>)</b>	<b>ACTIVIDAD ESPECIFICA (<math>\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b>RENDI- MIENTO (%)</b>
<b>EXTRACTO CRUDO</b>	177.3	1,791	10	100
<b>FRACCIONAMIENTO (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40-80%)</b>	105.2	1,350	13	75
<b>SEPHADEX-G 100 pH=8.0</b>	30.4	1,083	36	61
<b>DEAE-BIOGEL pH=8.0</b>	1.46	751	514	41

**Tabla V. Protocolo utilizado para obtener un mayor rendimiento de la TPI de *S. pombe* y eliminar el contaminante de alto peso molecular.**

Los resultados de la electroforesis revelaron la banda correspondiente a la TPI de *S. pombe* ( $\approx 26$  KDa) más otros contaminantes de alto peso molecular (no se muestra).

Con estos resultados se consideró utilizar una columna de filtración en gel como Sephadex-G 100 pH=8.0. El orden de las columnas se invirtió, debido a que al pasar la muestra por la columna de filtración después de la de intercambio aniónico la enzima se inactivaba (datos no mostrados).

En la Tabla V se muestran los resultados obtenidos con este protocolo, donde se obtuvo un buen rendimiento de purificación. Sin embargo, al correr las muestras en un gel de poli(acrilamida) con SDS, se observa la banda correspondiente al monómero de la TPI de *S. pombe* (26 KDa.) y un contaminante de peso molecular de 45 KDa. (Este gel no se muestra).

Con el fin de concentrar la proteína, se decidió hacer una precipitación con sulfato de amonio al 70% de la muestra que eluye de la columna de filtración en gel. Como se observa en la Tabla VI la precipitación con sulfato de amonio de la enzima parcialmente pura produce una disminución en la actividad específica de 10 veces y más de 20 veces en el rendimiento.

<b>FRACCION</b>	<b>PROTEINA TOTAL (mg)</b>	<b>ACTIVIDAD TOTAL (<math>\mu\text{molmin}^{-1}</math>)</b>	<b>ACTIVIDAD ESPECIFICA (<math>\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b>RENDI- MIENTO (%)</b>
<b>EXTRACTO CRUDO</b>	210	11,240	54	100
<b>FRACCIONAMIENTO (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40-80%)</b>	57.2	6,820	120	61
<b>SEPHADEX-G100pH=8.0</b>	48.3	5,352	111	47
<b>pp. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (70%)</b>	23.75	250	11	2.2

**Tabla VI. Protocolo que demuestra la sensibilidad de la TPI de *S. pombe* al sulfato de amonio.**

*La inactivación por sulfato de amonio también se observó en la muestra que eluyó de la columna de DEAE-Biogel. Estos datos muestran que la enzima parcialmente pura es extremadamente sensible a esta precipitación.*

#### ***Alternativas para eliminar el contaminante de alto peso molecular.***

*Con el fin de eliminar el contaminante de alto peso molecular, se decidió utilizar diferentes columnas de cromatografía tanto de filtración en gel como de intercambio iónico. Una de ellas fué la de Sephacril S-200 pH=8.0 de filtración en gel cuyo rendimiento final fué de 26%, sin embargo, los contaminantes no se pudieron eliminar (datos no mostrados). Se consideró utilizar otra columna de filtración en gel (Sephadex-G 100 de 2.6 X 100 cm) a pH=7.5 y con TEA 100 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM y  $\text{NaN}_3$  0.1 mM con la cual el rendimiento aumentó pero el contaminante no se logró remover.*

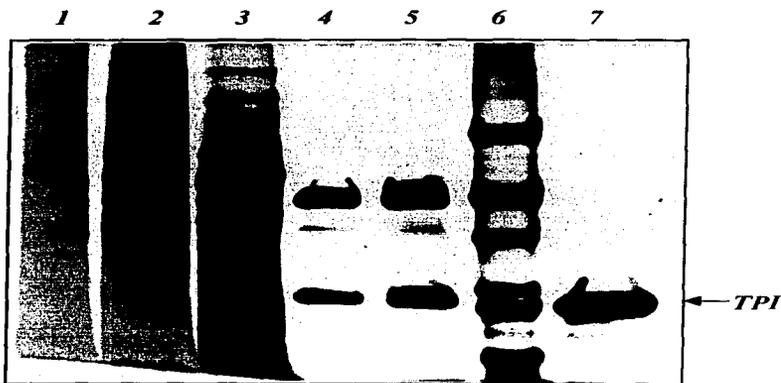
*Como otra alternativa se usó una columna de intercambio aniónico fuerte, tal como Q-Sepharose (fast-flow) a diferentes pH=8.3 y 7.5 consecutivamente. La ventaja de utilizar esta columna variando el pH fué que se consiguió una actividad específica mayor que la obtenida en los protocolos anteriores pero sin haber logrado eliminar el contaminante.*

*Al correr las muestras de TPI obtenidas de este protocolo en el gel de poliacrilamida-SDS se puede ver la banda de la TPI que migra entre el tripsinógeno de páncreas de bovino (24 KDa.) y la anhidrasa carbónica (29 KDa.), confirmando que dicha banda corresponde al monómero de la TPI ( $\approx 26$  KDa.), y*

REACCION	PROTEINA TOTAL ( $\mu$ g)	ACTIVIDAD TOTAL ( $\mu$ mol min <sup>-1</sup> )	ACTIVIDAD ESPECIFICA ( $\mu$ mol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	RENDIMIENTO (%)
EXTRACTO CRUDO	941	8,787	9	100
FRACCIONAMIENTO (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (40-80%)	391.5	6,890	18	78.4
SEPHADEX-G 100 pH=8.0	224	3,911	18	44.5
DEAE-BIOGEL pH=8.0	22	3,431	155	39
Q-SEPHAROSE (FAST-FLOW) pH=8.3	3.3	2,342	714	26.6
Q-SEPHAROSE (FAST-FLOW) pH=7.5	1	1,025	946	11.6

Tabla VII. Tabla de purificación de la Triosafosfato isomerasa de *S. pombe*.

una banda contaminante que tiene un peso de  $\approx 45$  KDa. (Figura 5). También se alcanza a ver una banda muy tenue por debajo de la banda gruesa, y que tiene un peso aproximado de 40 KDa. Todo esto sugiere que el contaminante presenta propiedades muy parecidas si no es que iguales a las de la TPI en cuanto a fuerza iónica se refiere.



**Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (12%) de la TPI de *S. pombe*. 1) Extracto Crudo, 2) Fraccionamiento 40%-80%, 3)Sephadex-G100 pH=8.0, 4) DEAE-Biogel pH=8.0, 5) Q-Sepharose (fast-flow) pH=8.3, 6) Estándares de Peso Molecular (14-66KDa), 7) TPI de conejo.**

*Con los parámetros establecidos en la tabla VII se llega a la conclusión de que el orden de las columnas influyó significativamente para obtener un aumento considerable en la actividad específica ( $946 \mu\text{mol}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ). Conviene señalar que las condiciones establecidas en la columna DEAE-Biogel favorecen a que la enzima se purifique casi totalmente, quedando solamente el contaminante de alto peso molecular. Un dato importante que hay que mencionar es que cada vez que se purificaba, al pasar la proteína por la columna de Sephadex-G 100 la enzima, que era seguida por actividad, siempre eluía en las mismas fracciones (14 a 25), y de la columna de intercambio aniónico DEAE-Biogel la enzima se detectó entre las fracciones 22 a 54, por lo que en este aspecto, la enzima en ambas columnas tenía un patrón de elución reproducible.*

*Otro aspecto muy importante que influyó de manera definitiva en obtener un buen rendimiento fué el crecimiento de las células, que es uno de los pasos iniciales. Fué determinante dejar un tiempo fijo de 24 horas tanto en los precultivos como en el cultivo, ya que si se dejaban tiempos menores o mayores no se obtenía un peso húmedo adecuado, ya que las células estaban muy poco crecidas o demasiado viejas, por lo que el rendimiento bajaba drásticamente evitando así proseguir con la purificación.*

## V.2 PURIFICACION DE LA TPI DE HUMANO

Con respecto al protocolo utilizado en la purificación de la TPI de humano, dió como resultado una preparación con un alto grado de pureza (TABLA X).

Los datos de la tabla VIII muestran un procedimiento en el cual se obtuvo un rendimiento final del 16 %, con una actividad específica de  $5,313 \mu\text{molmin}^{-1} \text{mg}^{-1}$  pasando la enzima por una columna de filtración en gel (Sephadex-G100 pH=8.0 de  $2.6 \times 100 \text{ cm}$ ) y después por una Q-Sepharose (fast-flow) pH=8.3 de intercambio aniónico fuerte. Sin embargo, los resultados de la electroforesis revelan la banda de la TPI de humano ( $\approx 26.5 \text{ KDa.}$ ) junto con un contaminante de menor peso molecular ( $\approx 20 \text{ KDa.}$ ) (Este gel no se muestra).

<b>FRACCION</b>	<b>PROTEINA TOTAL (mg)</b>	<b>ACTIVIDAD TOTAL (<math>\mu\text{molmin}^{-1}</math>)</b>	<b>ACTIVIDAD ESPECIFICA (<math>\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b>RENDI- MIENTO (%)</b>
<b>EXTRACTO CRUDO</b>	<b>434</b>	<b>403,223</b>	<b>928.5</b>	<b>100</b>
<b>FRACCIONAMIENTO (<math>\text{NH}_4</math>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (60-90%)</b>	<b>39</b>	<b>187,395</b>	<b>480</b>	<b>46</b>
<b>SEPHADEX-G100 pH=8.0</b>	<b>20.6</b>	<b>86,106</b>	<b>4,193</b>	<b>21</b>
<b>Q-SEPHAROSE (FAST-FLOW) pH=8.3</b>	<b>13</b>	<b>65,830</b>	<b>5,313</b>	<b>16</b>

**Tabla VIII. Protocolo de purificación de la TPI de humano.**

Con el fin de eliminar el contaminante de bajo peso molecular se decidió pasar la muestra primero por una columna de Q-Sepharose (fast-flow) a pH=8.0 y después por una de pH=8.3 (Tabla X). Con este protocolo de purificación se logró

obtener una enzima completamente pura, y en grandes cantidades (21.5 mg/ml), como se observa en el gel de la figura 6 y en la Tabla X.

La actividad específica final fue de  $5,716 \mu\text{molmin}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Los resultados obtenidos por este método de purificación son muy parecidos a los datos previamente reportados de la TPI de placenta de humano ( $6,900 \mu\text{molmin}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) [35].

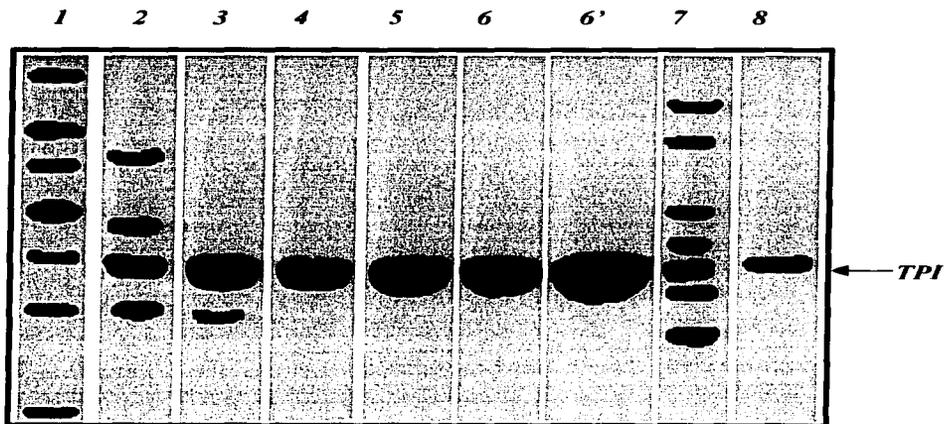
Una vez obtenida la enzima completamente pura se prosiguió a calcular sus parámetros cinéticos tales como la  $K_m$  y la  $V_{max}$  (tabla XI). Estos valores son prácticamente iguales a los reportados para conejo con una  $K_m=0.68$  y una  $V_{max}=9,862 \mu\text{molmin}^{-1} \text{mg}^{-1}$  [29]. Los valores reportados en la TPI de hígado de humano [31] y en la TPI recombinante de humano [4] para la  $K_m$  son 0.43 y 0.49 respectivamente, aunque no son iguales caen dentro del intervalo de los valores esperados.

	<i>Valor</i>
<i><b><math>K_m</math> (mM)</b></i>	<b>0.632</b>
<i><b><math>V_{max}(\mu\text{molmin}^{-1} \text{mg}^{-1})</math></b></i>	<b>8,745.5</b>

**Tabla XI. Parámetros cinéticos de la TPI de humano**

<b>FRACCION</b>	<b>PROTEINA TOTAL (mg)</b>	<b>ACTIVIDAD TOTAL (<math>\mu</math>mol min<sup>-1</sup>)</b>	<b>ACTIVIDAD ESPECIFICA (<math>\mu</math>mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>RENDIMIENTO (%)</b>
EXTRACTO CRUDO	670.5	481,227	717	100
FRACCIONAMIENTO (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (60-90%)	72.6	285,426	3,929	59
SEPHADEX-G 100 pH=8.0	61.5	258,683	4,206	54
Q-SEPHAROSE (FAST-FLOW) pH=8.0	37.6	223,094	5,936	46
PRECIPITADO CON (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 70%	28	192,153	6,863	40
Q-SEPHAROSE (FAST-FLOW) pH=8.3	21.5	122,615	5,716	26

**Tabla X. Tabla de purificación de la Triosafosato isomerasa de humano.**



**Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de la TPI de humano. 1) Extracto Crudo, 2) Fraccionamiento 60%-90%, 3) Sephadex-G 100 pH=8.0, 4) Q-Sepharose (fast-flow) pH=(8.0), 5) Precipitación 70% con Sulfato de Amonio, 6 y 6') Q-Sepharose (fast-flow) pH=8.3, 7) Estandares de Peso Molecular, 8) TPI *T. brucei*.**

### **V.3 EFECTO DEL PTTS Y DEL MMTS EN LA TPI DE S. POMBE Y DE HUMANO.**

*Con el propósito de añadir una comprobación adicional a la hipótesis propuesta por el Dr. Gómez-Puyou y colaboradores [21] de que es posible obtener un inhibidor especie-específico de enzimas homólogas teniendo como blanco residuos de aminoácidos no conservados que sean necesarios para mantener la estabilidad y/o catálisis de la enzima; se hicieron los experimentos de inhibición con dos tiosulfonatos; el fenil tolueno tiosulfonato o PTTS y el metil metano tiosulfonato o MMTS. Estos compuestos derivatizan a residuos de cisteínas formando fenil y metil disulfuros respectivamente.*

*El interés por trabajar con la TPI de S. pombe como enzima modelo se debe a que sólo presenta 2 cisteínas: la 126, altamente conservada y que forma parte del sitio activo y la 217 que presentan la mayoría de los mamíferos. Esta enzima sirvió para caracterizar de manera detallada la participación de la cisteína 217 en la inhibición de la TPI por modificación de esta cisteína por el PTTS [29].*

*La TPI de humano sirvió no sólo como control, sino que se repitieron algunos de los experimentos de inhibición hechos en la TPI de conejo con ambos compuestos (PTTS y MMTS) [29]. Esta enzima había servido como modelo de la TPI de mamíferos en estos experimentos antes de haberse obtenido la enzima sobre-expresada y de haberse publicado la estructura del cristal de la TPI de humano [4]. La importancia de realizar estos experimentos con la TPI de humano radica sobre todo en que se busca causar la inactivación enzimática selectiva de organismos dañinos tales como parásitos, pero sin dañar la actividad catalítica de la TPI del organismo hospedero.*

### ***Efecto del PTTS y MMTS en la actividad de la TPI de S. pombe***

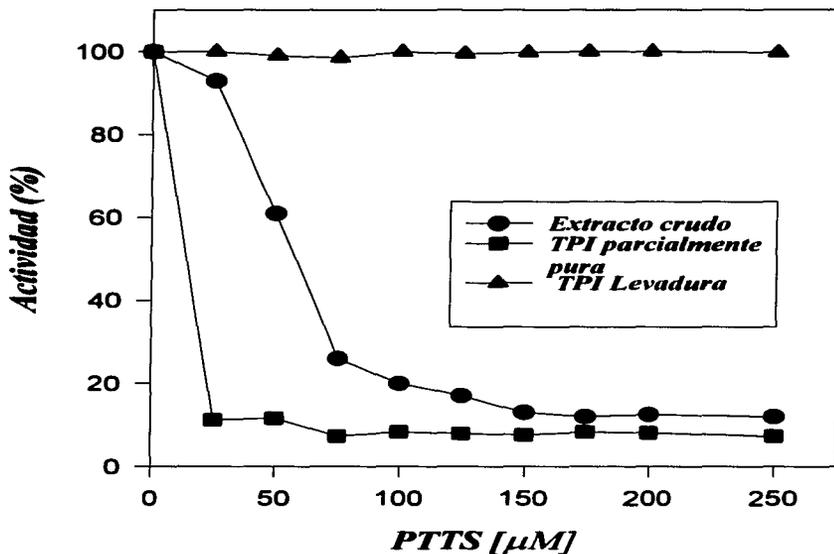
*Los experimentos de inhibición con PTTS en la TPI de S. pombe parcialmente pura mostraron un rápido decremento de la actividad usando un intervalo de concentraciones del PTTS de 0 a 250  $\mu\text{M}$ , siendo 25  $\mu\text{M}$  la concentración que se requiere para que la inhibición sea casi total (93%). En comparación con el extracto crudo, éste se inhibió casi totalmente a una concentración de PTTS de 100  $\mu\text{M}$  (Gráfica I).*

*Estos resultados sugieren que entre ambas muestras hay una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de pureza, ya que la sensibilidad al PTTS de la enzima parcialmente pura incrementa varias veces con respecto a la del extracto crudo.*

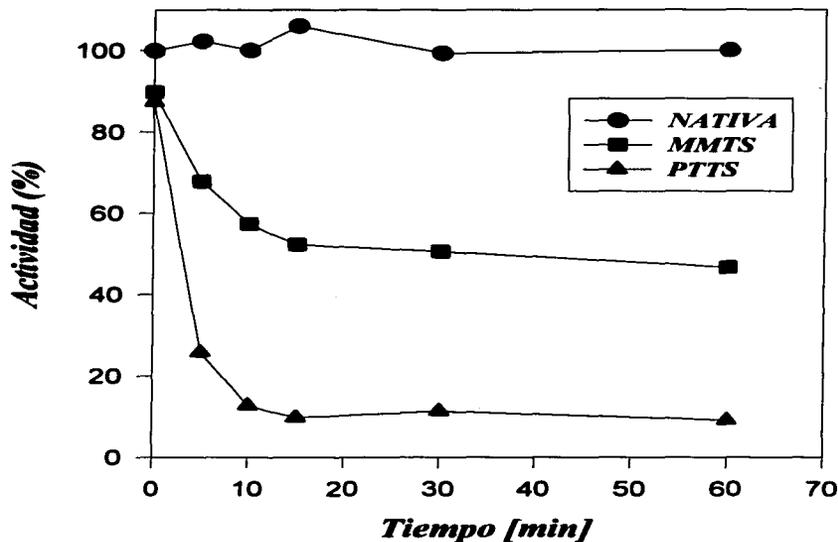
*La TPI de levadura utilizada como control en este experimento no presenta ningún efecto de inhibición por el PTTS. La TPI de levadura presenta la cisteína 42 y 126, las cuales no son derivatizadas por el PTTS [29].*

*Las curvas de actividad de la TPI de S. pombe en presencia de una concentración fija de PTTS (250  $\mu\text{M}$ ) y a los tiempos que se indican en la gráfica II muestran que el PTTS inactiva a la enzima rápidamente, ya que hay un fuerte decremento de su actividad desde los 5 minutos (80%), y a los 10 minutos ya presenta una actividad residual casi nula.*

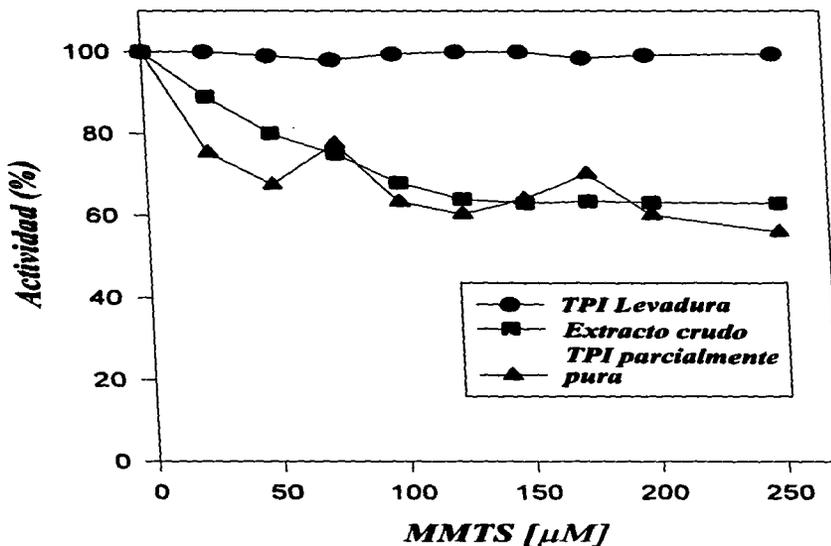
*En cuanto al efecto del MMTS a distintas concentraciones (0-250  $\mu\text{M}$ ), sobre la actividad de la TPI de S. pombe, se obtuvo una inhibición parcial del 40-50% tanto en el extracto crudo como en la enzima parcialmente pura a partir de una concentración de 50  $\mu\text{M}$  sin lograr incrementar la inhibición conforme la concentración de tiosulfonato aumentaba (Gráfica III).*



**Gráfica I. Efecto del PTTS en el extracto crudo y en la TPI parcialmente pura de *S. pombe*. La TPI (0.085 mg/ml) se incubó en TEA 100 mM, EDTA 10 mM (pH=7.4) a las concentraciones indicadas del tiosulfonato. Después de 1 hora de incubación se tomó una alícuota para medir la actividad. La TPI de levadura (0.01 mg/ml) siguió el mismo protocolo usándose como control experimental.**



**Gráfica II. Curva de inhibición contra tiempo. La TPI de *S. pombe* (0.085 mg/ml) fué incubada en TEA 100 mM, EDTA 10 mM (pH=7.4) con 250  $\mu$ M de los tiosulfonatos indicados. A los tiempos que se muestran se tomó una alícuota para medir la actividad.**



**Gráfica III. Efecto del MMTS en el extracto crudo y en la TPI parcialmente pura de *S. pombe*. La TPI (0.085 mg/ml) se incubó en TEA 100 mM, EDTA 10 mM (pH=7.4) a las concentraciones indicadas del tiosulfonato. Después de 1 hora de incubación se tomó una alícuota para medir la actividad. La TPI de levadura (0.01 mg/ml) siguió el mismo protocolo usándose como control experimental.**

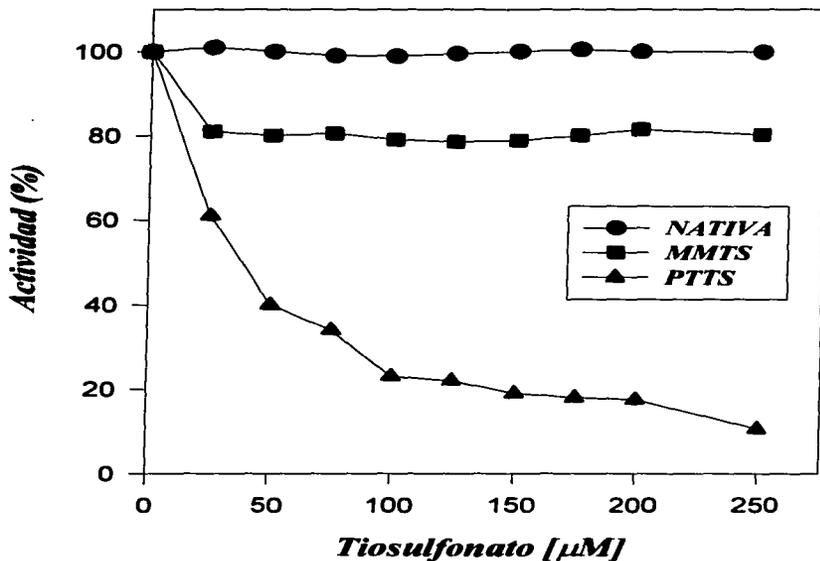
*Estos resultados de inactivación parcial con el MMTS sugieren que este reactivo no causa grandes alteraciones cinéticas, aunque el porcentaje obtenido es significativamente más alto que la inhibición que presentan otras TPIs con cisteína 217, como la de conejo con un 25% de inhibición, y la de pollo que no se inhibe [29]. La TPI de levadura que no presenta la cisteína 217 sirvió como control en este experimento, demostrando que el MMTS no tiene efecto en las Triosasfosfato isomerasas que carecen de cisteína 217, o que si lo hay no es muy considerable (Gráfica III).*

*La inactivación parcial producida por el MMTS también se vió en el experimento de inhibición contra tiempo (Gráfica II) utilizando una concentración fija de MMTS de 250  $\mu$ M. Se obtuvo un 40-50% de inhibición tanto en el extracto crudo como en la enzima parcialmente pura.*

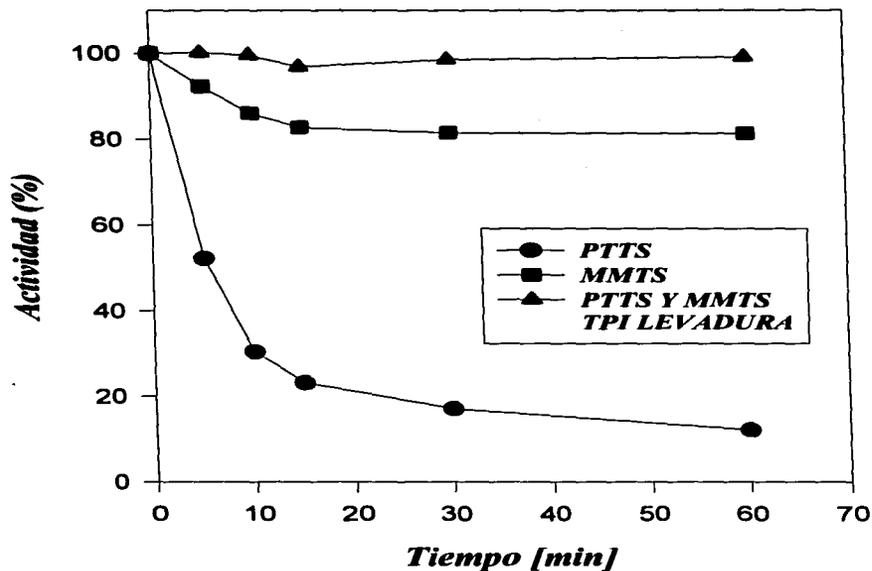
#### ***Efecto del PTTS y MMTS en la actividad de la TPI de humano***

*En cuanto a la TPI de humano se realizaron los mismos experimentos que con la TPI de S. pombe. La gráfica IV, muestra el efecto del PTTS en la TPI de humano incubada a distintas concentraciones de tiosulfonato y con las condiciones experimentales mencionadas en la metodología. Al exponer esta enzima al PTTS se observó una inhibición progresiva llegando hasta un 90% de inactivación. La enzima sin ser expuesta al PTTS sirvió como control en este experimento y mostró una actividad del 100%.*

*En la gráfica V se muestran los resultados obtenidos al incubar a la enzima a una concentración fija de PTTS (250  $\mu$ M), y después se midió la actividad a diferentes tiempos. El efecto que este tiosulfonato produce es una inhibición total de*



**Gáfica IV. Efecto del PTTS y del MMTS en la TPI de humano. Se siguió el mismo protocolo que con la TPI de *S. pombe*, excepto que se usó una concentración de 0.01 mg/ml de TPI.**



**Gráfica V. Curva de inhibición contra tiempo. La TPI de humano (0.01 mg/ml) fué incubada en TEA 100 mM, EDTA 10 mM (pH=7.4) con 250  $\mu$ M de los tiosulfonatos indicados. A los tiempos que se muestran se tomó una alícuota para medir la actividad. La TPI de levadura se tomó como control usando las mismas condiciones experimentales.**

la enzima (90%). La TPI de levadura se utilizó como control en este experimento, y demostró ser insensible al PTTS (Gráfica V).

Esta respuesta obtenida en la TPI de humano es la que se esperaba, ya que basándose en que la secuencia de aminoácidos se sabe que la TPI de humano es muy parecida a la TPI de conejo (98% de identidad) [4,10], y ambas tienen las mismas cisteínas. La inhibición obtenida con la TPI de humano y con la de conejo es la misma [29].

El experimento de inhibición de la TPI de humano incubada a distintas concentraciones de MMTS (Gráfica IV) demostró que esta enzima es muy poco sensible a dicho reactivo, ya que sólo llegó a inhibir su actividad en un 20%. El mismo efecto se vió en el experimento hecho a una concentración fija de MMTS (250  $\mu\text{M}$ ) e incubando a diferentes tiempos (Gráfica V). La TPI fué inhibida sólo parcialmente (20%), y el control utilizado en este caso, fué la TPI de levadura que no fué inhibida por este reactivo [21,29]. La misma respuesta se obtuvo en experimentos hechos previamente con la TPI de conejo [21,29].

## **VI. DISCUSION**

*El método de purificación de la TPI de S. pombe dió como resultado una fracción parcialmente pura de la enzima, como lo demuestra la electroforesis en SDS en donde aparece la banda de  $\approx 26$  KDa que corresponde al monómero de la TPI y una banda contaminante de  $\approx 45$  KDa. Considerando que en todas las repeticiones que se hicieron la cantidad de enzima recuperada era muy poca y el rendimiento siempre fué muy bajo se puede considerar la posibilidad de obtener una clona del gene de la TPI de S. pombe para que se pueda sobre-expresar en un vector. Cabe señalar que las dificultades contempladas en ésta purificación no se habían presentado en las purificaciones de TPI de otras especies, como son el caso de la TPI de T. brucei [10], pollo [11] y levadura [39].*

*Por otro lado, el método de purificación de la TPI de humano dió como resultado una fracción con un alto grado de pureza y un rendimiento del 26%. El gel de poliacrilamida-SDS muestra una sólo banda de  $\approx 26.5$  KDa. que corresponde al monómero de la TPI.*

*Los resultados obtenidos en los experimentos de inhibición en la TPI de S. pombe como en la TPI de humano indican que el MMTS es un inhibidor selectivo de las TPIs que tienen un residuo de cisteína en la posición 14 o en una posición equivalente, [21] y que a su vez carezcan de cisteína 217, ya que las TPI con éste residuo tienen una inhibición parcial de su actividad catalítica. El cristal de la TPI de T. brucei, [16] muestra que el residuo de cisteína 14 forma parte de la interfase, y que por lo tanto es muy probable que las alteraciones de la cisteína 14 perturben las interacciones que mantienen la integridad de la estructura del dímero [21].*

*Estos resultados dejan clara la idea de que se necesita un grupo relativamente grande (un fenilo y no uno metilo) para que haya una inhibición total en aquellas enzimas que presentan una cisteína en la posición 217; ya que a pesar de que el MMTS derivatiza a 2 de las 5 cisteínas que tiene el monómero de la TPI de conejo, no produce grandes efectos en la catálisis, ni fuertes modificaciones en sus parámetros cinéticos [29].*

*En base a los experimentos de inactivación de la TPI de conejo por PTTS, en donde se demuestra que el PTTS derivatiza a una de las 5 cisteínas por monómero que presenta dicha enzima y que produce una inhibición de más del 90% [29], y por los resultados obtenidos en estos experimentos con las enzimas de S. pombe y de humano, se confirma que el sitio de acción del PTTS es la cisteína 217, y que éste reactivo es un inhibidor selectivo de enzimas homólogas que poseen una cisteína 217, o en una posición equivalente a esta cisteína. Considerando que el PTTS derivatiza sólo una de las 5 cisteínas por monómero que presenta la TPI de conejo, y que sus parámetros cinéticos muestran grandes cambios ( $K_m$  4.5 veces más alta y  $V_{max}$  65% más baja), significa que la transformación de la cisteína a un fenil disulfuro ejerce importantes efectos en la cinética de la enzima [29].*

*Estos resultados demuestran también que las diferencias o similitudes en la respuesta de enzimas homólogas a un determinado agente pueden ser usadas para identificar su sitio de acción [29]. Es importante mencionar que la cisteína 217 de la TPI cristalizada de pollo [14] se encuentra en la superficie de la  $\alpha$ -hélice 7; esto es lejos de la interfase y aproximadamente a 160 nm del glutámico 165, un residuo que es esencial para la catálisis, y que a pesar de no ser completamente accesible al solvente, [29,38] la posición de la cisteína 217 sugiere que la derivatización de ésta cisteína puede causar perturbaciones estructurales, aunque no tan importantes como*

*las producidas por modificación de un residuo que se encuentre en la interfase del dímero. Sin embargo, la transformación de la cisteína 217 por un grupo fenil disulfuro causa perturbaciones estructurales, aunque estas puedan ser algo sutiles, puesto que únicamente se observaron alteraciones cinéticas [29].*

*Finalmente, estos experimentos indican que es posible encontrar un inhibidor especie-específico de enzimas homólogas teniendo como blanco a residuos de aminoácidos que no han sido conservados a lo largo de la evolución, y que sean esenciales para la estabilidad y/o catálisis de la enzima. Además, cuando se usan aminoácidos no conservados para la inhibición selectiva es importante buscar un grupo con el que se obtenga la respuesta que se desea.*

## **VII. CONCLUSIONES**

*1. El método de purificación de la TPI de S. pombe dió como resultado una fracción parcialmente pura de la enzima. La electroforesis en SDS mostró una banda de  $\approx 26$  KDa., que corresponde al monómero de la TPI; y una banda contaminante de 45 KDa.*

*2. La actividad de la TPI de S. pombe se inhibió completamente por el PTTS. La sensibilidad al PTTS de la enzima parcialmente pura, incrementa varias veces con respecto a la del extracto crudo.*

*3. El MMTS inhibió parcialmente (40 %) la actividad de la TPI de S. pombe, así como la del extracto crudo.*

*4. El método de purificación de la TPI de humano dió como resultado una preparación con alto grado de pureza y un rendimiento del 26 %. El gel de poliacrilamida con SDS muestra una sola banda de  $\approx 26.5$  KDa.*

*5. El PTTS inhibió totalmente la actividad de la TPI de humano; ésta conserva, al igual que la de S. pombe, una Cys en la posición 217. El MMTS la inhibió parcialmente.*

## VII. REFERENCIAS

1. **Lolis, E., Alber, T., Devenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C. & Petsko, G. A.** (1990) *Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9Å resolution. Biochemistry* **29**:6609-6618.
2. **Knowles, J. R.** (1991) *Enzyme catalysis: not different, just better. Nature* **350**:121-124.
3. **Waley, S. G.** (1973) *Refolding of triosephosphate isomerase. Biochem. J.* **135**:165-172.
4. **Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A. & Hol, W. G. J.** (1994) *Crystal Structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. Protein Sci.* **3**:810-821.
5. **Albery, W. J. & Knowles, J. R.** (1976) *Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. Biochemistry* **15**:5631-5640.
6. **Richard, J. P.** (1984) *Acid-Base Catalysis of the Reactions of Triose Phosphates J. Am. Chem. Soc.* **106**:4926-4936.
7. **Richard, J. P.** (1991) *Kinetic parameters of elimination reaction catalyzed by Triosephosphate isomerase and an estimation of the reaction's physiological significance. Biochemistry* **30**:4581-4585.
8. **Komives, E. A., Chang, L. C., Lolis, E., Tilton, R. F., Petsko, G. A. & Knowles, J. R.** (1991) *Electrophilic Catalysis in Triosephosphate isomerase: The role of Histidine-95. Biochemistry* **30**:3011-3019.
9. **Carrington, S. L. & Douglas, K. T.** (1986) *IRCS Med. Sci.* **14**:763-768.

- 10. Lambeir, A.M., Opperdoes, F.R. & Wierenga, R.K. (1987) Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from Trypanosoma brucei brucei. A comparison with the rabbit muscle and yeast enzymes. *Eur.J.Biochem.* **168**:69-74.**
- 11. Putman, S.J., Coulson, A.F.W., Farley, I.R.T., Riddleston, B. & Knowles, J.R. (1972) Specificity and kinetics of Triose Phosphate Isomerase from Chicken Muscle. *Biochem.J.* **129**:301-310.**
- 12. Delboni, L.F., Mande, S.C., Rentierelrue, F., Manfroid, V., Turley, S., Martial, J.A. Vellieux, F.M.D. & 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 Science* **4**:2594-2604.**
- 13. Craig, L.C., Pirtle, I.L., Gracy, R.W. & Pirtle, R.M. (1979) *J.Mol.Biol.* **129**:235-264.**
- 14. Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I. & Wilson, I.A. (1975) Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**:609-614.**
- 15. Alber, T., Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Rivers, P.S. & Wilson, I.A. (1981) On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triosephosphate isomerase. *Philos.Trans.R.Soc.London B* **293**:159-171.**
- 16. Wierenga, R.K. (1991b) 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.**

- 17. Nobel, M.E.M., Zeelen, J.P., Wierenga, R.K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A.C. & Martial, J.A. (1993b) Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr D* **49**:403-417.**
- 18. Muirhead, H. (1983) Triosephosphate isomerase, pyruvate kinase and  $\alpha/\beta$ -barrel enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* **8**:326-329.**
- 19. Nickbarg, E.B. & Knowles, J.R. (1988) Triosephosphate Isomerase: Energetics of the Reaction Catalyzed by the Yeast Enzyme Expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **27**:5939-5947.**
- 20. Verlinde, C.L.M.J., Witmans, C.J., Pijning, T., Kalk, K.H., Hol, W.G.J., Callens, M. & Opperdoes, F.R. (1992b) Structure of the complex between triosephosphate isomerase and N-hydroxy-4-phosphono-butanamide: Binding at the active site despite an "open" flexible loop. *Protein Sci* **1**:1578-1584.**
- 21. Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A. & Pérez-Montfort, R. (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action-studies with triosephosphate isomerase. *Chem. & Biol.* **2**:847-855.**
- 22. Visser, N. & Opperdoes, F.R. (1980) Glycolysis in *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* **103**:623-632.**
- 23. Verlinde, C.L.M.J., Callens, M., Van-Calenbergh, S., Van-Aerschot, A., Herdewijn, P., Hannaert, V., Michels, P.A.M., Opperdoes, F.R. & 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.**

- 24. Hanau, S., Rippa, M., Bertelli, M., Dallochio, F. & Barrett, M.P.** (1996) 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Kinetic analysis and inhibition by trypanocidal drugs. *Eur. J. Biochem.* **240**:592-599.
- 25. Willson, M., Callens, M., Kuntz, D.A., Pieré, J. & Opperdoes, F.R.** (1993) Synthesis and activity of inhibitors highly specific for the glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **59**:201-210.
- 26. Wéry, M.** (1994) Drugs used in the treatment of sleeping sickness (human African trypanosomiasis: HAT). *International Journal of Antimicrobial Agents* **4**:227-238.
- 27. Zubillaga, R.A., Pérez-Momntoft, R. & Gómez-Puyou, A.** (1994) Differential inactivation of rabbit and yeast triosephosphate isomerase: effect of oxidations produced by chloramine-T. *Biochem. Biophys.* **313**:328-336.
- 28. Kenyon, G.L. & Bruice, T.W.** (1977) Chemical Modification. Novel Sulphydryl Reagents. *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. **47**:407-430.
- 29. Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Rojo-Domínguez, A., De Gómez-Puyou, M.T. & Gómez-Puyou, A.** (1996) Specie-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acid residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* **241**:114-120.
- 30. Russell, P.R.** (1985) Transcription of the triose-phosphate-isomerase gene of *Schizosaccharomyces pombe* initiates from a start point different from that in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **40**:125-130.
- 31. Swayer, T.H. & Gracy, R.W.** (1975) Ligand Binding and Denaturation Tritation of free and Matrix-Bound Triosephosphate Isomerases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **169**:51-57.
- 32. Kohl, L., Callens, M., Wierenga, F.R. & Michels, P.A.M.** (1994) Triose-phosphate isomerase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and characterization of the

gene, overexpression in *Escherichia coli* and analysis of the protein.

*Eur. J. Biochem.* **220**:331-338.

**33. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.

**34. Bradford, M.B.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

**35. Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

**36. Shin-isi Aizawa.** *Comunicación personal.*

**37. Lu, H.S., Yuan, P.M. & Gracy, R.W.** (1984) Primary Structure of Human Triosephosphate Isomerase. *The Journal of Biological Chemistry* **259**:11958-11968.

**38. Sepúlveda-Becerra, M.A., Ferreira, S.T., Strasser, R.J., Garzón-Rodríguez, W., Beltrán, C., Gómez-Puyou, A. & Darzon, A.** (1996) Refolding of Triosephosphate Isomerase in Low-Water Media Investigated by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Biochemistry* **35**:15915-15922.

**39. Norton, I.L. & Hartman, F.C.** (1972) Haloacetol Phosphates. *A Comparative Study of the Active Sites of Yeast and Muscle Triose Phosphate Isomerase.* *Biochemistry* **11**:4435-4441.

**40. Branden, C. & Tooze, J.** (1991) *Introduction to Protein Structure.* Garland Publishing, Inc.