



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

Estudio del efecto cinético producido por el reemplazo
de una cisteína evolutivamente conservada en la
Triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma brucei*

T E S I S

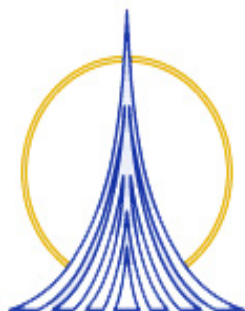
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ALMA JESSICA DÍAZ SALAZAR

Director de tesis: Dra. Georgina Garza Ramos
Asesor de tesis: Mtra. Rosalinda Escalante Pliego

Mayo 2005





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A mi familia por todo el apoyo, cariño y comprensión que me han
brindado.*

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Georgina Garza Ramos en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se contó con una beca-tesis otorgada por CONACYT (Proyecto de investigación básica 41328).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

A la Dra. Georgina Garza Ramos Martínez por aceptarme en su equipo de trabajo y por la atención recibida durante mi estancia en el laboratorio.

Al CONACYT por la beca otorgada para la elaboración de la tesis (Proyecto de investigación básica 41328).

A los miembros del jurado: Mtra. Rosalinda Escalante Pliego, Mtro. José Angel Rojas Zamorano, Biol. Ma. del Pilar Santos Romo, M. en C. Claudia F. Martínez Rodríguez por la revisión del trabajo.

A todos los compañeros del Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas por la ayuda y sugerencias brindadas durante la elaboración de la tesis.

Al Mtro. Ignacio Regla y a Rodrigo G. por las sugerencias que me dieron para llevar a cabo la síntesis del PGH.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	1
I. MARCO TEÓRICO.....	2
A. Enzimas.....	2
B. Triosafosfato isomerasa	3
1. Estructura	4
2. Mecanismo de reacción.....	7
C. Inhibidores de la Triosafosfato isomerasa.....	9
1. DL-Glicerol-3-fosfato	11
2. 2-Fosfoglicolato	13
3. Fosfoglicolohidroxamato	15
D. Contribución de aminoácidos específicos en la catálisis y estabilidad de la TIM.17	
1. Cisteína 126.....	18
II. PROBLEMA.....	20
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS.....	22
V. METODOLOGÍA.....	23
A. Material	23
B. Métodos.....	26
1. Crecimiento de las células y sobreexpresión de las proteínas.....	26
2. Purificación de TbTIM silvestre y las mutantes de cisteína	27
3. Geles von Jagow	28
4. Determinación de proteína por el método BCA.....	29
5. Determinación de la concentración de la TbTIM silvestre	30
6. Preparación del GAP.....	30
7. Preparación de DHAP	31
8. Determinación de la actividad de la TIM.....	32

9. Determinación de los parámetros cinéticos.....	33
10. Determinación de las constantes de inhibición	34
11. Síntesis del PGH	36
12. Determinación de la concentración del PGH.....	37
VI. RESULTADOS	38
A. Expresión y purificación de las enzimas mutantes	38
B. Parámetros cinéticos	38
C. Constantes de inhibición.....	41
1. Inhibición de la mutante C126S por el 2PG	41
2. Inhibición de la mutante C126S por el DL-G3P.....	43
3. RMN del PGH.....	44
4. Inhibición de la mutante C126S por el PGH.....	45
VII. DISCUSIÓN	48
VIII. CONCLUSIONES	51
ANEXO I. Cinética enzimática	52
ANEXO II. Espectros de RMN del PGH.....	59
REFERENCIAS	61

RESUMEN

En el presente trabajo se utilizó como modelo de estudio a la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM). Esta enzima cataliza la interconversión de la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato; reacción que constituye una de las etapas enzimáticas de la glucólisis. La enzima es un homodímero formado por subunidades de 26.9 kDa con la estructura de barril α/β . Cada monómero de la TbTIM presenta en su secuencia tres cisteínas. La Cys14 forma parte de la interfase del dímero, las Cys39 y Cys126 se localizan al interior del barril, esta última forma parte del sitio catalítico, establece contactos de van der Waals con el Glu catalítico y es uno de los residuos estrictamente conservados en la TIM. En este trabajo se estudió el papel que desempeña la Cys126 en la actividad y estabilidad de la TIM. Mediante mutagénesis dirigida se obtuvieron enzimas con reemplazos sencillos de Ala y Ser (C126A y C126S). Las proteínas mutantes se purificaron a homogeneidad y se determinaron sus parámetros cinéticos, utilizando los dos sustratos de la TIM. Con el GAP, tanto la C126S como la C126A presentaron una disminución de K_M (14 y 2 veces) y de k_{cat} (20 y 2 veces); respectivamente. En el caso de la DHAP, la C126S mostró una disminución de K_M de 4 veces y de k_{cat} de 6 veces, respecto a la enzima silvestre, esto indica que las enzimas mutantes son más afines por el sustrato, pero que la velocidad catalítica es menor en condiciones de saturación, por lo que la relación k_{cat}/K_M de las enzimas mutantes es semejante a la encontrada en la TbTIM. Los valores de las constantes de inhibición para la C126S con el análogo del sustrato DL-G3P ($K_i = 0.5$ mM) y los análogos del estado de transición 2PG ($K_i = 0.022$ mM) y PGH ($K_i = 0.9$ μ M) fueron menores respecto a la TbTIM. La enzima mutante tiene mayor afinidad por los análogos del sustrato, lo que concuerda con lo observado para la K_M . Por otra parte, los estudios realizados en el laboratorio sobre la estabilidad térmica de las enzimas mutantes muestra corrimientos de la T_m en las mutantes de 6° C (C126A) y 9° C (C126S) comparadas con el valor de la TbTIM, con esto se concluye que la Cys está involucrada en el mantenimiento de la conformación nativa de la TbTIM.

I. MARCO TEÓRICO

A. Enzimas

Las enzimas son los catalizadores de las reacciones en los sistemas biológicos, con un poder a menudo muy superior al de los catalizadores sintéticos. Proporcionan un ambiente para el cual una reacción determinada es energéticamente más favorable. Sin las enzimas, la mayor parte de las reacciones no se efectuarían dentro de un tiempo razonable, a menos que se dieran condiciones extremas de temperatura, presión o pH (Lehninger, 1995).

Las enzimas constituyen una de las claves para conocer de qué modo sobreviven y proliferan las células. Actuando en secuencias organizadas catalizan cientos de reacciones consecutivas en las rutas metabólicas. Algunas de estas enzimas son reguladoras y pueden responder a diversas señales cambiando adecuadamente su actividad catalítica. Se tiene de esta manera una perfecta coordinación entre los sistemas enzimáticos y la multitud de actividades metabólicas necesarias para la vida.

La mayoría de las enzimas son proteínas constituidas por 100 o más aminoácidos. Por su naturaleza protéica requieren un pH y una temperatura óptimos para su actuación (Macarulla, 1992). Si se desnaturaliza o disocia una enzima en sus subunidades, se pierde normalmente la actividad catalítica, al igual que si se descompone una enzima en sus aminoácidos constituyentes. La actividad catalítica de las enzimas depende de la integridad de su conformación protéica nativa.

El sustrato es la sustancia sobre la que actúa una enzima. El grado de especificidad por éste es, por lo general, muy alto y en algunas ocasiones es virtualmente absoluto. Las moléculas de sustrato se unen a la enzima en una hendidura tridimensional generalmente hidrofóbica, que se conoce como el sitio activo, es relativamente pequeño si se le compara con el resto de la enzima, ya que está constituido por pocos aminoácidos.

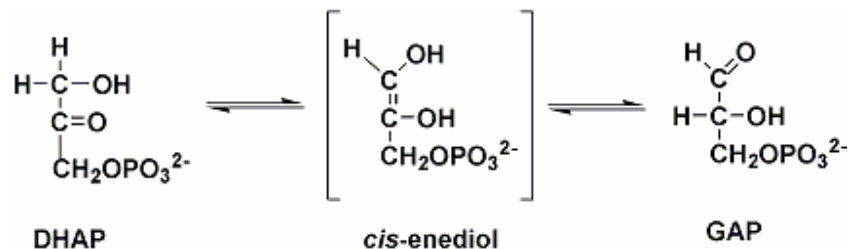
Para que una enzima catalice una reacción, ésta deberá ser complementaria al estado de transición. Cuando el sustrato se fija al sitio activo de la enzima, se forma un complejo enzima-sustrato que presenta algunas interacciones débiles (puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals, hidrofóbicas y iónicas) pero las interacciones óptimas solo

tienen lugar en el estado de transición, donde se presenta un complejo activado que no es una especie química con estabilidad significativa por lo que no se ha de confundir con un intermediario de la reacción, es una estructura energizada e inestable, en la que algunos de los enlaces químicos se están formando y rompiendo de manera simultánea.

La energía requerida para llegar al estado de transición a partir del estado basal de los reactantes se conoce como energía de activación (Horton, 2002). Las enzimas disminuyen dicha energía de activación, favoreciendo de esta manera la velocidad de la reacción sin afectar su equilibrio (Macarulla, 1992).

B. Triosafosfato isomerasa

Una de las enzimas que intervienen en la glucólisis es la Triosafosfato Isomerasa (TIM), cataliza la interconversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP), una reacción que se produce a través de un intermediario enediol (Mathews *et al.*, 2002):



Esta enzima ha sido considerada un catalizador perfecto (Knowles, 1991) y se estableció que *in vivo* los pasos limitantes de la velocidad de la reacción en la que participa son la unión de sustrato y la liberación del producto, controlados por la difusión (Blacklow *et al.*, 1988). La reacción que realiza determina en gran parte la eficiencia de la glucólisis, de la DHAP y el GAP, solo el GAP continúa en la ruta glucolítica.

1. Estructura

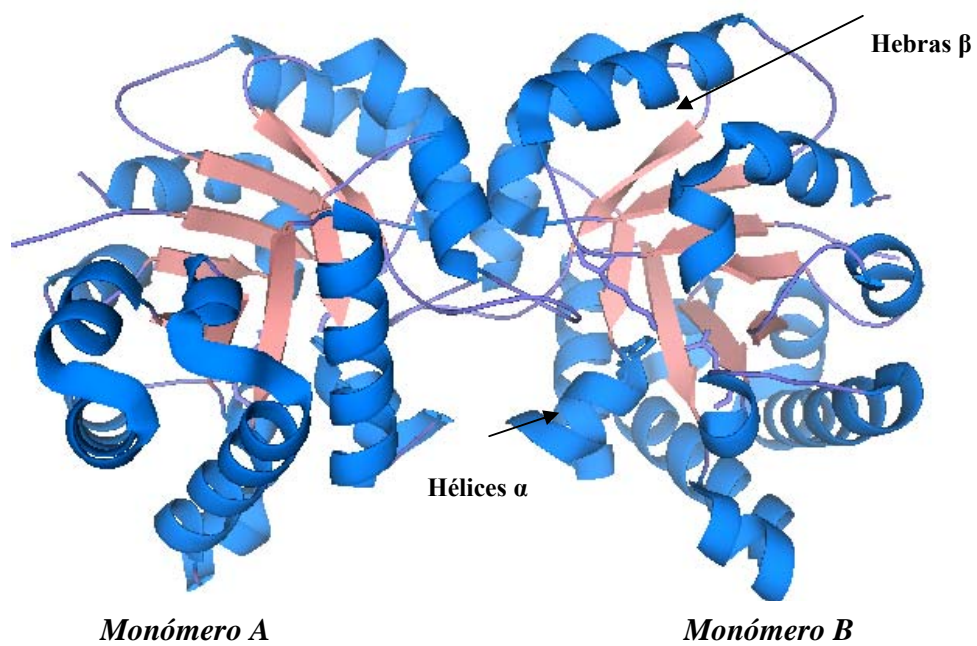
Se conocen a detalle tanto la estructura como el mecanismo cinético. La TIM estudiada en diferentes especies, a excepción de la de organismos termófilos (en los que es un tetramero) (Maes *et al.*, 1999, Walden *et al.*, 2001), es un homodímero de subunidades idénticas llamadas monómeros; cada uno de los cuales está formado por una secuencia peptídica de 250 residuos aminoácidos (Fig.1a). El peso molecular de cada monómero es de 26.9 kDa, mientras que el peso molecular del dímero es cerca de 53 kDa (Straus *et al.*, 1985, Noltman, 1972). Solo el dímero es catalíticamente activo, los monómeros por si solos son inactivos (Waley, 1973, Zabori *et al.*, 1980), se asocian a través de interacciones no covalentes para formar un homodímero con una alta constante de asociación.

Se ha encontrado que la variación en la secuencia de aminoácidos de la TIM de diferentes especies es muy pronunciada, alrededor del 50% (Swinkels *et al.*, 1986), sin embargo la estructura primaria del sitio activo ha sido conservada a través del proceso evolutivo. Los residuos del sitio activo responsables de la catálisis son: Lys en la posición 13, His en la posición 95 y Glu en la posición 167 (Fig.1b). Dependiendo de la especie puede variar ligeramente la posición.

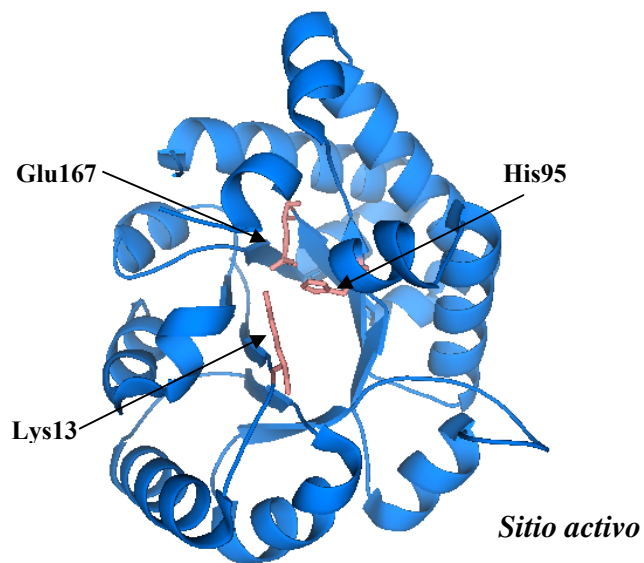
La TIM pertenece a la clase de proteínas barril α/β (Farber, Petsko, 1990, Rice *et al.*, 1990). Cada monómero está formado por ocho hebras β paralelas alternando con ocho α hélices unidas por asas (Fig.1a), que juegan papeles importantes en el funcionamiento de la enzima.

El asa seis, también conocida como catalítica, está formada por 10 u 11 aminoácidos (residuos 167-178 en la secuencia de la TbTIM), se mueve de una conformación conocida como abierta a una conformación cerrada cuando se une el sustrato, es decir el asa se dobla sobre el sitio activo. El papel de esta asa en el mecanismo de la enzima, es proteger el sitio activo del contacto con agua y prevenir la eliminación del grupo fosfato del intermediario enediol (Fig. 2) (Pompliano *et al.*, 1990, Richard, 1987).

El asa tres o asa de “interdigitación” de cada una de las subunidades penetra en una cavidad que se encuentra cerca del sitio activo de la otra subunidad (Fig.3). Muchos de los contactos entre los dos monómeros se encuentran en ésta asa cuya secuencia de aminoácidos es altamente conservada en todas las especies (residuos 67 a 79 en la secuencia de TbTIM) (Swinkels *et al.*, 1986).



a)



b)

Figura 1. Estructura tridimensional de la TIM. a) Dímero de la TIM. Se muestra cada una de las subunidades, A y B, donde se aprecia el barril de estructura $(\alpha/\beta)_8$. Las coordenadas se obtuvieron del archivo 1KV5 del PDB (Kursula *et al.*, 2002). b) Residuos del sitio activo. En el centro del barril de cada monómero se localizan los residuos involucrados directamente en la reacción de catálisis: Lys13, His95 y Glu167. Tomado del archivo 1N55 del PDB (Kursula, Wierenga, 2003).

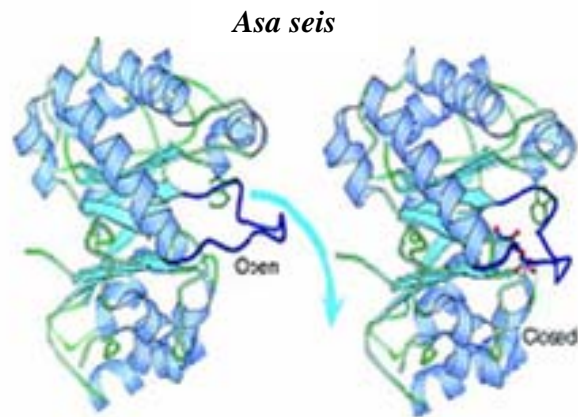


Figura 2. Se muestra el asa catalítica o asa seis de la TIM de levadura en posición abierta (sin ligando) y en posición cerrada (en presencia del análogo del estado de transición PGH). Tomado de Rozovsky and Mc Dermott, 2001.

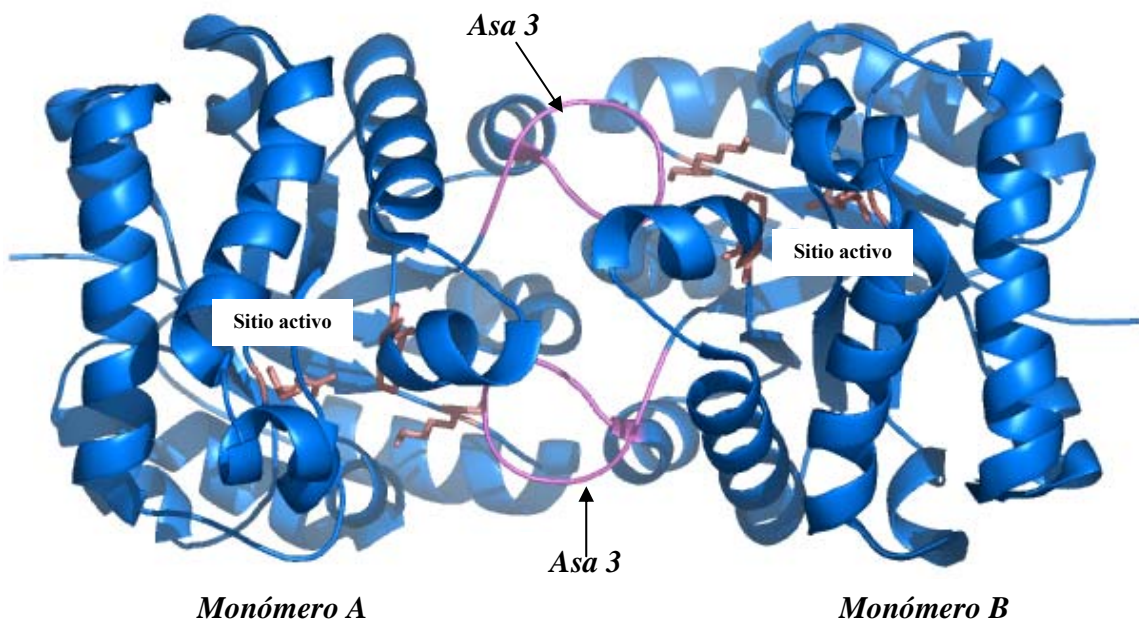


Figura 3. Dímero de la TIM donde se muestra el asa tres o de interdigitación que forma la mayoría de los contactos entre las subunidades. Archivo 1KV5, tomado del PDB (Kursula *et al.*, 2002).

2. Mecanismo de reacción.

Esta enzima media las protonaciones y desprotonaciones necesarias en la interconversión entre DHAP y GAP. Los residuos importantes para la reacción catalítica son la Lys13, His95 y Glu167 (en la secuencia de la TbTIM) y se localizan en la zona C-terminal del barril α/β .

Los residuos responsables de la catálisis se han conservado a través de la evolución. El Glu167 ha sido identificado como la base catalítica y es el responsable de sustraer un protón del C1 de la DHAP para producir GAP, ó del protón del C2 del GAP para producir DHAP, iniciando de esta manera la catálisis. La His95 transfiere protones entre los dos oxígenos del intermediario enediolato en la reacción y la Lys13 produce una carga positiva en el ambiente del sitio activo, para que el sustrato fosfodiani3n pueda unirse (Zhang *et al.*, 1994, Joseph-McCarthy *et al.* 1994).

Basándose en la informaci3n enzimol3gica y estructural obtenida para la TIM se ha determinado que el mecanismo de reacci3n de esta enzima es el siguiente (Fig.4):

1. El sustrato DHAP se une al sitio activo de la TIM y el residuo Glu167 toma un prot3n del C1 de la DHAP. Formándose el intermediario enediolato.
2. El intermediario es protonado en su O2 por el imidazol neutro del anillo de His95 dando un enediol doblemente protonado y un anion imidazolato.
3. La His95 recaptura un prot3n del O1 formando otra vez una especie enediolato, ahora carente de un prot3n en el O1.
4. Se da la protonaci3n del C2 de este enediolato a partir del grupo carboxilo de Glu167, de esta manera se restaura la base y se forma el GAP, el cual es liberado por la enzima (Åqvist *et al.*, 1996).

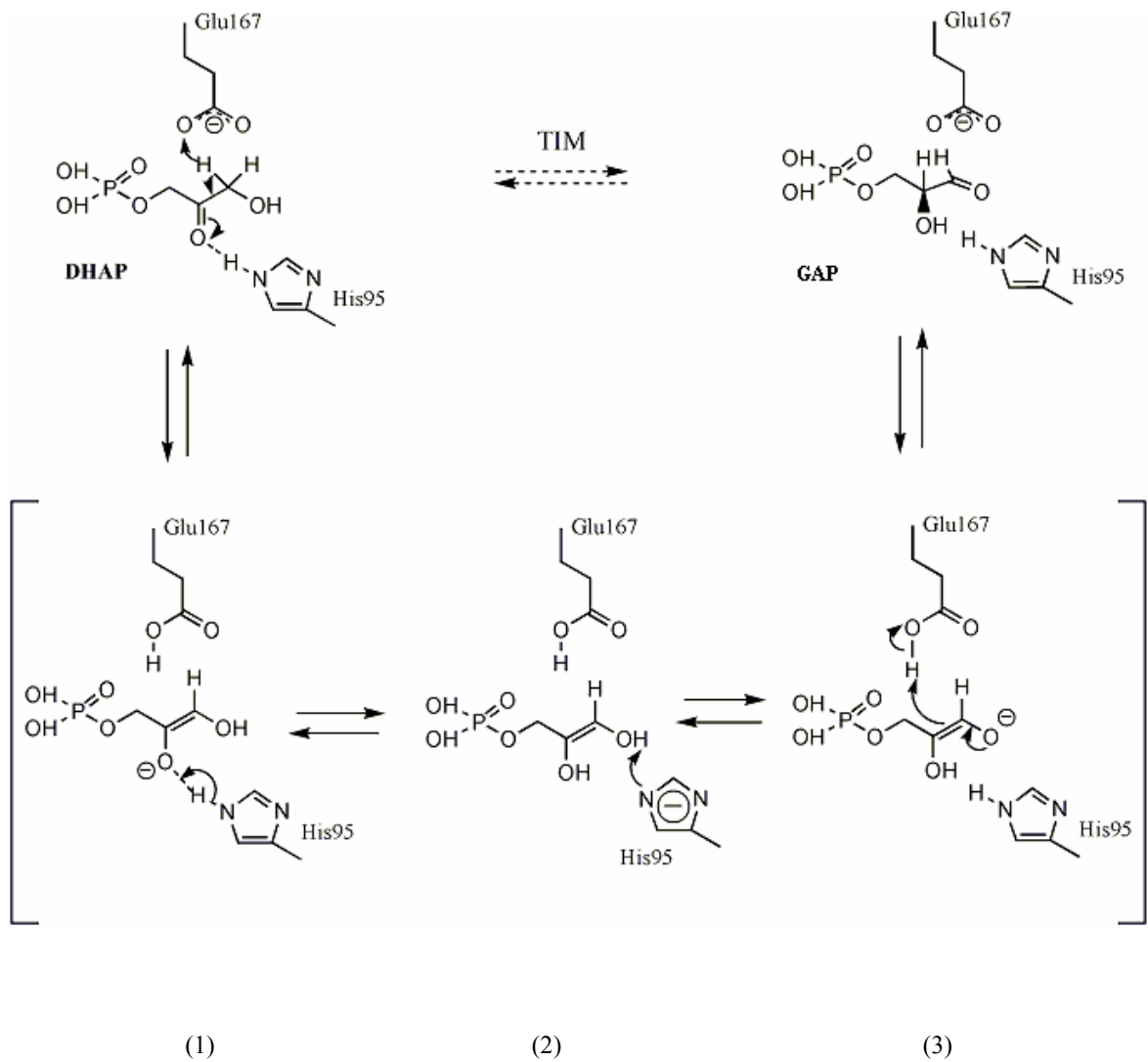


Figura 4. Mecanismo de la reacción catalizada por la TIM para la interconversión entre DHAP y GAP. Primeramente se transfiere un protón de DHAP al Glu167 para formar un enediolato (1), después se genera un enediol (2) por transferencia de un protón de y para His95, finalmente se transfiere un protón del Glu167 a un enediolato (3) para formar GAP (Åqvist *et al.*, 1996).

C. Inhibidores de la Triosafosfato isomerasa

Los inhibidores son sustancias que se unen a las enzimas y disminuyen la velocidad de la reacción o bloquean la catálisis (ver anexo I). Son de gran importancia y su aplicación permite conocer cuál es el sitio activo de una enzima y su mecanismo de reacción.

Los inhibidores del tipo competitivo dan información acerca de los pasos del mecanismo de reacción que sigue una enzima. Se dividen en análogos del sustrato y análogos del estado de transición.

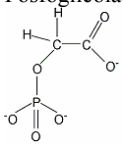
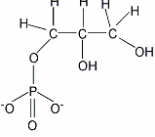
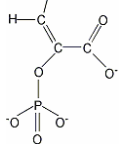



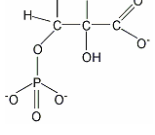
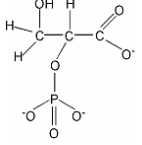
Generalmente las reacciones que catalizan las enzimas son reversibles por tanto el producto de la reacción es también el sustrato de la reacción reversa. Los análogos del sustrato son compuestos que son semejantes ya sea al sustrato o al producto de la reacción catalizada por la enzima.

El complejo activado del estado de transición, con una vida media de alrededor de 10^{-13} segundos dura muy poco tiempo como para poder aislarlo, sin embargo se han sintetizado sustancias (análogos del estado de transición) que se asemejan a éste. Estos compuestos se fijan muy firmemente a la enzima apropiada y son inhibidores muy potentes (Horton, 2002).

En el caso particular de la TIM, se han estudiado una serie de inhibidores análogos del sustrato. En la tabla I se muestran los valores de K_i de algunos de estos compuestos, para la TIM de *T. brucei*, músculo de conejo y levadura (Lambeir *et al.*, 1987).

El sulfato, fosfato y arsenato se unen al sitio activo de la enzima, ocupando la hendidura del sitio de unión del fosfato. El 2-Fosfoglicolato se considera como un análogo del estado de transición, mientras que el DL-Glicerol 3-fosfato como un análogo del sustrato.

Tabla I. Constantes de inhibición (K_i) para la TIM de diferentes especies (Lambeir *et al.*, 1987).

Inhibidor	K_i (mM)		
	<i>T.brucei</i>	Músculo de conejo	Levadura
2-Fosfoglicolato 	0.027 ± 0.005	0.014 ± 0.003 0.006	0.030 ± 0.006
DL-Glicerol 1-Fosfato 	0.61 ± 0.09	0.24	1.2 ± 0.3
Fosfoenolpiruvato 	1.3 ± 0.5	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Sulfato 	4.5 ± 0.7	5.7	8.0 ± 1
Fosfato 	4.5 ± 0.7	4.8 - 6.0	5.0 ± 0.2
Arsenato 	4.6 ± 0.8	5.5 - 6.2	12 ± 2
DL-3-Fosfoglicerato 	1.3 ± 0.4 (DL) 6.2 ± 0.2 (L)	0.51 ± 0.07 (DL) 6.2 ± 0.2 (L)	1.1 ± 0.1 (DL) 5.9 ± 0.2 (L)
DL-2-Fosfoglicerato 	6.9 ± 2.2	4.1 ± 1.2	7.7 ± 1.0

1. DL-Glicerol 3-fosfato

Uno de los primeros análogos del sustrato que se estudiaron para la TIM fue el DL-Glicerol 3-fosfato (DL-G3P) (Fig.5), del cuál únicamente el isómero D se une a la enzima (Campbell *et al.*, 1979). Actúa como inhibidor competitivo de la TIM con una K_i de 0.15 mM para la TIM de pollo y de 0.23 mM para la TIM de músculo de conejo (Johnson *et al.*, 1970). En el caso de la TbTIM se reportó una K_i de 0.61 mM, valor que es comparable a la afinidad por el sustrato DHAP ($K_M=0.66\text{mM}$) (Lambeir *et al.*, 1987).

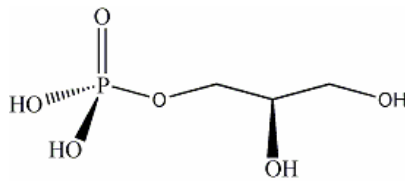


Figura 5. DL-Glicerol-3-fosfato

En 1970 Wolfenden y col. obtuvieron las primeras evidencias experimentales que sugerían cambios conformacionales en la estructura de la TIM al unirse a su ligando. Ellos observaron alteraciones en el espectro de absorción UV de la enzima y cambios en la dimensión del cristal en el complejo TIM-DLG3P (Jones *et al.*, 1979).

Se obtuvo el cristal del complejo de la TbTIM- DL-G3P a 2.2Å de resolución (Noble *et al.*, 1991). Esta estructura se comparó con las estructuras de la TIM libre o con sulfato unido al sitio del fosfato; de lo cual se observaron tres conformaciones para el asa catalítica: abierta cuando la enzima esta libre, un poco cerrada con el sulfato y totalmente cerrada con el DL-G3P. La cadena lateral del Glu167 adquiere una posición diferente al estar unido el DL-G3P ya que los grupos hidroxilos del ligando están a distancia de puente de hidrogeno de cada uno de los oxígenos del carbonilo del Glu167. Uno de los grupos hidroxilo del DL-G3P también forma puentes de hidrogeno con $N\zeta$ de la Lys13 y el $N\epsilon 2$ de la His95. Por otra parte el grupo fosfato del ligando interactúa con los grupos NH de las cadenas laterales de los residuos del asa catalítica (Gly173), del asa 7 (Ser213) y con los residuos Gly234 y Gly235 (Fig.6).

En estudios de desnaturalización con cloruro de guanidinio se ha observado que este inhibidor tiene un efecto protector sobre la TIM de humano y músculo de conejo (Sawyer y

Gracy, 1975). Además de que disminuye la velocidad de inactivación por inhibidores irreversibles como el haloacetil fosfato (Hartman *et al.*, 1975).

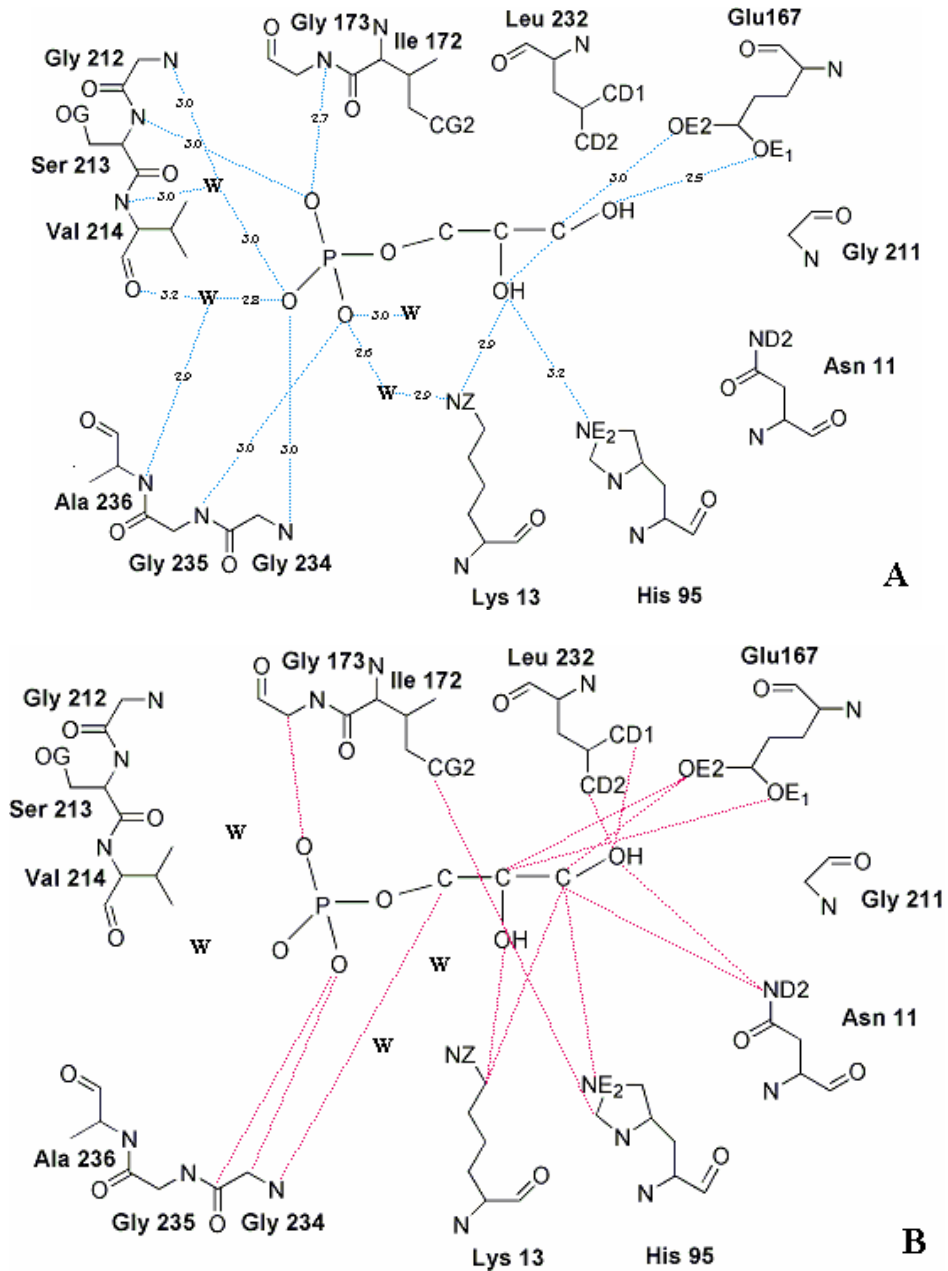


Figura 6. Interacciones de la TIM con el DL-G3P. A: Puentes de hidrogeno directos y mediados por moléculas de agua, las distancias están indicadas en Å. B: Se muestran los contactos directos (van der Waals) cuya distancia es menor de 3.5 Å, excluyendo los ya presentados en A (Noble *et al.*, 1991).

2. 2-Fosfoglicolato

El 2-Fosfoglicolato (2PG) es uno de los primeros ejemplos de un análogo del estado de transición diseñado con éxito (Wolfenden, 1969). Su estereoquímica y distribución de carga es similar a las del estado de transición que convierte la DHAP a intermediario enediolato (Fig.7).

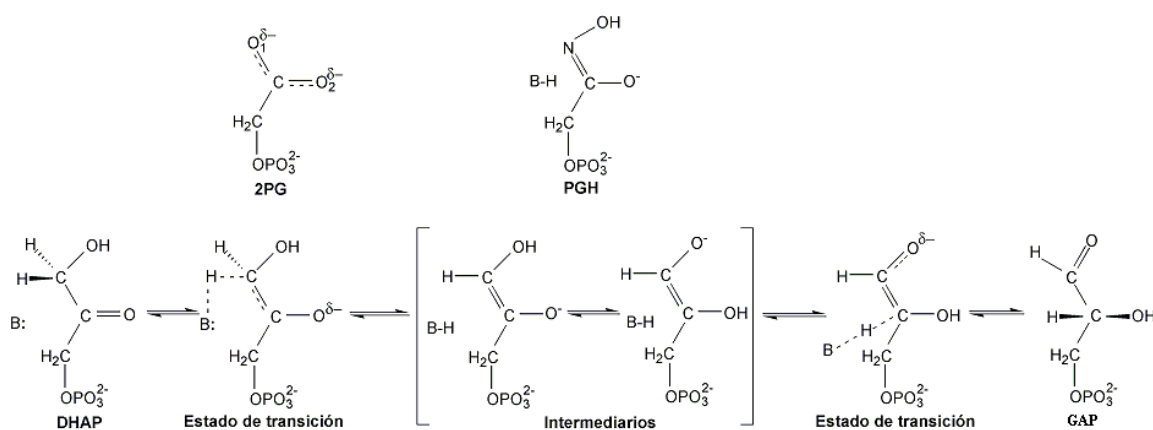


Figura 7. Reacción catalizada por la TIM, en la que se incluyen los estados de transición para la transferencia de protones. El 2PG se muestra sobre el estado de transición del cual se considera análogo. También se muestra el análogo del estado de transición PGH. “B:” representa la base catalítica (Lolis y Petsko, 1990, Davenport *et al.*, 1991).

Los primeros estudios realizados con el 2PG demostraron que la enzima, en presencia de concentraciones saturantes del inhibidor se protegía completamente de la inactivación por calor y que experimentaba un cambio conformacional al unirse con el mismo (Wolfenden, 1970). Poco después se encontró que también protegía contra la inactivación por inhibidores irreversibles (Jonson y Wolfenden, 1970).

La interacción del 2PG con la TIM también se estudio por medio de RMN de ^{13}C y ^{31}P , concluyendo que el 2PG se une como un trianión, con dos cargas negativas en el

fosfato y una en el carboxilato. El ácido carboxílico está totalmente ionizado cuando se une a la enzima, lo que indica que la enzima es protonada en el proceso de unión. Esta observación concuerda con la hipótesis de que el estado de transición de la reacción de isomerización catalizada por la TIM es un ión enediolato (Campbell *et al*, 1979).

Continuando con las investigaciones sobre la forma en que se da la unión con el 2PG, se obtuvo el cristal del complejo 2PG-TIM de levadura a 2.5 Å. El objetivo principal en este caso fue entender qué residuo se protonaba en la unión, encontrándose a la base catalítica Glu167 como un buen candidato. Este residuo pasa de estar unido por medio de un puente de hidrogeno con la Ser 96 a unirse, por un puente de hidrógeno al oxígeno del carboxilato del 2PG (Lolis y Petsko, 1990).

El 2PG se une muy fuertemente a la enzima, esto debido principalmente a interacciones electrostáticas entre el inhibidor y la enzima que se dan particularmente con la His95 y Glu167. Esto se dedujo a partir de la dependencia que se encontró de la K_i a la fuerza iónica y al hecho de que la afinidad de 2PG es elevada a un pH bajo (Lolis y Petsko 1990).

Recientemente se publicó la estructura del cristal del complejo 2PG-TIM de *Leishmania mexicana* a 0.83 Å de resolución. En esta estructura se encontró que la parte de la triosa del 2PG se une en dos conformaciones, en ambas el O11 se une al Oε2 de Glu167 por un puente de hidrogeno a una distancia de 2.61Å para la conformación predominante y 2.55Å para la otra. En cuanto a la parte del fosfato se une en una sola conformación. Esto debido a que se presenta una rotación en el enlace C1-C2 (Fig. 8). La cadena lateral del Glu167 también presenta cambios en la posición de Oε1, mientras que el Oε2 adopta siempre la misma posición. En la conformación predominante el Oε1 se encuentra a 4.12Å del Sγ de la Cys126 y a 4.69Å en la otra. En cualquiera de las dos conformaciones existe un puente de hidrogeno entre Oε1 del Glu167 y una red de agua que conecta su cadena lateral con el solvente (Fig.8) (Kursula y Wierenga, 2003).

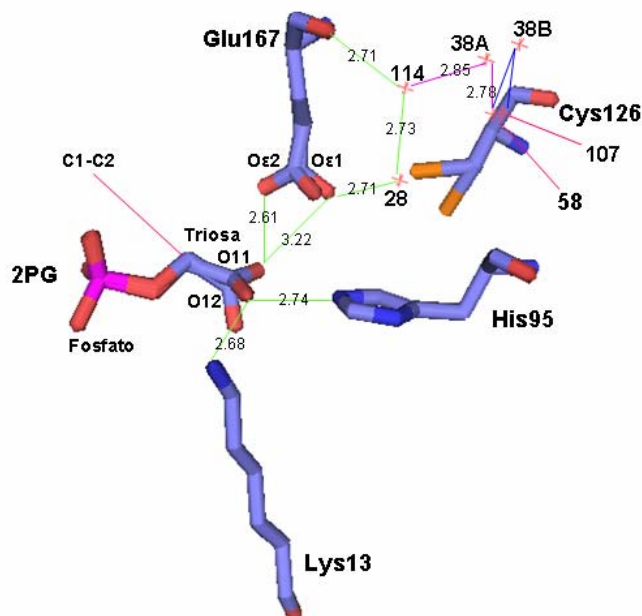


Figura 8. En el esquema se destacan las interacciones importantes del 2PG con los residuos catalíticos, así como las interacciones con moléculas de agua, además se muestran las dos conformaciones que toma la Cys126. Las líneas verdes indican las interacciones con moléculas de agua que se presentan en ambas configuraciones, las líneas rosas las que se observan sólo en la configuración predominante y las azules sólo las de la configuración menor. Los números se refieren a las distancias (Å) entre el ligando y los átomos de las cadenas laterales de los residuos catalíticos y las moléculas de agua (Kursula y Wierenga, 2003).

3. Fosfoglicolohidroxamato

El fosfoglicolohidroxamato (PGH) es un análogo del estado de transición de la reacción de isomerización catalizada por la TIM (Fig.7). Su diseño se basó en asumir que el estado de transición de la isomerización del DHAP a GAP tiene una estructura de enediol/enediolato. En el PGH el carácter parcial de doble enlace de la amida y la preferencia a una conformación cisoide de los ácidos hidroxámicos en solventes no polares parece simular perfectamente el doble enlace y la conformación cisoide del estado de transición (Lewis y Lowe, 1973).

Es un inhibidor muy efectivo que ha sido de gran utilidad para obtener información importante acerca del mecanismo de reacción que sigue esta enzima. Además se ha utilizado en estudios con la fructosabifosfato aldolasa, la fuculosa-1-fosfato aldolasa y la

metilglixal sintasa. El PGH no se obtiene de manera comercial, por lo que es necesario sintetizarlo previamente. Se han reportado dos formas de síntesis a las que se han hecho algunas modificaciones (Lewis y Lowe, 1973, Collins, 1974) y recientemente se publicó un método más sencillo y con mejor rendimiento (Weber *et al.*, 2003).

En los primeros estudios que se realizaron con este inhibidor, se determinó una K_i de 4 μM para la TIM de músculo de conejo, lo cual indica que tiene mucha mayor afinidad por la enzima que su sustrato. Se encontró que el valor de la K_i no varía entre pH 7.5 y 8.5, a partir de lo cual se concluyó que es la parte de ácido hidroxámico del inhibidor la que se une en su forma neutra a la enzima, debido a que el pKa del grupo hidroxámico es aproximadamente de 9.5. Sin embargo es posible que la base catalítica de la enzima pueda extraer el protón unido al nitrógeno y formar internamente una estructura análoga al enolato del estado de transición. Por otra parte también se postuló que el ácido hidroxámico neutro tal vez no sea ionizado y la unión tan fuerte se debe por su estructura planar (Collins, 1974).

Se ha descrito la estructura de algunos complejos de la TIM con el PGH. En uno de ellos se trabajó con el complejo PGH-TIM de levadura a 1.9 Å (Davenport *et al.*, 1991) con el fin de detallar más el mecanismo de reacción. Se observó que el sitio activo está totalmente ocupado por el inhibidor y que su unión induce un cambio en la orientación del carboxilato del Glu165, moviéndose éste 2-3 Å de su posición en la enzima libre. En el proceso, un puente de hidrógeno que formaba el carboxilato del Glu165 con el hidroxilo de la Ser96 es reemplazado por interacciones con el inhibidor. También se encontró que todos los electrófilos del sitio activo forman contactos con los oxígenos del hidroxamato. La Lys 12 interactúa con el oxígeno del carbonilo de PGH. El N ϵ 2 de la His95 está colocado entre los dos oxígenos del hidroxamato, donde probablemente se media la transferencia del hidrógeno del O1 a O2 en la isomerización de DHAP. Se encontró que la cadena lateral de la His95 es neutra en el complejo con el PGH, por lo tanto se infiere que es neutra en el complejo enzima sustrato.

Los datos obtenidos con el cristal del complejo PGH-TIM de pollo a 1.8 Å de resolución (Zhang *et al.*, 1994) fueron similares a los del complejo con la TIM de levadura. Además de las características ya mencionadas para el cristal con la TIM de levadura, en el cristal de la TIM de pollo se observó un grupo de tres moléculas de agua cerca de la cadena lateral del Glu167 y un puente de hidrógeno entre el O ϵ 2 y una de estas moléculas. Este

oxígeno también tiene un contacto de van der Waals con $S\gamma$ de la Cys 126 el cual se observa en la enzima libre (Fig.9).

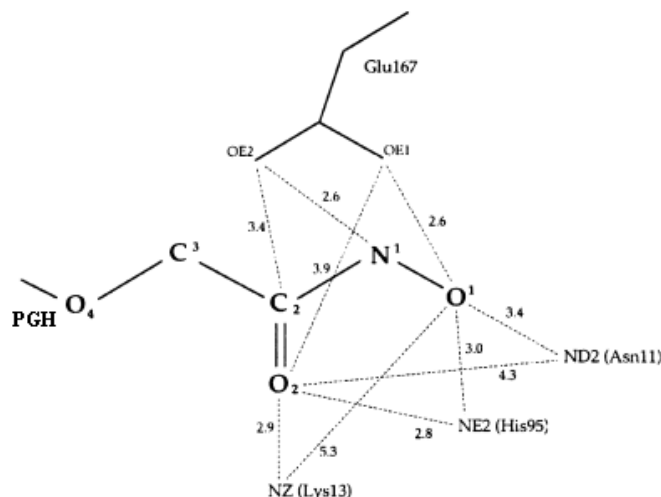


Figura 9. Interacciones importantes del PGH. Los números se refieren a las distancias (Å) entre el ligando y los átomos de las cadenas laterales de los residuos involucrados (Kursula y Wierenga, 2003).

D. Contribución de aminoácidos específicos en la catálisis y estabilidad de la TIM

Se han realizado diversos estudios sobre la TIM de diferentes especies y se ha observado que existen residuos que son conservados a través de la evolución. Entre estos obviamente tenemos a los residuos catalíticos (Glu167, His95 y Lys13) considerados como esenciales para la actividad de la TIM. El cambio de alguno de estos conduce a una disminución en la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) de 140 a 4000 veces (Raines *et al.*, 1986, Komives *et al.*, 1991, Lodi *et al.*, 1994). Por otra parte se ha observado que existen otros residuos que no participan de manera directa en la reacción catalítica pero han sido estrictamente conservados. Para ayudar a entender el papel que juegan en la catálisis y estabilidad de la TIM, se han hecho estudios cristalográficos con análogos del sustrato unidos a la enzima y del catalizador sin ligando, junto con estudios de mutagénesis dirigida. Entre estos residuos se ha estudiado a la Ser96, Glu97, Cys126 y la Thr75 (Lolis y Petsko, 1990, Kursula y Wierenga, 2003, Sampson *et al.*, 1992), que no están en contacto directo con el ligando, pero se sitúan cerca de las cadenas laterales de los residuos catalíticos.

La cadena lateral de la Ser96 orienta a la base catalítica Glu165 (secuencia de la cTIM) y la posiciona de manera óptima para la polarización del carbonilo del sustrato ayudando a la abstracción del protón. En adición este residuo participa en la organización estructural de las moléculas de agua alrededor del sitio activo (Zhang *et al.*, 1999).

La función atribuida al Glu97 no ha sido bien definida pero su cadena lateral esta relacionada con una red de puentes de hidrogeno que envuelven a la Lys12 (Lolis *et al.*, 1990).

En el caso de la Thr75 que se localiza en la asa 3, se observo que puede proveer parte del soporte estructural del sitio activo de la otra subunidad explicando porque únicamente el dímero de la TIM es catalíticamente competente. (Lolis *et al.*, 1990).

La Cys14 es otro de los residuos que ha sido muy estudiado, aunque no es un residuo conservado su importancia se debe a que se encuentra en la región de interfase. En las TIMs de algunos parásitos patógenos, el residuo 14 es Cys, pero en las TIMs de otras especies incluyendo *Homo sapiens*, la posición 14 es ocupada por diferentes aminoácidos los más comúnmente encontrados son Met y Leu, seguidos por Ser, Thr, Gln y Ala. En la TIM de *T. brucei* y las TIMs de *T. cruzi* y *Leishmania mexicana*, la Cys14 es la única cisteína que forma parte de la interfase (Hernández-Alcántara *et al.*, 2002). En adición a las TIMs de tripanosomas, los parásitos patogénicos *Entamoeba histolytica* (Landa *et al.*, 1997), *Plasmodium falciparum* (Ranie *et al.*, 1993) y *Giardia lamblia* (Mowatt *et al.*, 1994) tienen en la interfase la Cys. Debido a esto, la región de interfase ha sido muy importante, es un potencial blanco para el diseño de drogas que específicamente perturben la asociación entre los monómeros de la enzima de los parásitos (Garza-Ramos *et al.*, 1998, Gómez-Puyou *et al.*, 1995, Pérez-Montford *et al.*, 1999, Singh *et al.*, 2001).

1. Cisteína 126

La Cys126 es un residuo localizado cerca del final de la hebra β 5; su átomo de $S\gamma$ forma parte de una de las hebras β del interior del barril α/β y esta en contacto de van der Waals con un oxígeno del Glu catalítico (Kursula y Wierenga, 2003).

Un análisis computacional de la reacción catalítica de la TIM (Åqvist *et al.*, 1996) propone que la Cys126 forma parte de una red de puentes de hidrógeno que conecta, por

medio de moléculas de agua que forman parte del sitio catalítico, a los residuos catalíticos y les permite estabilizar las cargas de sus cadenas laterales.

Por otra parte se ha reportado recientemente que la sustitución de Cys126 por Ala causa una desestabilización de la TIM de levadura (Silverman *et al.*, 2002). En tanto que la sustitución de Cys por Val en la posición 126 disminuye el cociente k_{cat}/K_M 13 veces con respecto a la enzima silvestre, estos resultados se obtuvieron con extractos crudos celulares. Los autores proponen que la aparente pérdida de actividad *in vivo* resultaría en una reducción en la estabilidad o velocidad de plegamiento de la proteína o en un aumento en los niveles de proteólisis. (Silverman *et al.*, 2001).

Otro trabajo realizado sobre este residuo se basó en el estudio de las propiedades catalíticas y de estabilidad de las mutantes C126A y C126S de la TIM de *Saccharomyces cerevisiae*, en el cual se concluyó que la Cys 126 está involucrada en el mantenimiento de la estabilidad de la enzima nativa y en el eficiente plegamiento de la TIM (González-Mondragón *et al.*, 2004).

II. PROBLEMA

Se pretende encontrar las diferencias cinéticas en la reacción de la TIM que se modifican como consecuencia del reemplazo en la cisteína 126 por serina. Correlacionar las propiedades cinéticas y de estabilidad de la mutante, con las características estructurales en el entorno de la cisteína 126 de la TIM. Los estudios en la cisteína 126 aportarán, además, nuevos elementos para tratar de explicar en términos evolutivos, la presencia de residuos estrictamente conservados pero que no son esenciales en las proteínas.

III. HIPÓTESIS

La velocidad de la reacción que cataliza la TIM esta controlada por la difusión, por lo que una mutación que incremente la unión del sustrato, producto u otro intermediario de la reacción conducirá a una disminución tanto del valor de la K_M como de la k_{cat} . Aunado a esto, se espera una disminución de los valores de las constantes de inhibición, por un análogo del sustrato y un análogo del estado de transición de la C126S con respecto a la TIM silvestre.

IV. OBJETIVOS

1. Caracterizar cinéticamente a las mutantes C126S y C126A, compararlas con la TbTIM silvestre.
2. Sintetizar el inhibidor Fosfoglicolohidroxamato.
3. Obtener las constantes de inhibición con el DL-Glicerol 3-fosfato, 2 – Fosfoglicolato y Fosfoglicolohidroxamato tanto de la TbTIM silvestre como de la mutante C126S.

V. METODOLOGÍA

A. Material

Medios de cultivo:

Medio LB (Luria-bactotripton)

Para un litro de medio líquido:

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Para un litro de medio para placas:

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar	25 g

Disoluciones, amortiguadores y reactivos:

Ampicilina:

100 mg/mL

Amortiguador de lisis:

Mes	25 mM pH 6.5
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	0.2 mM

Amortiguador para columna (A):

TEA	100 mM pH 8.0
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Azida de sodio	1 mM

Amortiguador TE:

TEA	100 mM
EDTA	10 mM
pH 7.4	(Ajustar con NaOH 5 M)

Reactivo A:

NaCO ₃
NaHCO ₃

Agente de detección BCA
Tartrato de sodio
NaOH 0.1N

Reactivo B:
CuSO₄.5H₂O

BSA
Albumina estándar 2mg/mL

Mezcla A:
Una parte de ácido ascórbico 10%
Seis partes de molibdato de amonio 0.42% en 1N de H₂SO₄

Amortiguador TRIS HCl:
TRIS HCl 0.1M
pH 8.2

Disoluciones utilizadas en la preparación de geles:

Acrilamida 30% (100 mL):

Acrilamida 30 g
bis acrilamida 0.938 g

Amortiguador electroforético (100 mL):

TRIS 3 M 36.34 g
HCl 1 M 8.43 mL (36.5% - 1.185 g/mL)
SDS 0.3 % 0.3 g

Amortiguador superior (cátodo) (1 L):

TRIS 0.1 M 12.11 g
Tricina 0.1 M 17.92 g

Amortiguador inferior (ánodo) (1 L) :

TRIS/HCl 0.12 M 24.22 g

Glicerol (25 mL) :

Glicerol 79.5 % 19.87 mL
Agua 5.125 mL

Digestora (10 mL):

SDS 10 % 1g

Glicerol 30% 3 mL
 Tris/HCl 0.1 M, pH 6.8 1 mL (1 M)
 Azul de Bromofenol 3 mg
 β -mercaptoetanol 4% 0.4 mL
 SDS 0.1 % 1.0 g

Geles

	16 %	4%
Disolución de acrilamida 30%	3.2 mL	0.533 mL
Amortiguador	2.0 mL	1.0 mL
Glicerol	0.8 mL	-
H ₂ O	-	2.466 mL
Persulfato de amonio 10%	30 μ L	30 μ L
TEMED	3 μ L	3 μ L

Teñidora:

Azul de coomassie 250 mg
 Metanol 400 mL
 Ácido acético 70 mL
 Aforar a 1L con agua destilada.

Desteñidora:

Metanol 500 mL
 Ácido acético 100 mL
 Agua destilada 400 mL

Reactivos:

Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
 Sulfato de amonio
 β -Nicotinamida adenina dinucleotido, forma reducida
 α -Glicerol fosfato deshidrogenasa (Tipo 1: Músculo de conejo)
 Glicerol-3-fosfato dimetil cetal
 NAD⁺, sal de litio
 Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Músculo de conejo)
 Arsenato de sodio
 Ditiotreitól
 Dihidroxiacetona fosfato sal de litio
 Dihidroxiacetona fosfato dimetil cetal
 Ácido fosfoglicólico sal de tri(monociclohexilamonio). Sigma

rac-Glicerol 3-fosfato hexahidratado sal de disodio. Sigma
Glicolamida
Ácido polifosfórico
Carbonato de bario
Hidróxido de bario
DOWEX 50 W resina de intercambio iónico
DOWEX 50WX2-100
Hidroxilamina solución en agua al 50%
Ciclohexilamina
Fosfatasa alcalina

Equipo:

Agitador orbital
Sonicador
Centrifuga
Columna CM-sefarosa
Rotavapor
Speed Vac SC110
Placa de calentamiento y agitación

Instrumentos:

Espectrofotómetro UV-VIS
Espectrofotómetro de arreglo de diodos
FPLC
Potenciómetro

B. Métodos

1. Crecimiento de las células y sobreexpresión de las proteínas

a) **Cultivo en medio sólido.** Células de *Escherichia coli* de la cepa BL21DE3pLysS, transformadas con los genes mutantes y el silvestre y clonados en el vector de expresión pET3a (pET System, Novagen); crecieron en placas de medio LB-agar-ampicilina.

b) Precultivo. 50 mL de medio líquido LB complementado con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina se inocularon con una colonia fresca del cultivo en medio sólido a). Se mantuvo durante toda la noche a 37°C con agitación constante (250 rpm).

c) Cultivo. Los 50 mL del precultivo b), se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 rpm. El botón que se obtuvo de la centrifugación se resuspendió en 1 mL de medio LB con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, con éste se inoculó 1 L del mismo medio, agregando poco a poco hasta que la $D.O_{.600}$ fue de 0.1. Se dejó crecer a 37°C con agitación constante hasta que se alcanzó la fase de crecimiento exponencial del cultivo, $D.O_{.600} \approx 0.7$.

d) Sobreexpresión. La sobreproducción de la proteína se promovió con la adición del inductor IPTG a una concentración final de 0.4 mM. El cultivo se mantuvo por 12 h a 37°C con agitación constante.

e) Cosecha de células. Las células del cultivo d) se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C . El botón se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis.

2. Purificación de TbtIM silvestre y las mutantes de cisteína

Para cada paso, el grado de pureza de la proteína se determinó por técnicas de electroforesis, en geles de poliacrilamida al 16 % en condiciones desnaturalizantes, empleando el método de von Jagow teñidos con azul de Coomassie. Además se determinó la concentración de proteína en cada paso mediante el método del ácido bicinónico (BCA) para valorar el rendimiento de la purificación.

a) Fragmentación celular. Las células resuspendidas en amortiguador de lisis se rompieron por sonicación.

b) Centrifugación diferencial: Las células fragmentadas (extracto total) se centrifugan a 15 000 rpm durante 15 minutos a 4°C . El precipitado se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis con 200 mM de NaCl y se centrifugó nuevamente.

c) Precipitación con sulfato de amonio: El volumen de sobrenadante obtenido se midió y se precipitó adicionando 45% de sulfato de amonio. Se mantuvo así por 12 horas a 4°C y se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 minutos a 4°C . El sobrenadante se llevó a 65% con sulfato de amonio, se mantuvo así por 12 horas a 4°C y se centrifugó. El

precipitado se resuspendió en 6 mL de amortiguador A con 25 mM de NaCl y se dializó en 500 mL del mismo amortiguador.

d) Cromatografía de intercambio iónico: La muestra dializada se inyectó a una columna de CM-sefarosa, previamente equilibrado con amortiguador A y controlada por un equipo de FPLC. La TIM se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 25-150 mM en amortiguador A. En cada una de las fracciones, la proteína se cuantificó en un espectrofotómetro a 280 nm y por actividad catalítica. Las fracciones con mayor actividad y pureza se juntaron y concentraron para su caracterización posterior.

3. Geles von Jagow

a) Preparación de los geles: Se montaron los cristales de la cámara de electroforesis, procurando que sellaran y no presentaran fugas. Se preparó el gel separador (16%) y con ayuda de una pipeta Pasteur se vertió la mezcla dentro de la cámara, llenando $\frac{3}{4}$ partes de ella. Se procedió con precaución a fin de no mezclar las fases, se añadió una capa de agua a la superficie del gel para asegurar su gelificado horizontal. Una vez gelificado el gel separador, se removió el agua con un pedazo de papel filtro y se colocó un peine entre los vidrios. El gel concentrador (4%) se vertió en la cámara con una pipeta Pasteur hasta que se alcanzara el borde de la cámara, procurando no dejar burbujas. Una vez gelificado se retiró el peine.

b) Cámara de corrida: La cámara interna se llenó con el amortiguador superior y la externa con el inferior, procurando cubrir el filamento de platino.

c) Preparación de muestras: Se prepararon mezclando volumen a volumen la de proteína (5-25 μg) con la disolución digestora y se hirvieron por 3 minutos.

d) Electroforesis: Cada muestra se vertió en un carril con ayuda de una pipeta con punta larga. Inmediatamente después de colocar todas las muestras y antes de que empezaran a difundir, se conectó la cámara a la fuente de poder y se le hizo pasar una corriente de 120 V, adecuada para el corrimiento en el gel concentrador (4%). Una vez que el azul de bromofenol penetró en el gel separador y las bandas de las muestras se

alinearon, la corriente eléctrica se incrementó a no más de 160 V y se mantuvo conectada hasta que la banda del colorante se acercó a la parte inferior del gel.

e) Fijación y tinción: Se desmontó la cámara, se retiró el gel de entre las placas de cristal y se procedió a la fijación y tinción con la disolución teñidora. Después del tiempo requerido para la fijación y tinción, el gel se sumergió en la disolución desteñidora. Con cambios frecuentes de esta disolución se eliminó el exceso de colorante. El tiempo requerido para ello fue variable teniéndose cuidado de no excederse en los lavados, pues se corre el riesgo de que las bandas teñidas tenuemente puedan desaparecer. Finalmente se tomó una fotografía al gel para registrar la información obtenida.

4. Determinación de proteína por el método BCA

Se basa en la conversión de Cu^{2+} a Cu^+ en condiciones alcalinas. El Cu^+ es detectado por la reacción con BCA, desarrollándose un color púrpura que puede variar de intensidad dependiendo de la concentración de proteína, en este ensayo la producción de Cu^+ es una función de la cantidad de proteína.

a) Curva estándar: Se utilizó un blanco y por lo menos cinco concentraciones de BSA patrón, en este caso se utilizaron 0.004, 0.008, 0.016, 0.032 y 0.04 mg/mL. Las muestras se llevaron a 50 μl con agua y se les agregó 1 mL de una mezcla de 50 partes de reactivo A por 1 de reactivo B. Posteriormente se incubaron a 30° C por 30 minutos y se midió la absorbancia a 562 nm.

b) Muestras de concentración desconocida: Se realizó el mismo procedimiento, procurando realizar las diluciones necesarias a las muestras con una concentración muy elevada de proteína.

c) Determinación de la concentración de proteína: Se graficaron las absorbancias contra la concentración de BSA patrón, obteniéndose una línea recta en la que se interpolaron los datos de absorbancia del problema para así determinar su concentración.

5. Determinación de la concentración de la TbtIM silvestre

Se realizó una dilución 1:100 de la enzima en el amortiguador TE y se midió su absorbancia a 280 nm y 25° C.

Con la absorbancia obtenida se realizó el siguiente cálculo para obtener la concentración en mg/mL:

$$(A_{280}/\xi)*100$$

$$\xi^{0.1\%}_{280} = 1.298$$

6. Preparación del GAP

a) Preparación de GAP: Se pesaron 1.5 g de DOWEX 50WX2-100, esta resina se lavó con alícuotas de 5 mL de agua (hasta que el agua del lavado tuviera un pH \approx 5). Se pesaron 0.1 g de gliceraldehído 3-fosfato dietil acetal, los cuales se colocaron sobre la resina ya lavada adicionando 5 mL de agua hirviendo. La mezcla se agitó durante 3 minutos en un baño de agua que mantiene la temperatura constante. Posteriormente la mezcla se enfrió y se filtró. El filtrado es liofilizado y el residuo disuelto en 5 mL de amortiguador TE. Después se llevo a pH 7.4 y se congeló.

b) Determinación de la concentración: Se hizo una dilución 1:10 en amortiguador TE y se prepararon las mezclas siguientes:

	Celda 1 (μ L)	Celda 2 (μ L)
Amortiguador TE	963.5	951
NADH	2	2
α -GDH	20	20
GAP dil. 1:10	12.5	25

Se agitaron las celdas y se midió la absorbancia inicial a 340 nm durante 5 minutos. Concluido este tiempo se agregaron 2 µl de TbTIM silvestre concentrada, se agitaron las celdas y se tomó un registro final por 5 minutos. Se utilizó el promedio de los valores iniciales y finales para calcular la concentración utilizando la siguiente fórmula:

$$[((\text{Abs. inicial} - \text{Abs. final})/6.22)/\text{vol. GAP dil.}] * 10$$

La concentración se da en mM

7. Preparación de DHAP

a) Preparación de DHAP: Se pesaron 0.5 g de resina DOWEX 50WX2-100, que se lavó con alícuotas de 2 mL de agua (hasta que el agua del lavado tuviera un pH ≈ 5). Se pesaron 25 mg de dihidroxiacetona fosfato dimetil acetal, se colocaron sobre la resina ya lavada, adicionando 2 mL de agua. Se agitó por 30 segundos y se filtró. Posteriormente se incubó por 4h a 37° C. Se liofilizo y el residuo se disolvió en 2 mL de amortiguador TE, ajustándose el pH a 7.4 posteriormente se congeló.

b) Determinación de la concentración: Se realizó una dilución 1:10 en amortiguador TE y se prepararon las mezclas siguientes:

	Celda 1 (µL)	Celda 2 (µL)
Amortiguador TE	958	918
NADH	2	2
DHAP (dil.)	20	40

Se agitaron las celdas, se midió la absorbancia inicial a 340 nm durante 5 minutos. Después se agregaron 20 µL de α-GDH (dil.1:10) y se hizo el registro final por 5 min. Se tomó el promedio de los valores iniciales y finales, para determinar la concentración conseguida se aplicó la siguiente fórmula:

$$[((\text{Abs. inicial} - \text{Abs. final})/6.22)/\text{vol.DHAP dil.}] * 10$$

La concentración se da en mM.

8. Determinación de la actividad de la TIM

Para medir la cantidad de DHAP que se convierte a GAP, se requiere de un ensayo acoplado a otra reacción enzimática, que permita monitorear un cambio de absorbancia contra tiempo.

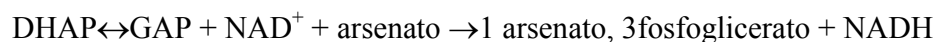
a) De GAP a DHAP:



El NADH tiene una absorbancia específica a 340 nm. Cada molécula de DHAP que se forma a partir del GAP, la α-GDH la convierte a glicerol 3-P, se forma un NAD⁺ y disminuye así la absorbancia del NADH en el tiempo.

El ensayo se realizó a 25° C siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm de 1 mL de mezcla de reacción que contiene amortiguador TE, 0.20 mM de NADH, 1 mM de GAP y 2 µg de α-GDH. La reacción se inicia por la adición de 5 ng de TbTIM silvestre ó 50 ng de la mutante C126S.

b) De DHAP a GAP:



En este caso se realiza el ensayo a 25° C siguiendo el aumento de la absorbancia a 340 nm de 0.7 mL de mezcla de reacción que contiene amortiguador TE, 1 mM de NAD⁺, 4 mM de arsenato, 0.120 mM de DTT, 1 unidad de G3PDH y 5 mM de DHAP para la TbTIM silvestre ó 2 mM para la mutante C126S. La reacción se inicia con la adición de 50 ng de TbTIM silvestre. Para la mutante C126S la reacción se inicio con 250 ng de enzima.

c) Determinación de la actividad: A partir de las graficas de absorbancia vs tiempo tomando los registros del espectrofotómetro se obtienen los Δ_{abs} . La actividad específica de la TIM se calcula con:

$$(\Delta_{\text{abs}}/6.22)/[\text{TIM}]$$

La concentración de la enzima se expresa en mg/mL.

9. Determinación de los parámetros cinéticos

Las constantes se determinan a partir de la medición de la velocidad inicial de reacción a diferentes valores de concentración de sustrato. Se puede efectuar para ambos sentidos de la reacción catalizada por la TIM.

a) De GAP a DHAP: El ensayo se realizó a 25° C siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm de 1 mL de mezcla que contiene amortiguador TE, 0.20 mM de NADH, 2 µg de α -GDH y GAP cuya concentración varía entre 0.07 y 3.0 mM para la TbTIM silvestre. La reacción se inicio por la adición de 5 ng de enzima.

b) Para la mutante C126S se utilizaron concentraciones de GAP de 0.01 a 2 mM y la reacción se inicio con 50 ng de enzima.

c) De DHAP a GAP: Se realizó el ensayo a 25° C siguiendo el aumento de la absorbancia a 340 nm, usando concentraciones de DHAP que van de 0.3 a 10 mM para la TbTIM silvestre en 0.7 mL de mezcla de reacción que contiene amortiguador TE, 1 mM de

NAD⁺, 4 mM de arsenato, 0.120 mM de DTT y 1 unidad de GAPDH. La reacción se inicio con la adición de 50 ng de TbTIM silvestre.

d) Para la mutante C126S se utilizaron concentraciones de DHAP de 0.1 a 3 mM, y la reacción se inicio con 250 ng de enzima.

e) La gráfica con los resultados obtenidos se efectuó con el procesador matemático comercial *OriginPro7* Microcal Co.

En el espectrofotómetro se midieron los cambios de absorbancia por minuto ($\Delta_{\text{abs}}/\text{min}$), a partir de estos se determinó la velocidad inicial a cada concentración de sustrato aplicando la siguiente fórmula:

$$[(\Delta_{\text{abs}}/\text{min})/6.22]/(\text{mg/mL de enzima})$$

La grafica representa la velocidad inicial vs concentración de sustrato, se obtuvo una hipérbola que se ajusta al modelo de Michalis-Menten (ver anexo I).

$$y = P_1 * x / P_2 + x, \text{ donde } P_1 = V_{\text{max}} \text{ y } P_2 = K_M$$

La K_M y la V_{max} se obtuvieron a partir de la gráfica $1/V_o$ vs $1/[S]$ de acuerdo a lo propuesto por Lineweaver-Burk (ver anexo I). Se realizó una regresión lineal obteniéndose una recta y con la ordenada y la absisa al origen se tienen $1/V_{\text{max}}$ y $-1/K_M$ respectivamente.

10. Determinación de las constantes de inhibición

La K_i se determinó a partir de la velocidad de reacción a diferentes valores de concentración de sustrato en la reacción de GAP a DHAP, bajo las condiciones descritas en el apartado anterior, con la excepción de que se agrega a la mezcla de reacción diferentes concentraciones del inhibidor.

Tabla II. Concentraciones de inhibidor utilizadas para la determinación de la K_i .

2PG (mM)	DL-G3P (mM)	PGH (mM)
0.0373	0.43	$7.5 * 10^{-4}$
0.0746	0.86	$3.0 * 10^{-3}$
0.124	1.42	$6.2 * 10^{-3}$
0.1865	1.72	$1.24 * 10^{-2}$

Con los datos obtenidos se generaron las gráficas correspondientes por medio de un procesador matemático comercial (*OriginPro7* Microcal Co.)

Para el cálculo de K_i se siguieron los siguientes métodos:

a) A partir de las velocidades iniciales y las concentraciones del sustrato, se obtuvieron las hipérbolas michaelianas para cada concentración de inhibidor, ajustándose a la siguiente ecuación:

$$y = (V_{\max} * x) / (K_M * (1 + [i]/K_i) + x)$$

b) Se realizaron las gráficas con el método de Lineweaver-Burk para cada concentración de inhibidor, consiguiéndose una K_M aparente (K_M^{app}) para cada una, y se graficó contra cada concentración de inhibidor. Por regresión lineal se obtuvo K_i :

Pendiente (B) = K_M/K_i , la ordenada al origen (A) = K_M , por lo tanto $K_i = A/B$

c) De las gráficas de Lineweaver-Burk se calcularon las pendientes y se trazó la gráfica de éstas contra la concentración de inhibidor correspondiente, se obtuvo una línea recta de la cual :

$$B = K_M/K_i V_{\max}; A = K_M/V_{\max}; \text{ por lo tanto } K_i = A/B$$

11. Síntesis del PGH

La síntesis del PGH se llevó a cabo siguiendo el método reportado por Weber *et al.* (Fig.10).

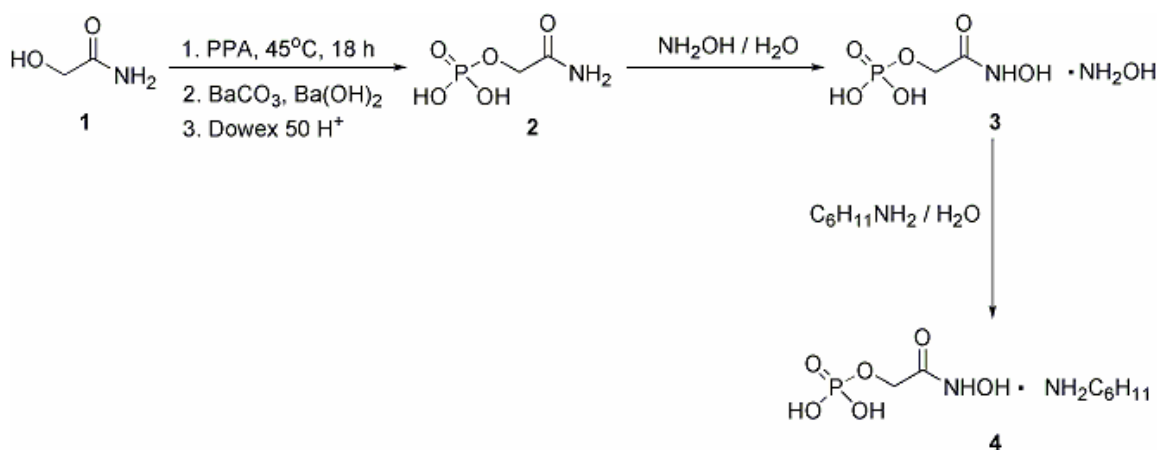


Figura 10. Reacciones llevadas a cabo en la síntesis del PGH.

a) En un matraz redondo de 50 mL se colocaron 0.75g (10 mmol) de glicolamida que fueron disueltos en 4mL (76 mmol) de ácido polifosfórico comercial. El matraz de reacción se colocó en el rotavapor calentando a 45° C, a vacío y con agitación por 1 h. Después se quitó el vacío y se dejó bajo las mismas condiciones durante 18 h más.

b) El matraz de reacción se colocó en un baño de hielo y se le agregaron 20 mL de agua fría posteriormente se adiciono lentamente el $\text{BaCO}_{3(s)}$ hasta llegar a un pH entre 6 y 7, momento en el cual se empieza a formar un precipitado, después con $\text{Ba(OH)}_{2(s)}$ se ajusto hasta pH 8.

c) La mezcla resultante se centrifugo a 20 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se filtró y se liofilizó, obteniéndose 457 mg de un sólido blanco cristalino.

d) 232 mg (1mmol) de la sal de bario de fosfoglicolamida se disolvieron en 2mL de agua en presencia de resina DOWEX 50, agitando en un vortex. Posteriormente se filtró la resina a vacío y al filtrado se le adicionaron 1.3 mL (10 mmol) de hidroxilamina acuosa, se agitó y la solución se mantuvo durante 10 horas a temperatura ambiente. Después la mezcla de reacción se liofilizó.

e) En un vaso de precipitado se disolvieron 0.35 mL de ciclohexilamina en 1mL de agua. Esta disolución se agregó al residuo obtenido en el paso anterior, agitando durante 1 h, después de lo cual se liofilizó.

f) El sólido (ligeramente amarillo) obtenido se recrystalizó en metanol. El compuesto se filtró a vacío y se lavo con acetona obteniendo 60 mg de un sólido blanco.

g) El compuesto se caracterizó por espectroscopia de RMN.

12. Determinación de la concentración de PGH

Se realizó mediante un método espectrofotométrico. Se forma un complejo fosfato-molibdato que se redujo por la acción del ácido ascórbico.

a) **Curva estándar:** Se realizaron disoluciones de ácido fosfórico teniendo las siguientes concentraciones: 0, 0.025, 0.035, 0.05, 0.075. y 0.1 mM, que se llevaron a un volumen de 0.3 mL con amortiguador TRIS HCl. A cada una se le agregó 0.7 mL de la mezcla A y se incubaron 20 minutos a 45° C. La absorbancia se determinó a 660 nm.

Se trazó la gráfica de absorbancia vs concentración obteniéndose una línea recta.

b) **Determinación de la concentración del PGH:** De la solución que se preparó de PGH se tomaron alícuotas de 5 y 10 μ L, a las que se les adiciono 1 μ L de fosfatasa alcalina, se llevaron a 0.3 mL con amortiguador TRIS HCl (se realizó también un blanco). Se incubaron una hora a 37° C, se les agregó 0.7 mL de la mezcla A y se incubaron 20 minutos a 45° C midiéndose su absorbancia a 660 nm.

Los datos de absorbancia obtenidos se interpolan con la curva estándar para determinar su concentración.

I. RESULTADOS

A. Expresión y purificación de las enzimas mutantes

La TbTIM silvestre y las mutantes de Cys126 se purificaron de acuerdo al protocolo reportado para la enzima silvestre (Borchert *et al.*, 1993) con un rendimiento de 30 a 50 mg de enzima pura/L de cultivo. La pureza de las proteínas se determinó por medio de geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS mostrando una sola banda con un peso molecular aproximado de 27 kDa (Fig.11).

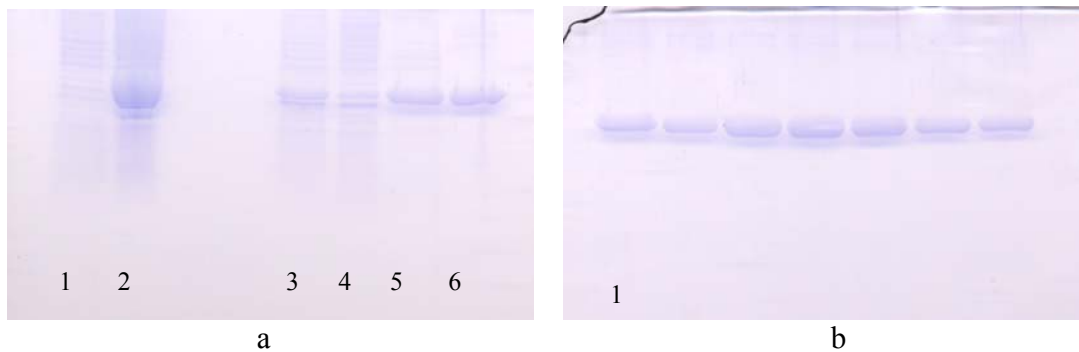


Figura 11. Geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS (mutante C126S). En cada paso de la purificación se determino el grado de pureza de la proteína (ver metodología). Gel a: 1) Proteína antes de inducir; 2) después de inducir; 3) extracto total; 4) Sn1; 5) Sn2; 6) TIM silvestre de *T.brucei* (referencia). Gel b: 1) Antes de pasar por columna; c) fracciones obtenidas después de pasar por columna.

B. Parámetros cinéticos

Se midieron las velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato para la reacción de isomerización catalizada por la TIM. Las mutantes C126A y C126S presentaron un comportamiento hiperbólico de acuerdo a lo propuesto por Michaelis-Menten, a partir de lo cual se calculo la K_M y la k_{cat} para cada mutante.

Como se puede ver en la tabla III los valores de k_{cat} y K_M disminuyeron en ambas mutantes con respecto a la TbTIM. Utilizando el GAP como sustrato se obtuvo un valor de K_M para la C126A dos veces menor que el de la silvestre, mientras que la C126S presento

un cambio mas significativo ya que la K_M fue 14 veces menor. Con DHAP como sustrato la C126A tiene una K_M cuyo valor se encuentra en el rango de la silvestre en tanto que la C126S tiene una K_M cuatro veces menor. Esto sugiere que la C126S tiene aparentemente una mayor afinidad por el sustrato.

Con los valores obtenidos de k_{cat} se observan resultados muy semejantes (tabla III), ya que el valor para la C126S con el GAP disminuye 20 veces en relación a la enzima silvestre en tanto que el valor de k_{cat} para la C126A disminuye a la mitad. Con la DHAP la k_{cat} de la C126S disminuye seis veces, mientras que con la C126A baja 1.5 veces (Fig.12).

Debido a un efecto compensatorio entre el aparente aumento de la afinidad por el sustrato y la disminución global de la velocidad de reacción no se observaron cambios significativos en la relación k_{cat}/K_M de las mutantes de Cys126. Es claro que las mutantes conservan una eficiencia catalítica de más de 70% con respecto a la silvestre (Fig.13).

Además de la Cys en la posición 126, la TbTIM tiene otras dos cisteínas en las posiciones 39 y 14, de estas se han obtenido en el laboratorio mutantes con reemplazos sencillos por alanina o serina y como podemos observar en la tabla III ninguna presenta cambios como la mutante C126S, en general los parámetros cinéticos de estas mutantes no se ven afectados (Fig.12 y 13).

Tabla III. Parámetros cinéticos para la TbTIM y sus mutantes de cisteína.

Enzima	K_M (M)		k_{cat} (seg ⁻¹)		k_{cat} / K_M	
	GAP (10 ⁻⁴)	DHAP (10 ⁻³)	GAP (10 ³)	DHAP	GAP (10 ⁶)	DHAP (10 ⁵)
WT ^a	3.8	1.9	4.33	450	11.0	2.3
C126S	0.275	0.505	0.223	75.4	8.47	1.49
C126A	2.0	1.5	1.85	336.6	9.25	2.2
C39A	4.0	1.8	3.95	400	9.87	2.2
C39S	4.3	2.0	4.23	452	9.83	2.26
C14A	4.03	1.5	5.01	486	12.4	3.2

^a Enzima silvestre

Los parámetros cinéticos fueron determinados en amortiguador TE (ver materiales y metodología) a 25° C y diferentes concentraciones de GAP (0.01-3.0 mM) ó DHAP (0.1-10 mM). Se calcularon los parámetros cinéticos correspondientes a cada enzima utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. Los datos se calcularon por un ajuste de regresión no lineal.

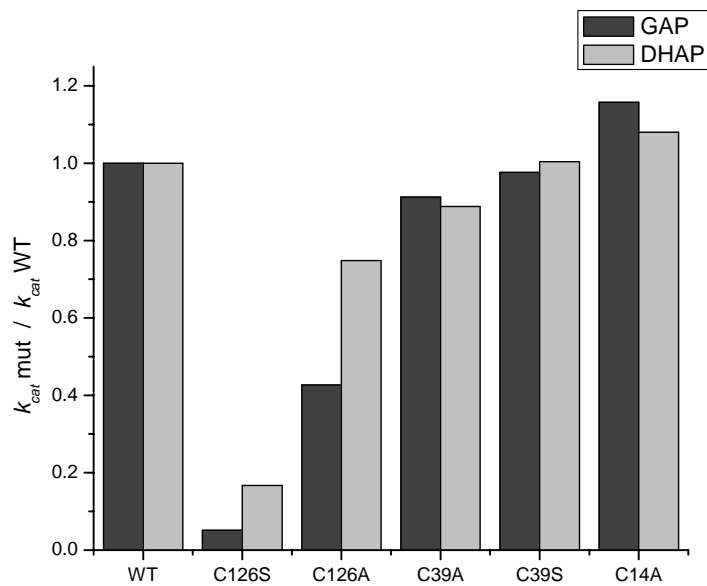


Figura 12. Gráfico comparativo de la relación entre la k_{cat} de las mutantes de cisteína y la k_{cat} de la TIM WT. GAP como sustrato, $(k_{cat})_{WT}$: 4330 seg^{-1} ; DHAP como sustrato, $(k_{cat})_{WT}$: 450 seg^{-1} .

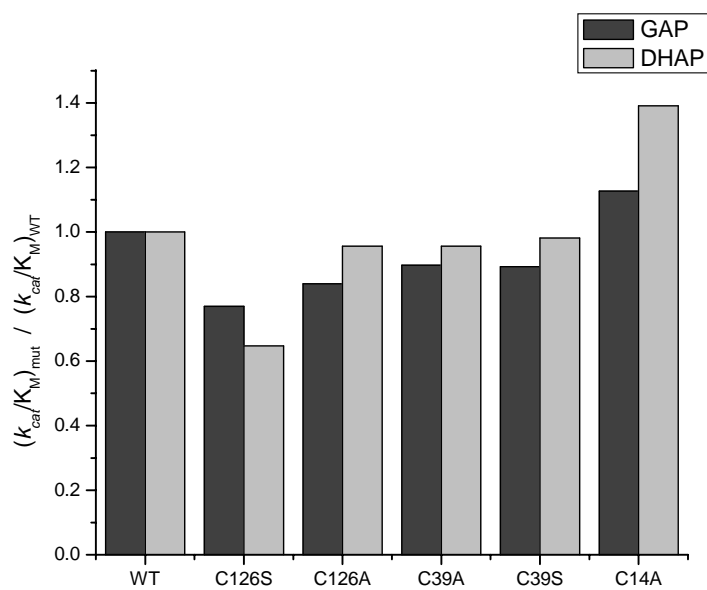


Figura 13. Gráfico comparativo de la relación entre k_{cat}/K_M de las mutantes de cisteína y la k_{cat}/K_M de la TIM WT. GAP como sustrato, $(k_{cat}/K_M)_{WT}$: $11.0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$; DHAP como sustrato, $(k_{cat}/K_M)_{WT}$: $2.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$.

C. Constantes de inhibición

Se realizó la determinación de las constantes de inhibición para la mutante C126S, utilizando tres inhibidores de tipo competitivo. Uno de ellos el análogo del sustrato DL-G3P, y dos análogos del estado de transición, el 2PG y el PGH. Para esto se midieron las velocidades iniciales en función de la concentración del sustrato GAP a diferentes concentraciones de inhibidor.

El inhibidor competitivo se une exclusivamente a la enzima libre, por lo tanto, el equilibrio de formación del complejo ES se verá desplazado hacia reactivos disminuyendo aparentemente la afinidad del sustrato por la enzima es decir aumentando el valor de K_M . Por esta razón observamos que la K_M aumenta (K_M^{app}) conforme la concentración del inhibidor aumenta. La V_{max} no se altera y es cuestión de adicionar mayor cantidad de sustrato para conseguirla. Este comportamiento se presentó con los tres inhibidores y lo podemos ver claramente en las hipérbolas ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten y en las representaciones de Lineweaver-Burk obtenidas para la mutante C126S con cada inhibidor (Fig. 14, 15, 16, 17, 18, 19).

1. Inhibición de la mutante C126S por el 2PG

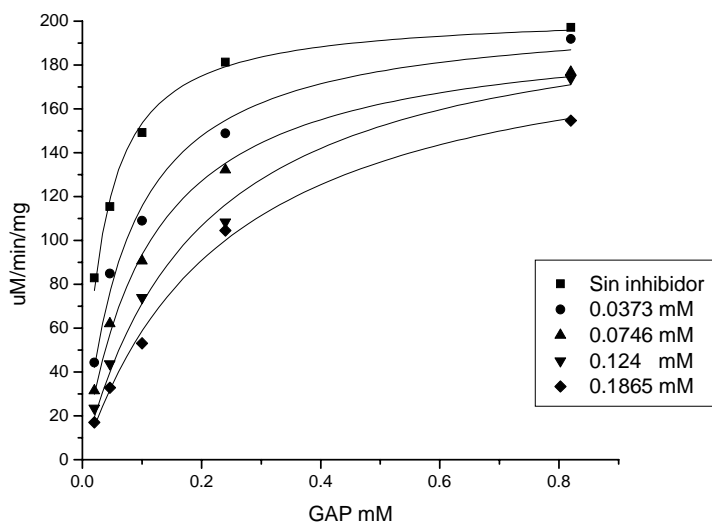


Figura 14. Inhibición de la mutante C126S por el 2PG. Las velocidades iniciales se determinaron a diferentes concentraciones de GAP (0.01-3 mM) en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor 2PG, como se describe en la metodología. Las curvas se ajustaron por medio de una regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten.

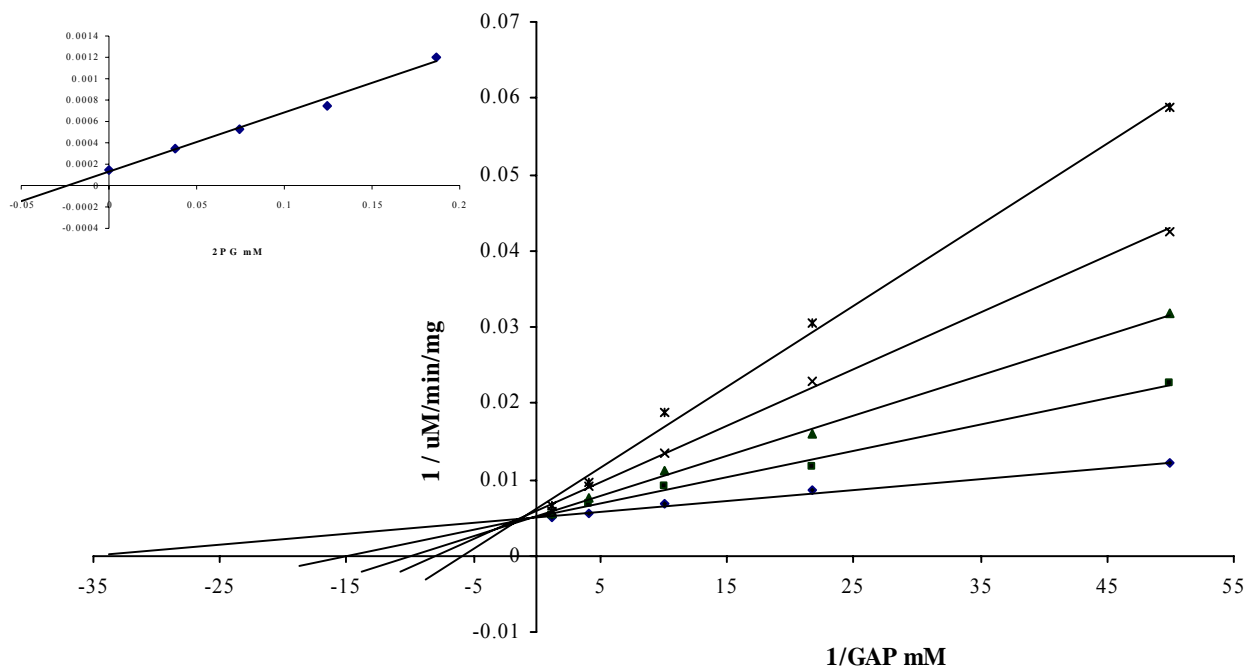


Figura 15. Representación de Lineweaver-Burke donde se muestra que la inhibición de la mutante C126S por el 2PG es de tipo competitivo. Se representa $1/V$ frente a $1/[S]$ a diferentes concentraciones del inhibidor. En el inserto se muestran los valores de las pendientes (K_M^{app}/K_i) derivadas de las gráficas de dobles recíprocos en función de la concentración de 2PG.

◆ Sin inhibidor; ■ 0.0373 mM; ▲ 0.0746 mM; × 0.124 mM; * 0.1865 mM

Por otro lado la linealidad de los gráficos de la K_M^{app}/K_i vs $[I]$ nos indica que realmente se trata de un inhibidor competitivo y a partir de la pendiente de estas gráficas ($K_M/K_i V_{max}$) se puede calcular la K_i (Fig. 15, 17, 19).

Con el análogo del estado de transición 2PG se determinaron las constantes de inhibición para la TIM silvestre y para las mutantes de Cys126 y 14. En la tabla IV se observa que el mayor decremento en la K_i se presenta en la mutante C126S (2.7 veces). La K_i de la C126A disminuyó 1.4 veces mientras que la K_i de la C14A se mantuvo en el rango de lo obtenido para la silvestre.

Tabla IV. Constantes de inhibición de la TbTIM y sus mutantes de cisteína por 2PG.

Enzima	2 PG (mM)
WT	0.059
C126S	0.022
C126A	0.042
C14A	0.053

Los valores de K_i se obtuvieron a partir de los gráficos de K_M^{app}/K_i en función de la concentración de 2PG como se describe en la metodología.

2. Inhibición de la mutante C126S por el DL-G3P

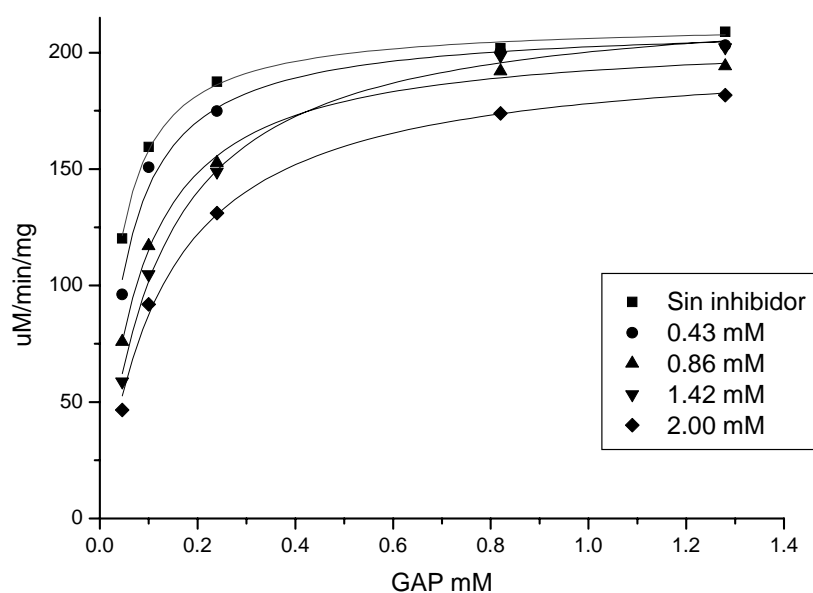


Figura 16. Inhibición de la mutante C126S por el DL-G3P. Las velocidades iniciales se determinaron a diferentes concentraciones de GAP (0.01-3 mM) en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor DL-G3P, como se describe en la metodología. Las curvas se ajustaron por medio de una regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten.

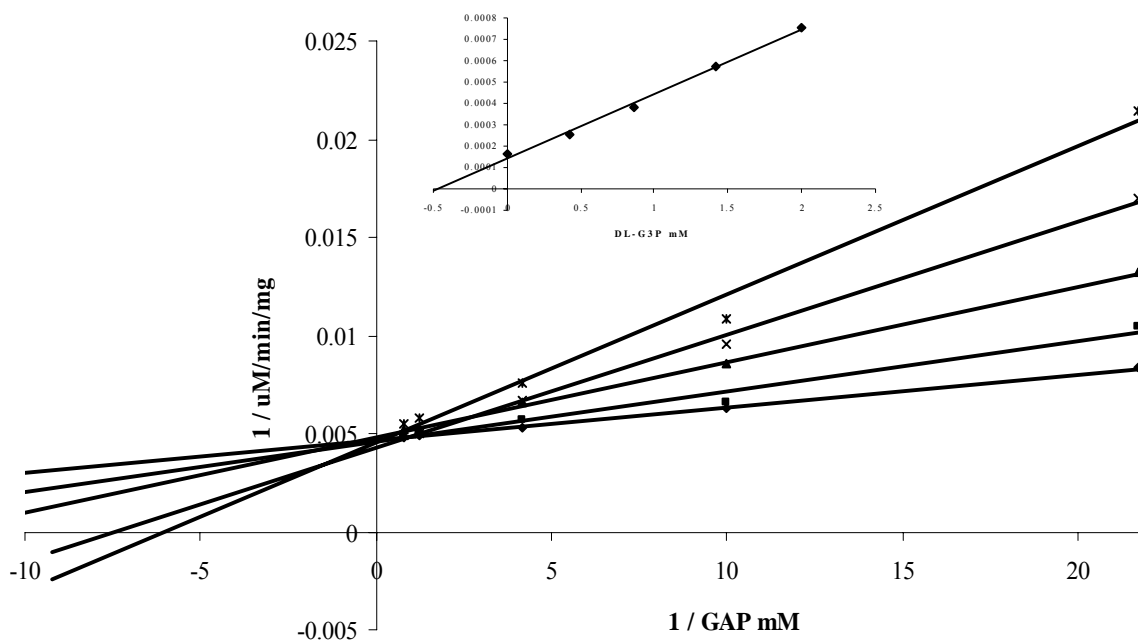


Figura 17. Representación de Lineweaver-Burke donde se muestra que la inhibición de la mutante C126S por el DL-G3P es de tipo competitivo. Se representa $1/v$ frente a $1/[S]$ a diferentes concentraciones del inhibidor. En el inserto se muestran los valores de las pendientes (K_M^{app}/K_i) derivadas de las gráficas de dobles recíprocos en función de la concentración de DL-G3P.

◆ Sin inhibidor; ■ 0.43 mM; ▲ 0.86 mM; × 1.42 mM; * 2.0 mM

Los datos obtenidos con el DL-G3P dan una K_i de 2.19 mM para la TIM silvestre y de 0.5 mM para la mutante C126S (tabla V) lo que representa un aumento en la afinidad por el inhibidor de 4.8 veces con respecto a la TbTIM silvestre.

3. RMN del PGH

El PGH es un análogo del estado de transición de la reacción de isomerización catalizada por la TIM, es un inhibidor muy efectivo que ha sido de gran utilidad para obtener información importante acerca del mecanismo de reacción que sigue esta enzima. El uso de este inhibidor nos ha ayudado a explicar en parte las diferencias cinéticas en la reacción de la TIM que se modificaron como consecuencia del reemplazo en la Cys126.

El PGH se preparó por el método descrito por Weber *et al.* Este compuesto se caracterizó por RMN obteniendo las siguientes señales que nos indican que efectivamente se obtuvo el PGH (Ver anexo II):

RMN ^1H (300MHz, D_2O) δ : 1.16-1.43 (m, 5H), 1.64-2.02 (m, 5 H) ,3.16 (m, 2H) ,4.32 (d, 2H, $J = 6.75$ Hz),

RMN ^{13}C (75.5 MHz, D_2O) δ : 24.6, 25.0, 31.1, 51.1, 63.2, 63.3, 170.5, 170.6.

RMN ^{31}P (121.42 MHz, D_2O) δ : 4.00

4. Inhibición de la mutante C126S por el PGH

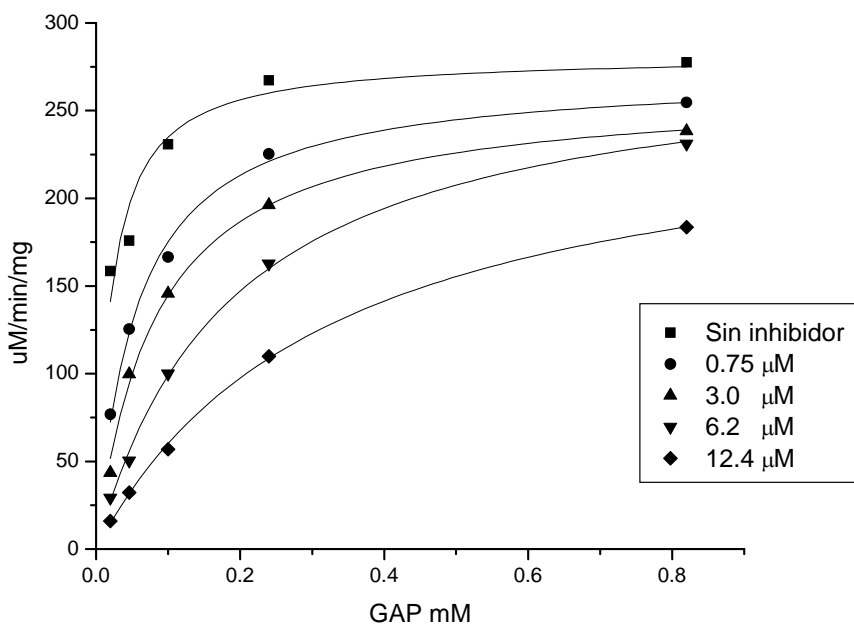


Figura 18. Inhibición de la mutante C126S por el PGH. Las velocidades iniciales se determinaron a diferentes concentraciones de GAP (0.01-3 mM) en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor PGH, como se describe en la metodología. Las curvas se ajustaron por medio de una regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten.

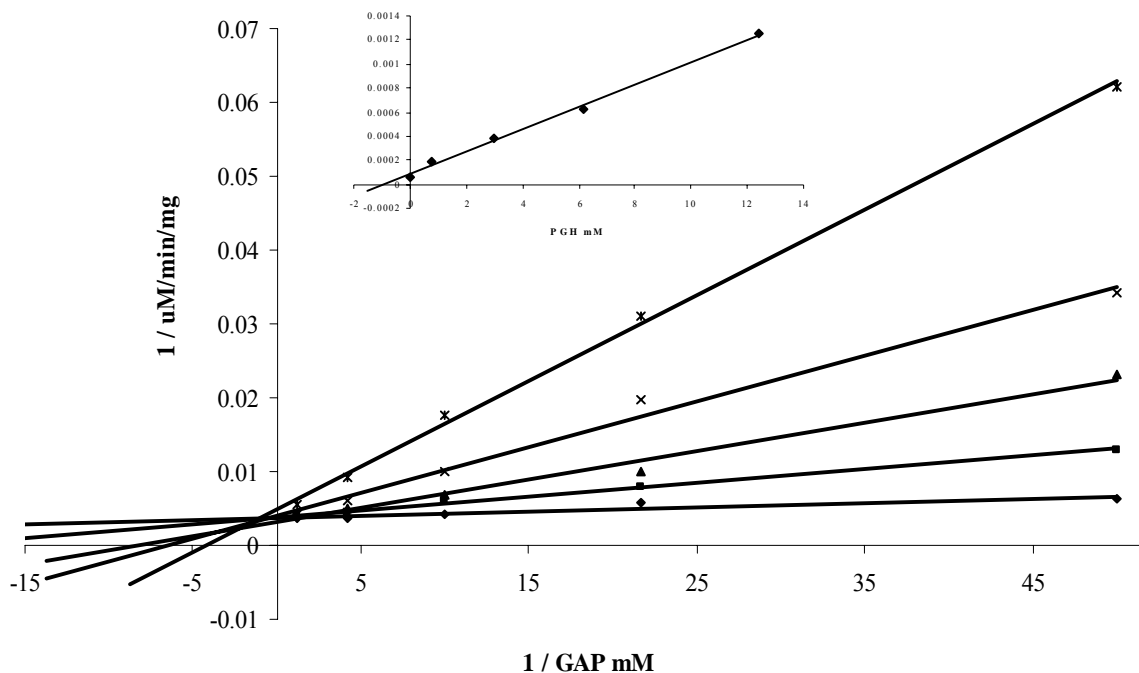


Figura 19. Representación de Lineweaver-Burke donde se muestra que la inhibición de la mutante C126S por el PGH es de tipo competitivo. Se representa $1/V$ frente a $1/[S]$ a diferentes concentraciones del inhibidor. En el inserto se muestran los valores de las pendientes (K_M^{app}/K_i) derivadas de las gráficas de dobles recíprocos en función de la concentración de PGH.

◆ Sin inhibidor; ■ 0.75 μM ; ▲ 3.0 μM ; × 6.2 μM ; * 12.4 μM

El PGH es un inhibidor que tiene una afinidad 150 veces mayor comparada con la del sustrato ($K_i = 11 \mu\text{M}$). La mutante C126S disminuye su afinidad por el PGH 12 veces. Este valor se correlaciona con la disminución en la K_M y k_{cat} de la mutante.

Estos datos nos indican que el reemplazo de la Cys126 por serina da como resultado una unión más fuerte de la enzima con el análogo del estado de transición. También podemos ver que a pesar de que tanto el 2PG como el PGH son análogos del estado de transición, la K_i de la mutante C126S obtenida con el PGH es 24 veces menor que la obtenida con el 2PG debido a que el PGH simula mejor al estado de transición de la reacción catalizada por la TIM (Fig.20).

Tabla V. Valores comparativos de las constantes de inhibición obtenidos con los tres inhibidores para la TIMWT y la mutante C126S.

Enzima	2PG (mM)	DL-G3P (mM)	PGH (μM)
WT	0.059 ± 0.03	2.19 ± 0.18	$11 \pm 7.37 \cdot 10^{-4}$
C126S	0.022	0.5 ± 0.04	$0.9 \pm 1.24 \cdot 10^{-4}$

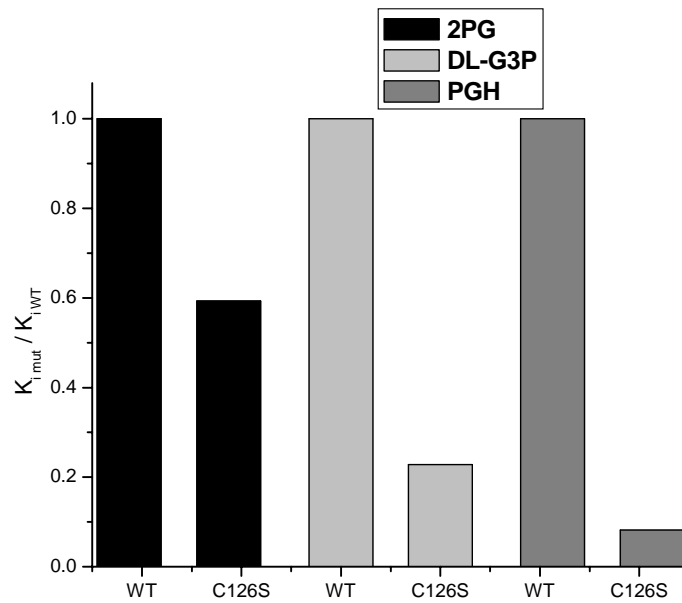


Figura 20. Gráfico comparativo entre la K_i de la TbTIM y la K_i de la mutante C126S con tres inhibidores.

VII. DISCUSIÓN

El reemplazo de la Cys126 por Ser y Ala provocó una disminución en el valor de K_M en relación al de la enzima silvestre. En el caso de la mutante C126S el decremento fue de 13.8 veces y en la C126A fue de 1.9 veces para el sustrato GAP; con DHAP fue de 3.8 y 1.2 veces respectivamente, lo que sugiere que la mutación de la Cys 126 por Ser aumenta en mayor grado la afinidad por el sustrato que la mutación por Ala. Aunque para ambas mutantes se presentan cambios en este parámetro, estos se dan en diferente grado ya que las cadenas laterales de estos residuos presentan distintas características fisicoquímicas; la Ser tiene una cadena lateral menos hidrofóbica que la Cys y la Ala tiene una cadena lateral de una polaridad similar a la de la Cys, pero es de menor tamaño.

A partir de las estructuras cristalográficas de la TIM de alta resolución (0.83 y 1.5 Å) (Kursula, Wierenga, 2003 y Rodríguez-Romero *et al.*, 2002) se ha observado que en el sitio activo abundan moléculas de agua; ninguna interacciona directamente con el átomo de $S\gamma$ de la Cys 126. Las tres moléculas de agua más cercanas están localizadas a 5-6 Å de distancia del $S\gamma$. Una de éstas forma un puente de hidrógeno con el $O\epsilon 2$ del Glu 167 y las otras dos forman puentes de hidrógeno con residuos localizados en las asas 3,4 y 7, o en las hojas β 4,7 y 8. El átomo de $S\gamma$ de la Cys 126 está localizado a una distancia de van der Waals (aproximadamente 4.1 Å) del $O\epsilon 2$ del Glu167, entonces al reemplazar la Cys por Ser cuya cadena lateral es más hidrofílica posiblemente este afectando la distribución de moléculas de agua y por tanto se presente un cambio en la hidrofobicidad del sitio activo. Este cambio puede tener dos efectos con consecuencias opuestas sobre la actividad de la enzima; uno es alterar la basicidad de las especies que interactúan (que el pKa de la base catalítica aumente) mejorando la actividad, o afectar la afinidad de las especies reactivas por el sitio activo. En este caso vemos que la afinidad por el sustrato se vio favorecida. Cabe mencionar que en estudios realizados con otro residuo conservado que es la S96 se encontró que al parecer este residuo juega un papel importante en el posicionamiento adecuado de la base catalítica y sobre el pKa de esta base; el resultado de reemplazar la S96 por Pro afectó la actividad de la enzima, disminuyendo la eficiencia catalítica 20 veces (Zhang *et al.*, 1999).

Otro factor importante es el ambiente electrostático del sitio activo que contribuye a la polarización del sustrato, por lo tanto un cambio en éste se vera reflejado en el valor de la K_M .

En cuanto a la k_{cat} vemos que para la mutante C126S su valor disminuyo 20 veces con respecto a la enzima silvestre y para la C126A disminuyo a la mitad, esto refleja una menor velocidad de reacción. Por otro lado, si comparamos los valores de k_{cat}/K_M de las mutantes y la enzima silvestre, vemos que estas ultimas conservan más del 70% de la eficiencia catalítica, ya que hay un efecto compensatorio entre el aparente aumento de la afinidad por el sustrato y la disminución global de la velocidad de reacción.

La velocidad de la reacción catalizada por la TIM está limitada por la difusión de sus sustratos; por lo que si alguna mutación induce a que la enzima se una más fuertemente al sustrato, al producto o a algunos de los intermediarios de la reacción no solo se vería reflejado en una disminución de la K_M sino también de la k_{cat} .

Los experimentos con los inhibidores nos permitieron confirmar que esto sucede con las mutantes de la Cys126. Las afinidades por el 2PG y PGH aumentaron con respecto a las de la TbTIM silvestre.

La mutante C126S se une más firmemente al 2PG en comparación con las mutantes C126A, C14A y la enzima silvestre, mostrando un decremento en la K_i de 2.7 veces respecto a la silvestre. Para la mutante C126S la K_i con el PGH se vio disminuida 14 veces con respecto a la silvestre. A pesar de que ambos son análogos del estado de transición la unión más fuerte con el PGH se debe esencialmente a que este simula mejor al estado de transición de la reacción catalizada por la TIM. Con el análogo del sustrato DL-G3P la mutante C126S presento un aumento en la afinidad por dicho sustrato de 4.8 veces en comparación con la enzima silvestre.

El PGH simula perfectamente el doble enlace y la conformación cisoide del estado de transición de la reacción catalizada por la TIM. En este caso vemos que la mutante C126S tiene mayor afinidad por este inhibidor de lo que se concluye que la mutación provoca que la enzima interactué mucho más firmemente con el estado de transición, de manera que lo estabiliza aumentando la barrera de transición disminuyendo por lo tanto el valor de la k_{cat} .

Estos resultados concuerdan con lo obtenido en otro estudio, en el cual se trabajó con mutantes de la Cys126 de la TIM de *Saccharomyces cerevisiae* (González-Mondragón *et al.*, 2004). En éste trabajo se determinaron las propiedades catalíticas y de estabilidad de las mutantes encontrándose que los valores de K_M y k_{cat} disminuyen cuatro veces para la C126S y 1.5 veces para la C126A en comparación con los de la silvestre. También se observó en estas mutantes de la TIM de levadura un aumento en la afinidad por el 2PG.

Resulta importante señalar que a partir de experimentos de estabilidad térmica realizados en el laboratorio con estas mutantes de Cys se encontró que presentan un cambio en la estabilidad conformacional, ya que la temperatura media de desnaturalización (T_m) de la enzima silvestre es de 53.6° C y las de las mutantes disminuyen 6° C (C126A) y 9° C (C126S), Estos datos sugieren fuertemente que la Cys126 también está involucrada en el mantenimiento de la conformación nativa de la proteína.

Estos resultados nos ayudan a entender el papel que juega la Cys126, que ha sido conservada a través del desarrollo evolutivo, en la catálisis y estabilidad de la TIM.

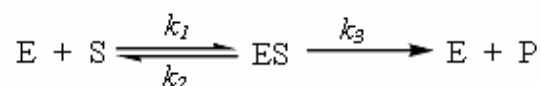
VIII. CONCLUSIONES

- Las mutaciones en la Cys126 provocan una disminución tanto en la K_M como en la k_{cat} lo que nos indica que las enzimas mutantes son más afines por el sustrato, pero que la velocidad catalítica es menor en condiciones de saturación. Por otro lado, la eficiencia catalítica de ambas mutantes es prácticamente igual a la de la TbTIM silvestre.
- De los experimentos con los inhibidores se determinaron constantes de inhibición mucho menores para las mutantes de la Cys126 en comparación con la enzima silvestre; lo que demuestra que la mutación les confirió mayor afinidad por los análogos del sustrato en concordancia con la disminución de la K_M .

ANEXO 1. CINÉTICA ENZIMÁTICA

El estudio de las velocidades de reacción y la forma en que cambian en respuesta a cambios en los parámetros experimentales se conoce como cinética, la cual es un método importante para el estudio de los mecanismos enzimáticos.

En 1913 Leonor Michaelis y Maud Menten propusieron un modelo sencillo que puede explicar las propiedades cinéticas de muchas enzimas. El aspecto crítico de su desarrollo es que se necesita un complejo específico enzima-sustrato intermediario en la catálisis:



Una enzima (E) se combina con el sustrato (S) para formar un complejo ES con una constante de velocidad k_1 . El complejo ES tiene dos destinos posibles. Puede disociarse hasta E y S con una constante de velocidad k_2 , o puede continuar hasta formar un producto (P) con una constante de velocidad k_3 . Se supone que casi nada del producto revierte al sustrato inicial, una condición que se cumple en el estado inicial de la reacción, antes de que la concentración de producto sea apreciable. (Stryer, 1995)

Para muchas enzimas, la velocidad de catálisis, V, varía con la concentración de sustrato, [S], en la forma que muestra la figura 21. V se define como número de moles de producto que se forma por segundo. A una determinada concentración de enzima, V es casi proporcional a [S], cuando [S] es pequeña. Cuando [S] es elevada, V es prácticamente independiente de [S]. Esto se justifica con la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

La cual relaciona la velocidad inicial de una reacción enzimática con la concentración de sustrato y V_{\max} a través de la constante K_M .

A medida que se aumenta la concentración de sustrato la actividad catalítica de una concentración dada de enzima aumenta de forma hiperbólica aproximándose a un valor máximo característico V_{\max} en el que prácticamente toda la enzima se encuentra en la forma

de complejo ES. La concentración de sustrato que da la mitad de V_{\max} es la constante de Michaelis-Menten K_M que es característica de cada enzima con un sustrato dado (Fig.10). Tanto K_M como V_{\max} se pueden medir, teniendo valores diferentes para enzimas distintas.

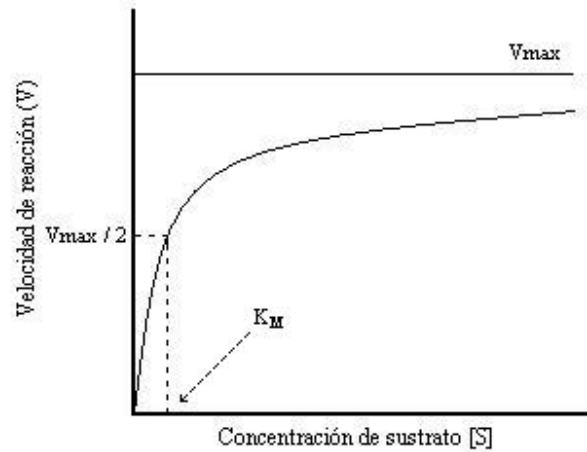


Figura 21. Representación de la velocidad de reacción V, en función de la concentración de [S], para un enzima que obedece a la cinética de Michaelis-Menten.

La velocidad limitante de una reacción catalizada enzimáticamente en condiciones de saturación se describe mediante la constante k_{cat} , también denominada número de recambio. Los parámetros cinéticos k_{cat} y K_M son útiles generalmente para el estudio y comparación de diversas enzimas tanto si sus mecanismos de reacción son sencillos como si son complejos. Cada enzima tiene valores óptimos de k_{cat} y de K_M que reflejan el ambiente celular, la concentración de sustrato encontrada normalmente in vivo por la enzima y la química de la reacción catalizada (Lehninger,1995). Aunque para la comparación de la eficiencia catalítica de diferentes enzimas el parámetro más adecuado la constante de especificidad (k_{cat}/K_M). Esta relación es importante, ya que proporciona una medida directa de la eficacia y la especificidad de la enzima (Mathews, 2002).

A. Determinación de las constantes cinéticas

Para determinar las constantes K_M y k_{cat} se necesita alguna forma de seguir la formación de producto o el consumo de sustrato para medir la velocidad de reacción. Entre los métodos analíticos que más se usan se tiene la espectrofotometría, por su sencillez y exactitud. Sin embargo, una exigencia obvia es que o bien un sustrato o bien un producto de la reacción deben absorber la luz en una región del espectro en la que los demás sustratos o productos no lo hagan. Son ejemplos clásicos las reacciones que generan o consumen NADH. El NADH absorbe con bastante intensidad a 340nm, mientras que el NAD^+ no absorbe en esta región del espectro. Aun en el caso de que en la reacción estudiada no intervenga una sustancia que absorba luz, puede ser posible acoplar esta reacción con otra muy rápida que sí tenga esta característica.

Después de elegir que método es el más conveniente para medir la velocidad de reacción, en principio podríamos mezclar simplemente la enzima y el sustrato y seguir los cambios de la concentración del sustrato y de la velocidad de reacción con el tiempo. A medida de que se consume el sustrato, la velocidad disminuye, hasta alcanzar finalmente el equilibrio. Pero la medida de la velocidad instantánea en momentos concretos durante la reacción resulta difícil y en general inexacta. Habitualmente, resulta más fácil establecer una serie de experimentos, todos ellos con la misma concentración enzimática pero con distintas concentraciones de sustrato, y medir las velocidades iniciales. Puesto que conocemos con exactitud el valor de $[S]$ inicial, y el cambio de $[S]$ frente al tiempo es casi lineal en las fases iniciales, pueden obtenerse datos exactos de V en función de $[S]$ (Mathews, 2002).

Para determinar K_M y k_{cat} se reordena la ecuación de manera que proporcione una gráfica lineal. Hay varios tipos de gráficas posibles, pero la que se utiliza más es una representación doble inversa, también llamada representación de Lineweaver-Burk (Fig. 22). Si invertimos simplemente los dos lados de la ecuación de Michaelis-Menten, obtenemos:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{[S]}{V_{max} [S]}$$

Es decir;

$$\frac{1}{V_o} = \left(\frac{K_M}{V_{max}} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}}$$

Así pues, representando $1/V$ frente a $1/[S]$, debemos obtener una línea recta. En consecuencia, podemos determinar $1/V_{max}$ a partir de la intersección de la recta con el eje $1/V$. Teniendo V_{max} y conociendo $[E]_t$ a partir de la concentración en peso y del peso molecular de la enzima, podemos calcular k_{cat} mediante $V_{max} = k_{cat} [E]_t$. Para obtener K_M extrapolamos el gráfico de Lineweaver-Burk hasta el punto hipotético en que $1/V=0$.

Así pues, la intersección de la representación de Lineweaver-Burk con el eje $1/[S]$ da $-1/K_M$. De otra manera, podemos obtener K_M/V_{max} a partir de la pendiente.

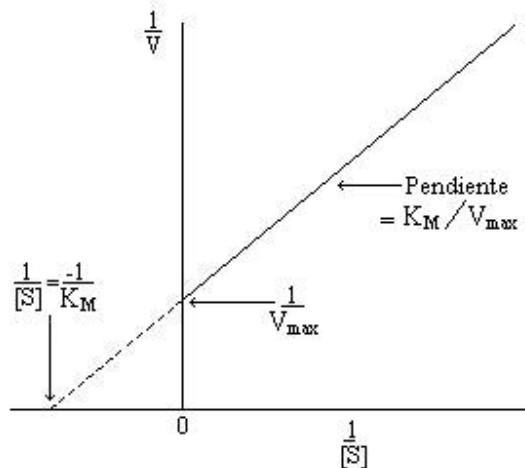


Figura 22. Representación de Lineweaver-Burk.

Una representación de Lineweaver-Burk proporciona una forma rápida de comprobar el cumplimiento de la cinética de Michaelis-Menten y permite evaluar con facilidad las constantes críticas. También permite discriminar los distintos tipos de inhibición y regulación enzimática (Mathews, 2002).

B. Inhibición enzimática

La inhibición de la actividad enzimática por moléculas específicas pequeñas y poriones es importante porque constituye el principal mecanismo de control en los sistemas biológicos. También muchos fármacos y agentes tóxicos actúan inhibiendo a las enzimas, además de que la inhibición enzimática puede suministrar una idea acerca del mecanismo de la acción enzimática y pueden a menudo identificarse residuos importantes para la catálisis empleando inhibidores específicos (Stryer, 1995)

Un inhibidor es un compuesto que se fija a una enzima e interfiere con su actividad, evitando, ya sea la formación del complejo enzima-sustrato o su ruptura a enzima-producto. (Horton,2002).Hay dos amplias clases de inhibidores enzimáticos: reversibles e irreversibles. Los diversos modos de inhibición reversible implican todos ellos la unión no covalente de un inhibidor a la enzima, pero difieren en los mecanismos por medio de los cuales reducen la actividad enzimática y en la forma en que afectan la cinética de la reacción. Estos ayudan al estudio de los mecanismos enzimáticos. Se dividen en los siguientes tipos:

Inhibidor competitivo: Compite con el sustrato por el sitio activo del enzima. Aumenta la K_M aparente, la V_{max} no es alterada (Fig 23). Se pueden subdividir en análogos del sustrato y análogos del estado de transición.

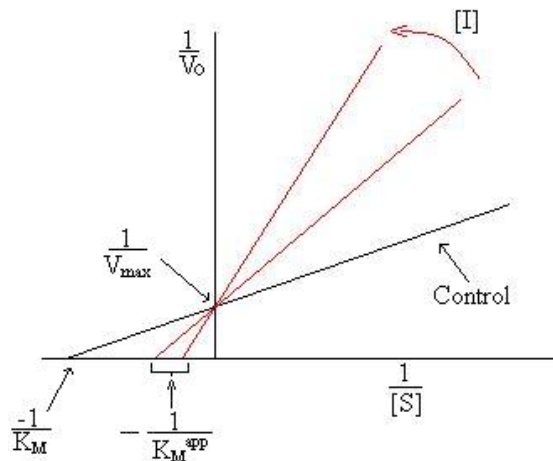


Figura 23. Representación de Lineweaver-Burk. La línea llamada control es el resultado en la ausencia de inhibidor. Las otras líneas son los resultados en presencia de inhibidor, la flecha muestra la dirección del incremento [I].

Inhibidor no competitivo: No compite por el lugar activo sino que afecta al fenómeno catalítico. El inhibidor (I) se une a E o ES. Disminuye la V_{max} y la K_M aparente no es alterada. Modifica la k_{cat} aparente (Fig.24).

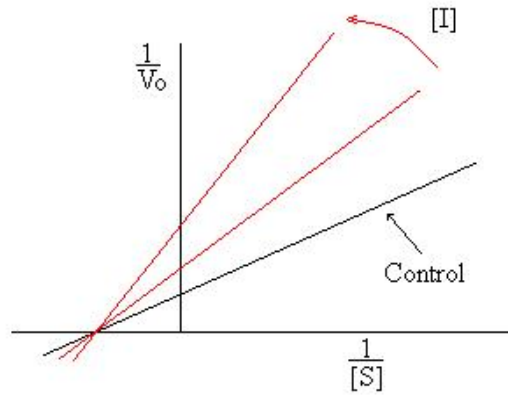


Figura 24. Representación de Lineweaver-Burk. Inhibición no competitiva.

Inhibidor incompetitivo: Sólo se fija al complejo ES. Disminuyen la V_{max} y la K_M (Fig. 25).

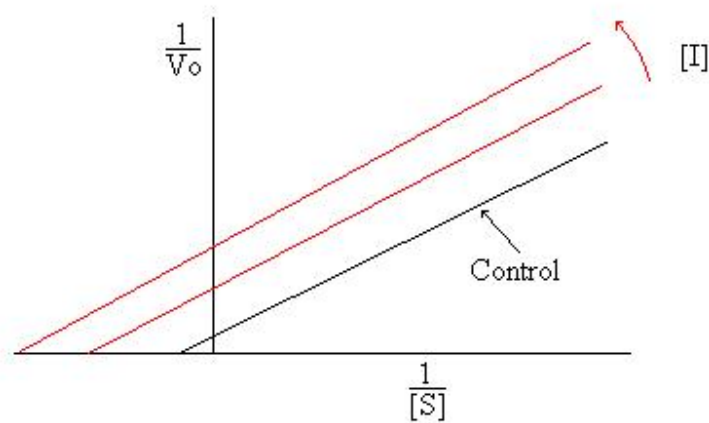
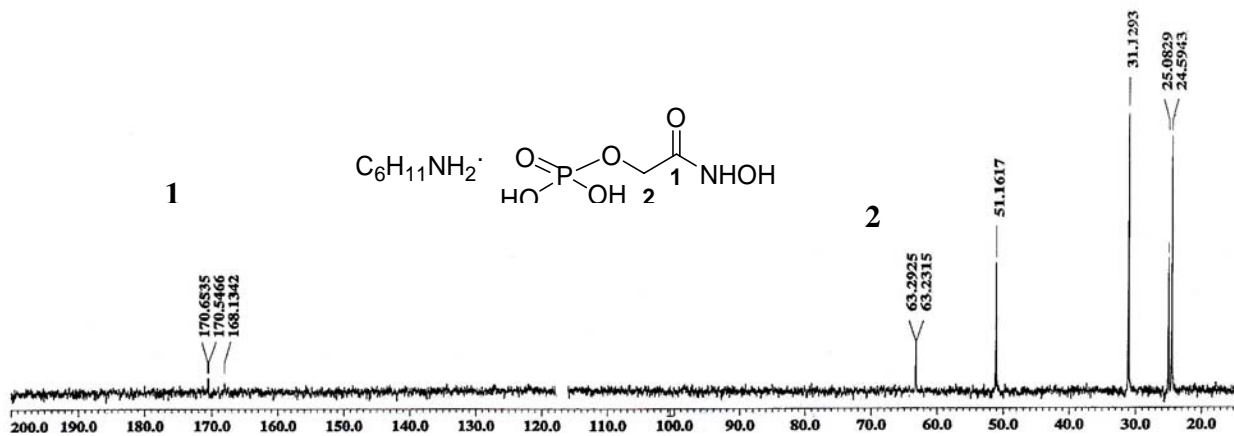


Figura 25. Representación de Lineweaver-Burk. Inhibición incompetitiva.

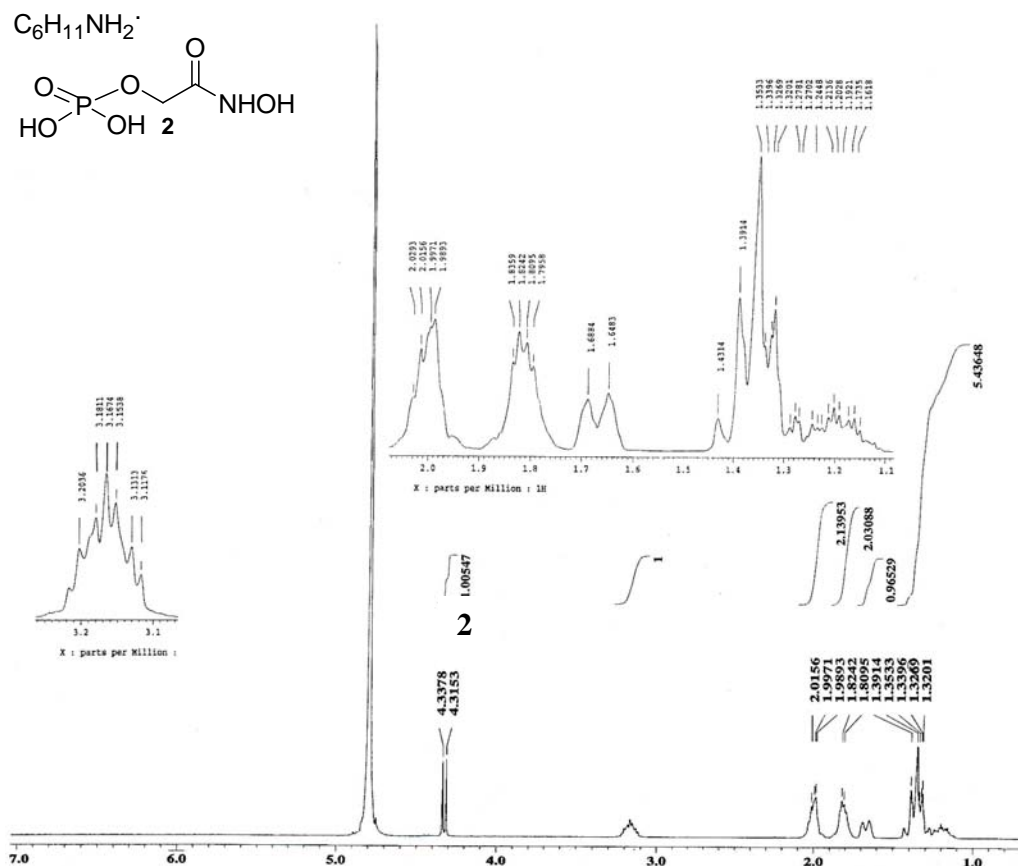
Por otro lado los inhibidores irreversibles son aquellas sustancias que se combinan de forma covalente con las enzimas y las inactivan de manera irreversible. Casi todos los inhibidores enzimáticos irreversibles son sustancias tóxicas, naturales o sintéticas. En la mayoría de los casos estas sustancias reaccionan con algún grupo funcional del lugar activo para bloquear el lugar del sustrato o para dejarlo catalíticamente inactivo (Mathews, 2002). Son muy útiles para estudiar los mecanismos de reacción. Los aminoácidos con funciones catalíticas clave en el sitio activo pueden ser identificados, en ocasiones, determinando que aminoácido se ha unido covalentemente a un inhibidor después de la inactivación de la enzima.

Se han sintetizado un gran número inhibidores irreversibles para facilitar el análisis de los mecanismos enzimáticos y para controlar la actividad enzimática. También se han utilizado estas sustancias para marcar los residuos del lugar activo de una enzima de manera específica con el fin de facilitar su identificación. Cuando se utilizan inhibidores irreversibles de esta forma, se les denomina marcadores de afinidad. En algunos casos, un marcador de afinidad no es reactivo hasta que la enzima actúa sobre él, y en este momento se une de forma irreversible. Estas sustancias se llaman inhibidores suicidas, puesto que la enzima se “destruye” a sí misma al procesar el inhibidor. Son compuestos relativamente poco reactivos hasta que se unen al sitio activo de una enzima específica. El diseño de un inhibidor suicida se hace de tal manera que pueda llevar a cabo los primeros pasos químicos de la reacción enzimática normal. No obstante, en lugar de ser transformado en el producto normal, el inhibidor se convierte en un compuesto muy reactivo que se combina irreversiblemente con la enzima.

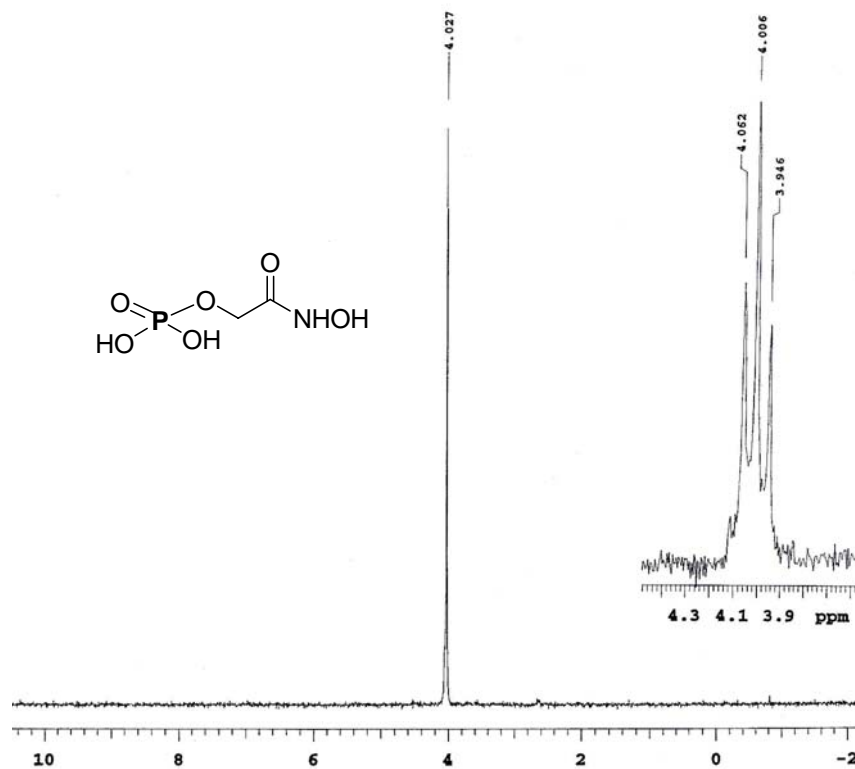
ANEXO II. Espectros de RMN del PGH



Espectro No. 1 Espectro de RMN ¹³C para el PGH. Los números indican la señal correspondiente a cada carbono del PGH.



Espectro No. 2 Espectro de RMN ¹H para el PGH. En este caso se indica la señal correspondiente a los protones que presenta el PGH, las otras señales son protones de la ciclohexilamina.



Espectro No. 3 Espectro de RMN ^{31}P para el PGH.

REFERENCIAS

1. Åqvist J, Fothergill M. Computer simulation of the Triosephosphate isomerase catalyzed reaction. *JBC* 1996; 271 (17): 10010-10016.
2. Blacklow S.C, Raines R.T, Lim W.A, Zamore P.D, Knowles J.R. Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry* 1988; 27(4): 1158-1167.
3. Borchert T.V, Pratt K, Zeelen J.P, y col. Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur. J. Biochem.* 1993; 211(3): 703-710.
4. Campbell I.D , Jones R.B , Kiener P.A , Waley S.G. Enzyme-substrate and enzyme-inhibitor complexes of Triosephosphate Isomerase studied by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Biochem. J.* 1979; 179:607-621.
5. Collins K.D. An activated intermediate analogue. The use of phosphoglycolohydroxamate as a stable analogue of a transiently occurring dihydroxyacetone phosphate derived enolate in enzymatic catalysis. *J. Biol. Chem.* 1974; 249 (1): 136.
6. Davenport R.C, Bash P.A, Seaton B.A, Karplus M, Petsko G.A, Ringe D . Structure of the Triosephosphate Isomerase-Phosphoglycolohydroxamate complex: An analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry* 1991; 30(24): 5821-5826.
7. Farber G.K, Petsko G.A. The evolution α/β barrels enzymes. *TIBS* 1990; 15: 228.
8. Garza-Ramos G, Cabrera N, Saavedra-Lira E *et al.* Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity. Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem* 1998; 253: 684-691.
9. Gómez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga R.A, Rojo-Domínguez A, Pérez-Montford R. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action-studies with Triosephosphate isomerase. *Chem. Biol* 1995; 2:847-855.
10. González-Mondragón E , Zubillaga R.A , Saavedra E , Chánez-Cárdenas M.E , Pérez-Montford R , Hernández-Arana A. Conserved Cysteine 126 in

- Triosephosphate Isomerase is required not for enzymatic activity but for proper holding and stability. *Biochemistry* 2004; 43: 3255-3263.
11. Hartman F.C, La Muraglia G.M, Tomozawa V, Wolfenden R , *Biochemistry* 1975; 14 (24): 5274.
 12. Hernández-Alcántara G, Garza-Ramos G, Mendoza Hernández G, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R. Catalysis and stability of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry* 2002; 41: 4230-4238.
 13. Horton H.R, Moran L.A, Ochs R.S, Rawn J.D, Scrimgeur K.G. Principles of Biochemistry. 3a ed. U.S.A: Prentice Hall, 2002: 130-195.
 14. Johnson L.N, Wolfenden R. Changes in absorption spectrum and crystal structure of Triose phosphate isomerase brought about by 2-Phosphoglycollate, a potential transition state analogue. *J. Mol. Biol.* 1970; 47: 93-100.
 15. Jones R.B, Waley S.G. Spectrophotometric studies on the interaction between Triosephosphate Isomerase and inhibitors. *Biochem. J.* 1979; 179: 623-630.
 16. Joseph-McCarthy D, Lolis E, Komives E.A, Petsko G.A. Crystal structure of the K12M/G15A Triosephosphate isomerase double mutant an electrostatic analysis of the active site. *Biochemistry* 1994; 33: 2815-2824.
 17. Knowles J.R. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* 1991; 350: 121-124.
 18. Komives E.A, Chang L.C, Lolis E, Tilton R.F, Petsko G.A, Knowles J.R. Electrophilic catalysis in Triosephosphate Isomerase: The role of histidine-95. *Biochemistry* 1991; 30: 3011-3019.
 19. Kursula I, Partanen S, Iambrino A.M, Wierenga R.K. The importance of the conserved Arg191-Asp227. salt bridge of Triosephosphate isomerase for folding, stability, and catalysis. *FEBS Lett* 2002; 518:39.
 20. Kursula I, Wierenga R.K. Crystal structure of Triosephosphate isomerase complexed with 2-Phosphoglycollate at 0.83 Å resolution. *JBC* 2003; 278 (11): 9544-9551.

21. Lambeir A.M, Opperdoes F.R, Wierenga R.K. Kinetic properties of Triose phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. Eur. J. Biochem 1987; 168: 69-74.
22. Landa A , Rojo-Domínguez A , Jimenez L , Fernández-Velasco D.A. Sequencing, expression and properties of Triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. Eur. J. Biochem 1997; 247: 348-355.
23. Lehninger A.L , Nelson D.L , Cox M.M. Principios de bioquímica. 2a.ed. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1995:198-237.
24. Lewis D.J, Lowe G. J. Chem. Soc.Chem. Commun 1973; 713.
25. Lodi P.J, Chang L.C, Knowles J.R, Komives E.A. Triosephosphate Isomerase requires a positively charged active site: The role of lysine-12. Biochemistry 1994; 33: 2809-2814.
26. Lolis E, Albert T, Davenport R.C, Rose D, Hartman F.C, Petsko G.A. Structure of yeast Triosephosphate Isomerase at 1.9-Å resolution. Biochemistry 1990; 29: 6609-6618.
27. Lolis E, Petsko G.A. Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate Isomerase and 2-Phosphoglycolate at 2.5-Å Resolution: Implications for catalysis. Biochemistry 1990; 29: 6619-6625.
28. Macarulla J.M, Marino A, Macarulla A. Bioquímica cuantitativa. Cuestiones sobre metabolismo. España: Editorial Reverté, 1992: vol.II: 281-332.
29. Maes D , Zeelen J.P ,Thanki N , *et al.* Proteins 1999; 37: 441-453.
30. Mathews CK, Holde KE, Ahern KG. Bioquímica. 3a ed. Addison Wesley, 2002: 414.
31. Mowatt M.R, Weinbach E.C, Howard T.C, Nash T.E. Complementation of an *Escherichia coli* glycolysis mutant by *Giardia lamblia* Triosephosphate Isomerase. Exp. Parasitol 1994; 78: 85-92.
32. Noble M.E.M, Wierenga R.K, Lambeir A.M. *et al.* Protein. Struct. Func. Genet. 1991; 10:50.
33. Noltman E.A. The enzymes.1972; 6: 326.
34. Pérez-Montfort R, Garza-Ramos G, Hernández Alcántara G *et al.* Derivatization of the interface cysteine of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and

- Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry* 1999; 38: 4114-4120.
35. Pompliano D.L, Peyman A, Knowles J.R. Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: Definition of the functional role of the flexible loop in Triosephosphate Isomerase. *Biochemistry* 1990; 29:3186-94.
 36. Raines R.T , Sutton E.L, Straus D.R, Gilbert W, Knowles J.R. Reaction Energetics of a Mutant Triosephosphate Isomerase in which the active-site glutamate has been changed to aspartate. *Biochemistry* 1986; 25: 7142-7154.
 37. Ranie J, Kumar V.P, Balaram H. Cloning of the triosephosphate isomerase gene of *Plasmodium falciparum* and expression in *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol* 1993; 61: 159-170.
 38. Rice P.A, Goldman A, Steitz T.A. *Proteins: Struct. Func. Genet.* 1990; 8: 334.
 39. Richard J.P. *Enzyme Mechanisms*. London. M.I. Page & A.Williams eds ,The Royal Society of Chemistry 1987: 298.
 40. Rodriguez-Romero A, Hernández-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Kornhauser A, Fernandez-Velasco D.A. Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J.Mol.Biol.* 2002;322(4):669-675.
 41. Rozovsky S, McDermott A.E. The time scale of the catalytic loop motion in triosephosphate isomerase. *J. Mol Biol.* 2001;310(1):259-70.
 42. Sampson N.S, Knowles J.R. Segmental Movement: Definition of the requirement for loop closure in catalysis by Triosephosphate Isomerase. *Biochemistry* 1992; 29: 6609-6618.
 43. Sawyer T.H , Gracy R.W. *Arch. Biochem. Biophys.* 1975; 169: 51.
 44. Silverman J.A , Balakrishnan R , Harbury P.B. Reverse engineering the $(\beta/\alpha)_8$ barrel fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2001; 98: 3092-3097.
 45. Silverman J.A, Harbury P.B. The equilibrium unfolding pathway of a $(\beta/\alpha)_8$ barrel. *J. Mol. Biol.* 2002; 324: 1031-1040.
 46. Singh K.S , Mathial K , Balaram H , Balaram P. Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: inhibition of *Plasmodium falciparum* Triosephosphate isomerase by interface peptides. *Febs Lett* 2001; 501: 19-23.

47. Straus D, Raines R.T, Kawashima E, Knowles J.R ,Gilbert W. Active site of Triosephosphate isomerase: *In vitro* mutagenesis and characterization of an altered enzyme .Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82: 2272-2276.
48. Stryer L. Bioquímica. 4a ed. España: Editorial Reverté,1995:vol.1:181-304.
49. Swinkels B.W , Gibson K.A , Osinga R , Kramer G.H , Veeneman J.H van Boom , Borst P. Characterization of the gene for the microbody (glycosomal) Triosephosphate isomerase of *Trypanosoma brucei*.EMBO J 1986; 5(6) : 1291.
50. Walden H, Bell G.S, Russell R.J.M, Siebers B , Hensel R , Taylor G.L. J. Mol. Biol. 2001; 306: 745-757.
51. Waley S.G. Refolding of Triose phosphate isomerase. Biochem. J 1973; 135: 165-172.
52. Weber P, Fonvielle M, Therisod M. New facile synthesis of phosphoglycolohydroxamic acid and other phosphoglycolic acid derivatives. Tetrahedron letters 2003; 44: 9047-9049.
53. Wolfenden R. Nature 1969; 233:704.
54. Wolfenden R. Binding of substrate and transition state analogs to Triosephosphate isomerase. Biochemistry 1970; 17:3404-3407.
55. Zabori S, Rudolph R, Jaenicke R. Folding and association of Triosephosphate isomerase from rabbit muscle. Z Naturforsch 1980; 35C: 999-1004.
56. Zhang Z , Komives E.A , Sugio S y col. The role of water in the catalytic efficiency of Triosephosphate Isomerase. Biochemistry 1999; 38:4389-4397.
57. Zhang Z, Sugio S, Komives E.A, Liu K.L, Knowles J.R, Petsko G.A, Ringe D. Crystal structure of recombinant chicken Triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex at 1.8-Å resolution. Biochemistry 1994; 33 : 2830-2837.

ABREVIATURAS

BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina.
C126A	Mutante en la cual la Cys126 es reemplazada por Ala
C126S	Mutante en la cual la Cys126 es reemplazada por Ser
cTIM	Triosafosfato isomerasa de músculo de pollo
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DL-G3P	DL-Glicerol 3-fosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
FPLC	Cromatografía Líquida a presión
α -GDH	α -Glicerol fosfato deshidrogenasa
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
G3PDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Mes	(2-[Morfolino] ácido etanesulfónico)
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamina adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamina adenina reducido
PDB	Banco de datos de proteínas
2PG	2-Fosfoglicolato
PGH	Fosfoglicolohidroxamato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TEA	Trietanolamina
TEMED	Tetrametil etilendiamina
TIM	Triosafosfato isomerasa
T _m	Temperatura media de desnaturalización
TRIS	Tris (hidroximetil)aminoetano