



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Producción y caracterización de una  
triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma  
brucei* con la interfase de la Triosafosfato  
isomerasa de *Trypanosoma cruzi*.

T E S I S

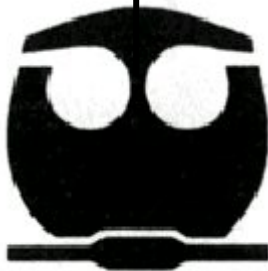
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A :

Itzhel      García      Torres.

Tutor: Dr. Ruy Pérez Montfort



MÉXICO, D. F.

2006



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.

# Producción y caracterización de una triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* con la interfase de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Ruy Pérez Montfort en el laboratorio 201- Ote, en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Ruy Pérez Montfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la Biol. Nallely Cabrera, del departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce la asesoría y el apoyo en el diseño y discusión de los resultados de la Dra. Gloria Hernández Alcántara del Laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría.

El Jurado de Examen de grado estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM

Suplente	Dr. Georgina Garza Ramos	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

# INDICE

## INDICE

### ABREVIATURAS

### 2. INTRODUCCIÓN.

### 3. ANTECEDENTES.

- 3.1 Metabolismo energético en los Tripanosomátidos.
- 3.2 Diferentes blancos terapéuticos usados para el diseño de fármacos antiparasitarios.
- 3.3. La Triosafosfato isomerasa como blanco para el diseño de fármacos antiparasitarios.
- 3.4 Características de la triosafosfato isomerasa.
  - 3.4.1 Características estructurales de la triosafosfato isomerasa
  - 3.4.2 La interfase de la triosafosfato isomerasa.
  - 3.4.3 Diferencias entre TcTIM y TbTIM.
  - 3.4.4 Mutante de TcTIM con la interfase de TbTIM.

### 4. OBJETIVOS.

- 4.1 Objetivo general.
- 4.2 Objetivos particulares.

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

- 5.1 Diseño de Oligonucleótidos Mutagénicos.
- 5.2 Mutagénesis Mediada por PCR.
- 5.3 Clonación en el Vector de Expresión.
- 5.4 Sobreexpresión de la Séptuple Mutante (TbTIM7mutTcTIM).
- 5.5 Purificación de TbTIM7mutTcTIM.
- 5.6 Determinación de la Actividad Catalítica.
- 5.7 Caracterización Cinética de TbTIM7mutTcTIM
- 5.8 Propiedades Espectroscópicas.
  - 5.8.1 Estructura secundaria seguida por Dicroísmo Circular.
  - 5.8.2 Estabilidad Térmica seguida por Dicroísmo Circular.
  - 5.8.3 Estructura terciaria seguida por Fluorescencia intrínseca.
- 5.9 Efecto de los Reactivos de Sulfhidrido en la Actividad de la Enzima.
  - 5.9.1 Ensayos de inactivación por Metilmetanotiosulfonato.
  - 5.9.2 Ensayos de inactivación por el ácido 5, 5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico.
  - 5.9.3 Determinación de la constante de inactivación ( $K_2$ ) para el efecto de los derivatizantes en la actividad de TbTIM7mutTcTIM.
- 5.10 Efecto de la Hidrólisis con Subtilisina en la Actividad de la Enzima

### 6. RESULTADOS

- 6.1. Obtención de la Séptuple Mutante.
- 6.2. Sobreexpresión de la Séptuple Mutante (TbTIM7mutTcTIM), Inducción del gen con 0.4 mM de IPTG a diferentes temperaturas
- 6.3 Purificación de TbTIM7mutTcTIM.
- 6.4 Determinación de la Actividad Catalítica.
- 6.5 Caracterización cinética de TbTIM7mutTcTIM.
- 6.6 Propiedades Espectroscópicas.
  - 6.6.1 Estructura secundaria seguida por Dicroísmo Circular
  - 6.6.2 Estabilidad térmica seguida por dicroísmo circular
  - 6.6.3 Estructura terciaria seguida por Fluorescencia intrínseca.
- 6.7 Efecto de los Reactivos de Sulfhidrido en la Actividad de la Enzima

- 6.7.1 Ensayos de inactivación por MMTS.
- 6.7.2 Ensayos de inactivación por DTNB.
- 6.7.3 Determinación de la constante de inactivación ( $K_2$ ) para el efecto de los derivatizantes en la actividad de TbTIM7mutTcTIM.
- 6.8 Efecto de la Hidrólisis con Subtilisina en la Actividad de la Enzima.
- 7. DISCUSIÓN.
- 8. CONCLUSIONES.
- 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen diamino tetraacético
$f_D$	Fracción desplegada
$\alpha$ -GDH	$\alpha$ - glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
IPTG	Isopropil-b-D tiogalactopiranosido
$k_{cat}$	Constante catalítica
kDa	Kilodaltones
$K_2$	Constante de inactivación de segundo orden
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria-Bertani
MMS	Metil metano tiosulfonato
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NaN <sub>3</sub>	Azida de Sodio
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fenil-metano sulfonil fluoruro
RMS	Root mean square
SCM	Centro Espectral de Masas
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
TEA	Trietanolamina
TE	Trietanolamina/EDTA
TIM	Triosafofosfato isomerasa
TbTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i> .
TbTIM7mutTcTIM	Mutante de TbTIM con la interfase de TcTIM
TcTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> .
TcTIM7mutTbTIM	Mutante de TcTIM con la interfase de TbTIM
T <sub>m</sub>	Temperatura media de desnaturalización
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima
V <sub>0</sub>	Velocidad inicial



## 1. RESUMEN.

*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* son dos parásitos altamente relacionados causantes de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana y la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana respectivamente. Alrededor de 12 a 16 millones de personas padecen enfermedad de Chagas en América Latina. En el caso de *Trypanosoma brucei* en la fase que se encuentra en el torrente sanguíneo, su obtención de energía sólo depende de la glucólisis. La triosafosfato isomerasa es una enzima glicolítica que cataliza la interconversión entre el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona-fosfato. Desde hace algunos años esta enzima ha sido objeto de investigación con el fin de diseñar un fármaco especie específico.

Un alineamiento entre las triosafosfato isomerasas (TIMs) de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) y *Trypanosoma brucei* (TbTIM), muestra una identidad del 73% en la secuencia de aminoácidos y un 82% en los residuos de la interfase. Las estructuras cristalográficas de ambas proteínas se superponen, la diferencia en rms (root-mean-square) para 497 C<sup>α</sup> equivalentes es de 0.96 Å. Ambas poseen una cisteína en la interfase (Cys 14 en TbTIM y Cys15 en TcTIM respectivamente). A pesar de estas similitudes, la susceptibilidad y sensibilidad a reactivos de grupo sulfhidrilo y a la digestión por subtilisina es diferente en ambas enzimas, así mismo cuando ambas proteínas se despliegan por efecto del cloruro de guanidina, sus cinéticas de reactivación de los monómeros desplegados son muy diferentes. La principal pregunta por abordar es ¿por qué si ambas enzimas presentan tal identidad en su secuencia de aminoácidos y poseen propiedades cinéticas similares, se comportan completamente diferente ante el efecto de reactivos derivatizantes y la subtilisina?

Los residuos de la interfase son fundamentales para la actividad enzimática de la TIM, con el fin de saber si las diferencias de la interfase son las que influyen en el distinto comportamiento de ambas enzimas; en nuestro grupo de investigación se generó una mutante de TcTIM, con los aminoácidos de la interfase de TbTIM, cuyas propiedades cinéticas, estructura secundaria y terciaria fueron similares a los de la TcTIM silvestre. La susceptibilidad al metil metano tiosulfonato (MMTS) tampoco presentó cambios, sin embargo, si se observó un aumento en la susceptibilidad a la digestión por subtilisina en la TcTIM mutante. Teniendo esto como antecedente, el principal interés de este trabajo, fue determinar si el comportamiento de TbTIM es igual, o similar, cuando se cambian los aminoácidos de la interfase por los de la TcTIM. Esta mutante de la interfase se produjo por mutagénesis dirigida y posee las siguientes 7 mutaciones: Q18E/Q19S/V46L/L48I/A49P/F86Y/V88I. Esta TbTIM mutante no presenta cambios en su estructura secundaria y terciaria y sus parámetros cinéticos son similares a los de la enzima silvestre. Es una enzima inestable a la dilución por lo que requiere ser incubada a altas concentraciones para mantener su actividad, con respecto a las concentraciones en las que la enzima silvestre es estable. Presenta una mayor susceptibilidad al efecto de derivatizantes como el MMTS y el DTNB y fue más susceptible a la digestión por subtilisina. Se sugiere que el aumento en la susceptibilidad a los agentes derivatizantes con respecto a la enzima silvestre, puede ser debido a la mutación Q18E, ya que en un modelo molecular de esta mutante, se observa una cavidad mayor entre el inicio de la hélice 1 de un monómero y la hélice 3 del monómero adyacente. En cuanto a la hidrólisis por subtilisina las mutaciones en las posiciones 86 y 88 (F por Y y V por I, respectivamente) permiten que la subtilisina reconozca un sitio diferente de corte con respecto a los reportados para la enzima silvestre.



## 2. INTRODUCCIÓN.

Tanto la enfermedad del sueño como la enfermedad de Chagas son dos patologías causantes de un gran número de muertes al año en África y América respectivamente. La tripanosomiasis africana, o enfermedad del sueño, se encuentra distribuida en 36 países de África en donde alrededor de 60 millones de personas se encuentran en riesgo de infección, sólo de 3 a 4 millones tienen acceso a los programas de detección y tratamiento de la enfermedad, debido a los escasos recursos y 1.5 millones de personas se encuentran infectadas. El caso de la tripanosomiasis americana es similar, ya que cerca de 16 a 18 millones de personas en América del Sur se encuentran infectadas y alrededor de 5 a 6 millones presentan complicaciones crónicas incurables. Anualmente se reportan 13,000 muertes. En algunos casos la fase inicial es asintomática de tal manera que la enfermedad se detecta cuando el paciente se encuentra ya en la fase crónica.

El tipo de tratamiento de la tripanosomiasis africana depende de la fase en la que se encuentre la enfermedad. Los fármacos de elección para las fases iniciales (Suramina y Pentamidina) presentan efectos adversos severos, para el tratamiento de la fase tardía existen sólo dos fármacos disponibles en el mercado (Melarsoprol y Eflornitina), que también presentan efectos colaterales no deseados. Además ninguno de estos fármacos puede ser administrado por vía oral. En el caso de la enfermedad de Chagas, los fármacos de elección para el tratamiento (Benznidazol y Nifurtimox), sólo atacan al parásito cuando la infección se encuentra en la fase aguda; en la fase crónica estos fármacos pierden eficacia. A pesar de que en algunos países latinoamericanos hay estrategias para el tratamiento de niños en la fase latente y crónica de la enfermedad, no se ha definido la eficacia de tales estrategias. Por otro lado, recientemente se han mejorado las estrategias para el control de la enfermedad de Chagas mediante la eliminación del insecto vector.

El desarrollo de vacunas no ha sido eficiente debido a que los tripanosomas africanos emplean un elaborado sistema de variación antigénica, y *T. cruzi* es un parásito intracelular. Debido a estos inconvenientes en el tratamiento de estas enfermedades con gran impacto social y económico, desde hace casi diez años, varios grupos de investigación, incluyendo el nuestro, han estudiado a la triosafosfato isomerasa (TIM) de estos parásitos, con el fin de poder diseñar un fármaco que inactive a la enzima y por consiguiente al parásito, ya que en la fase sanguínea de estos parásitos, dependen

particularmente de la glicólisis para la obtención de ATP. En particular, se ha centrado la atención en la cisteína de interfase (14 en la TIM de *T. brucei* (TbTIM) y 15 en la de *T. cruzi* (TcTIM) respectivamente), aminoácido no conservado, que al derivatizarse con agentes de grupo sulfhidrilo, hace que la enzima pierda actividad, debido a que pierde su estructura cuaternaria y el dímero activo se disocia. Este residuo de cisteína se encuentra en la interfase del dímero y es adyacente a la Lys catalítica, que en TbTIM corresponde a la posición 13 y en TcTIM a la posición 14.

En este trabajo estamos interesados principalmente en la interfase de la TIM, ya que a pesar de que TbTIM y TcTIM presentan alta similitud en su secuencia de aminoácidos y en los residuos de la interfase, se comportan en forma completamente diferente ante los agentes derivatizantes. Se cuenta ya con una mutante de TcTIM que posee los aminoácidos de la interfase de TbTIM. El objetivo del presente trabajo fue construir y caracterizar una mutante de TbTIM con los aminoácidos de la interfase de TcTIM, para poder compararla tanto con las enzimas silvestres, como con la mutante de la interfase de TcTIM mencionada.

### 3. ANTECEDENTES.

#### 3.1 Metabolismo energético en los Tripanosomátidos.

La familia *Trypanosomatidae* está formada por eucariotes parásitos unicelulares y flagelados que infectan diversos organismos como plantas y animales. *Leishmania* y *Trypanosoma* spp son miembros altamente relacionados de esta familia con ciclos de vida complejos que involucran a un insecto vector y un vertebrado como hospedero (Fig. A). El tripanosoma africano (*Trypanosoma brucei*) es el causante de la enfermedad del sueño en el humano y la enfermedad de Nagana en animales tanto domésticos como silvestres, por su parte *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas en América; y el género *Leishmania*, causante de lesiones localizadas como la leishmaniasis cutánea (*L. mexicana*), la leishmaniasis mucocutánea (*L. brasiliensis*) y algunos padecimientos fatales como la leishmaniasis visceral (*L. donovani*).

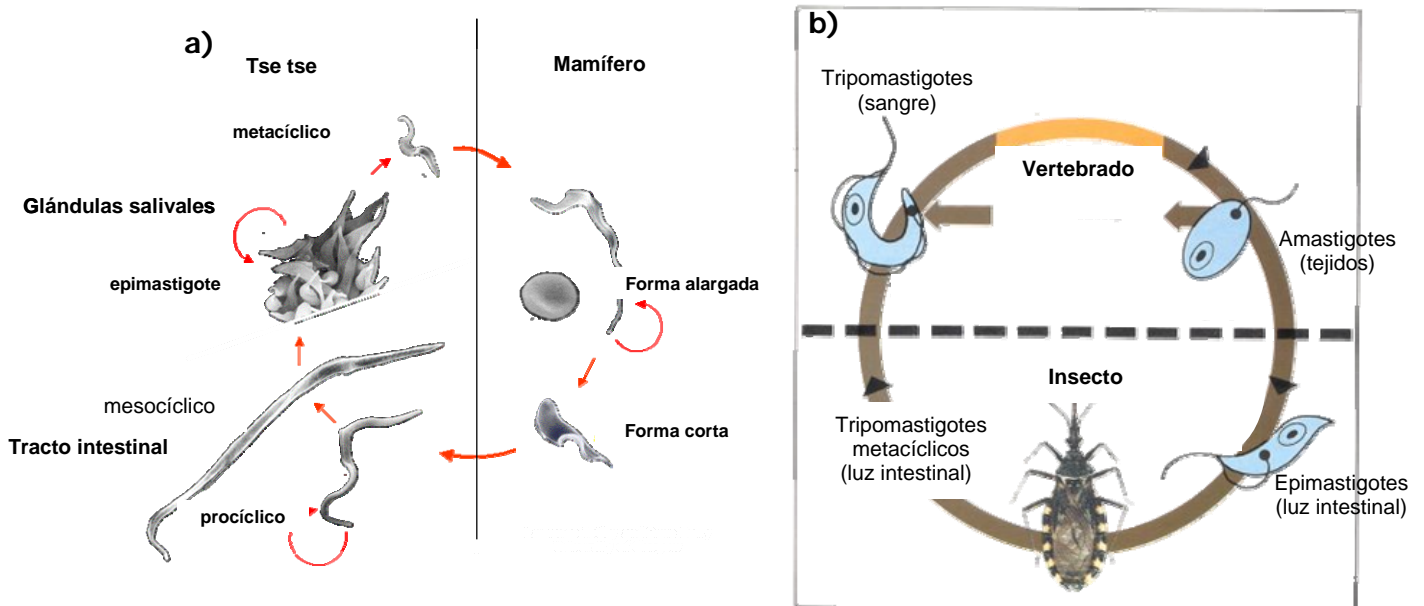


Fig A. Ciclo de vida de algunos parásitos de la familia *Trypanosomatidae*. a) *Trypanosoma brucei*, b) *Trypanosoma cruzi*. Ambos ciclos de vida incluyen a un insecto vector y a un vertebrado como hospedero.

Las principales diferencias en el metabolismo de las diferentes especies de tripanosomátidos se encuentran en las rutas de degradación de carbohidratos. Durante su ciclo de vida, los parásitos obtienen su energía a partir de los sustratos que se encuentren disponibles. La glucosa es la principal fuente de energía en las fases

infectivas en el hospedero. Algunas cepas de *Trypanosoma* y *Leishmania* prefieren aminoácidos como la prolina en lugar de glucosa como fuente de energía, sin embargo la glicólisis se encuentra siempre activa. Se ha reportado que los tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei* son de las células eucarióticas que poseen las más altas velocidades de consumo de glucosa, por lo menos 10 veces mayor que muchas otras células del hospedero mamífero; mientras que *Leishmania* y *T. cruzi*, presentan bajas velocidades, similares a las que presenta el tripomastigote procíclico de *T. brucei* (Cazzulo J.J., 1992).

Los tripanosomátidos degradan carbohidratos por la vía de la glicólisis y en todos ellos, gran parte de las enzimas glicolíticas se encuentran compartamentalizadas en organelos especializados llamados glicosomas (Opperdoes y Borst, 1977), que sólo se encuentran en organismos de la clase *Kinetoplastida*, en los cuales también se encuentran enzimas peroxisomales. Usualmente aparecen como organelos esféricos con un diámetro de 0.7  $\mu\text{m}$  y se distribuyen al azar a través de la célula (de Souza W., 2002). El número de glicosomas y el área que ocupan en el citoplasma de los tripanosomátidos varía entre especies y la etapa del desarrollo en la misma especie. La forma sanguínea de *T. brucei* posee un gran número de glicosomas y la mitocondria se encuentra pobremente desarrollada, mientras que en la forma procíclica se encuentran pocos glicosomas y la mitocondria se encuentra completamente desarrollada (Tetley y Vickerman, 1991). Opperdoes y colaboradores (1984) estimaron que la forma sanguínea de *T. brucei* contiene alrededor de 230 glicosomas que comprenden aproximadamente el 4 % del volumen celular total. En el caso de otros tripanosomas se han encontrado alrededor de 50 glicosomas (Soares y De Souza, 1988).

Las enzimas glicolíticas son muy abundantes en este organelo y representan el 90% del contenido proteico total del glicosoma (Misset, M. *et al.* 1986). Se ha postulado que el confinamiento de estas enzimas en un volumen pequeño da lugar a que las enzimas glicolíticas se encuentren limitadas por la difusión de los metabolitos (Opperdoes, F.R., 1987; Misset, M. *et al.*, 1986; Aman, R.A. *et al.*, 1985); sin embargo cálculos realizados en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei* muestran que el flujo glicolítico se encuentra limitado por la actividad catalítica de las enzimas y no por la difusión de los metabolitos de una enzima a otra (Bakker, B.M. *et al.* 1995). Otros estudios computacionales, en los que se utiliza un modelo matemático detallado de la

glicólisis en el parásito, han revelado que la compartimentalización de la glicólisis en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei* previene a la célula de una acumulación excesiva de ciertos metabolitos como la glucosa 6-fosfato y la fructosa 6-fosfato (Bakker, B.M. *et al.* 1997 y Bakker, B.M. *et al.* 2000).

Una observación interesante es el hecho de que las enzimas glicolíticas aisladas a partir de los glicosomas (excepto la glucosa fosfato isomerasa), son enzimas básicas con valores de punto isoeléctrico entre 8.8 y 10.2, que son de 1 a 4 unidades más altos que los que poseen las mismas enzimas encontradas en el citosol de células de mamífero (Misset O., *et al.* 1986)

Una diferencia notable entre las rutas glucolíticas en otros organismos y en los tripanosomas es la regulación en puntos clave; por ejemplo la hexocinasa y la fosfofructocinasa son reguladas por intermediarios glicolíticos y por efectores alostéricos heterotrópicos, sin embargo las enzimas glicolíticas en tripanosomas son insensibles a estos efectores y probablemente esto sea debido a la compartimentalización de tales enzimas y a la baja permeabilidad de la membrana del glicosoma a algunos intermediarios.

El piruvato, producto final de la glicólisis, se degrada en la única mitocondria de estos organismos. Sin embargo la participación de rutas mitocondriales en la degradación de carbohidratos varía ampliamente, debido a que la diferenciación de la mitocondria varía de acuerdo a la fase en la que se encuentre el parásito. En algunas etapas los parásitos poseen una mitocondria en donde se lleva a cabo normalmente el ciclo de Krebs y puede degradar completamente el piruvato a dióxido de carbono, mientras que en otras etapas el piruvato sólo se degrada hasta acetato.

En el torrente sanguíneo del huésped, la forma alargada de *T. brucei* posee la ruta metabólica de degradación de glucosa más simple, siendo el piruvato el principal producto final. Esta forma adaptativa es completamente dependiente de la glicólisis como fuente de ATP. La glucosa es la fuente preferencial de energía, la fructosa, manosa y el glicerol son utilizados como sustratos alternativos. Esta forma de *T. brucei* posee una mitocondria pobremente desarrollada, por lo que no se lleva a cabo el ciclo de Krebs.

La glucosa se degrada hasta 3-fosfoglicerato dentro de los glicosomas, las últimas tres enzimas de la ruta se encuentran en el citosol (Fig. 1). La síntesis neta de ATP

ocurre en el citosol, en la reacción catalizada por la piruvato cinasa, mientras que dentro de los glicosomas hay consumo de ATP por la hexocinasa y la fosfo-fructocinasa que es balanceada por la producción de ATP de la fosfo-glicerato cinasa. El balance redox en el glicosoma se mantiene, ya que el NADH producido por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es reoxidado vía el oxígeno molecular por la glicerol-3-fosfato oxidasa mitocondrial. Los electrones son transferidos a través de una lanzadera redox que involucra una glicerol 3-fosfato deshidrogenasa glicosomal y un posible transportador en la membrana glicosomal, el cual intercambia glicerol 3-fosfato por dihidroxiacetona-fosfato

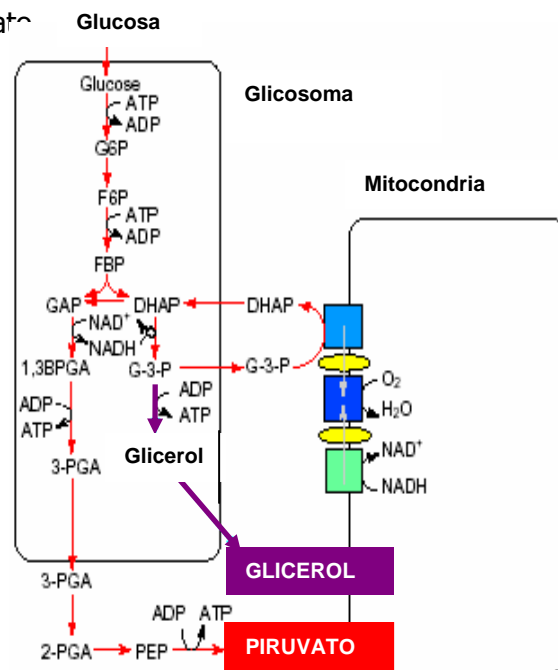


Fig 1. Rutas de degradación de carbohidratos en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*. Tomado de Tielens y Van Hellemond, 1998

Una vez que las forma alargada, que se encuentran en el torrente sanguíneo se transforman en la fase procíclica en el insecto vector, el piruvato no se excreta, se metaboliza dentro de la mitocondria, en donde se decarboxila a acetil-Co A por la piruvato deshidrogenasa y después se degrada hasta dióxido de carbono en el ciclo de Krebs (Fig. 2). Una gran parte del acetil-CoA, no entra al ciclo de Krebs sino que se convierte en acetato.

Otras diferencias entre la forma procíclica que se encuentra en el insecto vector y la forma alargada localizada en el torrente sanguíneo del huésped, se encuentran en el metabolismo glicosomal; por ejemplo en los procíclicos, la fosfoglicerato cinasa se

localiza predominantemente en el citosol y el 1,3 bifosfoglicerato no se convierte en 3-fosfoglicerato dentro del glicosoma como en las formas alargadas, si no que esto ocurre en el citosol. Además, a diferencia de las formas alargadas, en los parásitos procíclicos se encuentran bajos niveles de piruvato cinasa en el citosol.

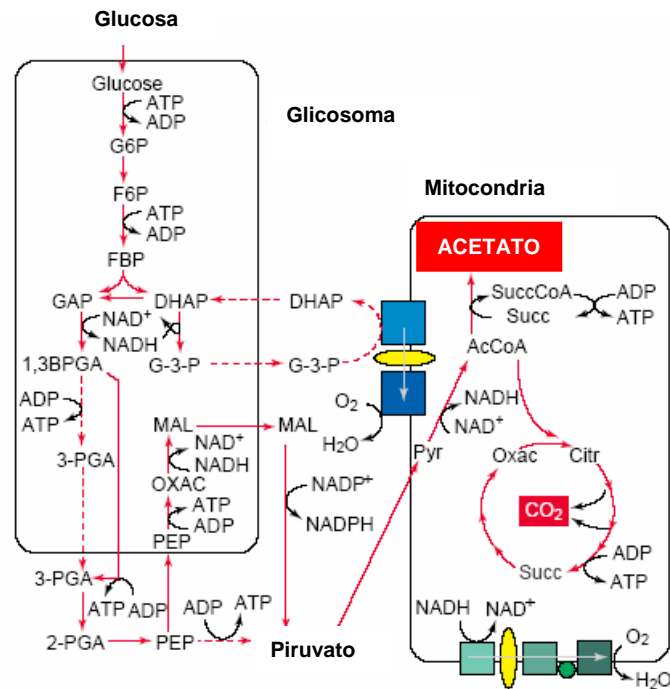


Fig 2. Rutas de degradación de carbohidratos en la forma procíclica de *Trypanosoma brucei*. Tomado de Tielens y Van Hellemond, 1998

Las formas intermediarias y cortas que se encuentran en el torrente sanguíneo poseen una mitocondria más desarrollada y no dependen únicamente de la glicólisis para la generación de energía. La transición en el metabolismo energético entre la forma alargada del parásito que es dependiente de la glicólisis y los parásitos procíclicos que son dependientes del ciclo de Krebs, ocurre en el torrente sanguíneo.

El metabolismo de *Trypanosoma cruzi*, es semejante en forma al de *Leishmania* (Fig. 3), ya que en todas las fases del ciclo de vida ambos poseen actividad en el ciclo de Krebs y una cadena respiratoria semejante a la encontrada en los mamíferos, cuyo producto final es la generación de ATP. *Trypanosoma cruzi* cataboliza la glucosa, sólo parcialmente hasta dióxido de carbono generando productos finales de degradación como acetato, piruvato y succinato.





El diseño de fármacos con base en la estructura se ha empleado para el desarrollo de compuestos que solo inhiben a las enzimas glicolíticas de tripanosomátidos, sin que se presente algún efecto en las correspondientes enzimas del humano. Por ejemplo se han diseñado derivados de adenosina que compiten con la unión del  $\text{NAD}^+$  por la GAPDH del parásito sin algún efecto en la enzima del humano; minutos después de agregar estos compuestos a cultivos de la forma sanguínea de *T. brucei*, la producción de los derivados de glucosa se detiene y el parásito pierde motilidad con su consecuente lisis. (Aronov, A.M. *et al.*, 1998, 1999).

Hasta el momento se han desarrollado algunos inhibidores selectivos de algunas enzimas glicolíticas; se ha puesto mayor interés en las enzimas de tripanosomátidos cuya estructura tridimensional se conoce, como la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa (Chudzik, D.M., *et al.*, 2000), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Vellieux, F.M., *et al.*, 1993; Kim, H., *et al.*, 1995., Souza, D.H., *et al.*, 1998), fosfoglicerato cinasa (Bernstein, B.E., *et al.*, 1997), piruvato cinasa (Rigden, D.J. *et al.*, 1999) y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Suresh, S., *et al.*, 2000). Esta última enzima no es una enzima glicolítica en el sentido estricto, pero es esencial en el glicosoma para mantener funcionando adecuadamente la ruta metabólica.

Se han sintetizado compuestos que inhiben enzimas glicolíticas de algunos parásitos de los cuales no se tiene información de la estructura cristalográfica. Tal es el caso de algunos derivados de la N-acetilglucosamina cuya eficacia en el sitio activo de la hexocinasa de *Trypanosoma brucei* ha sido explorado. El mejor inhibidor fue la m-Br-fenilglucosamina, con un valor de  $K_i$  de 3  $\mu\text{M}$ , mientras que el efecto del inhibidor en la hexocinasa (HK) de levadura fue por lo menos 50 veces más pobre (Willson, M., *et al.*, 1997); los datos de la efectividad de este inhibidor en la enzima de mamíferos correspondiente no se encuentran disponibles hasta el momento. Hardré, R. y cols. (1998) han desarrollado análogos del intermediario cis-enediol de la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI), como el D-arabinohidroximato-5-fosfato, mismo que fue probado con las enzimas de levadura (YPGI), músculo de conejo (RmPGI) y de *Bacillus stearothermophilus* (BsPGI), obteniendo valores de  $K_i$  de 0.22, 0.195 y 0.098  $\mu\text{M}$ , respectivamente. En el caso de la fosfofructocinasa (PFK) de *Trypanosoma brucei*, se han desarrollado inhibidores selectivos análogos de la fructosa 6-fosfato, denominados 2,5-anhidro-D-manitoles con distintos grupos aril-aminos en la posición 1, los cuales se unen al sitio de unión de ATP, en lugar del sitio de la fructosa-

6-fosfato, con constantes de afinidad aproximadas a 100  $\mu\text{M}$  (Claustre, S., *et al.*, 2002). También se han obtenido las estructuras cristalográficas de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *L. mexicana*, las cuales presentan una similitud entre sí del 80 y 90 % y 45-48% con la enzima de humano. A pesar de que el sitio activo y el sitio vecino de unión del  $\text{NAD}^+$  se encuentran altamente conservados, el sitio de unión del extremo adenosina del  $\text{NAD}^+$  presenta diferencias significativas entre las enzimas de parásitos y la correspondiente en humano, ya que en las enzimas de parásitos hay un hueco hidrofóbico adyacente al extremo 2' hidroxilo de la ribosa de adenosina, el cual no se encuentra en la enzima del humano, de tal forma que ha sido posible diseñar derivados de adenosina que presentan una afinidad 250,000 veces mayor por la enzima del parásito. Los derivados no inhiben a la enzima de humano y también retardan el crecimiento de los cultivos de parásitos de *T. cruzi* y *T. brucei* a concentraciones micromolares bajas (Aronov, A.M., *et al.*, 1999).

En otro acercamiento para inhibir la actividad enzimática de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, se han diseñado análogos del gliceraldehído-3-fosfato, de tal manera que presenten un centro electrofílico reactivo que interaccione con un residuo de cisteína esencial del sitio activo. Estos compuestos se unen de manera irreversible a esta cisteína, presentando una cinética que protege de la unión del sustrato. El mejor inhibidor de la enzima de *T. brucei* es el 3-dietilfosfono-propenal, con un valor de  $K_i$  de 66  $\mu\text{M}$ . Este compuesto es capaz de matar a los cultivos de tripanosomas con una  $\text{LD}_{100}$  de 0.3  $\mu\text{M}$ . Además, se ha sintetizado este compuesto con un grupo fosfato protegido, con el fin de que pueda atravesar la membrana, y ya dentro del parásito, ciertas estereasas citosólicas se encargan de la desprotección del grupo fosfato. Una estrategia similar se ha utilizado para crear análogos del 1-3-bifosfoglicerato, estos compuestos presentan una alta selectividad hacia la enzima de *T. brucei* (Ladame, S., 2001). En este sentido el análogo 1,1-bifluoro del ácido 1,3-bifosfo-D-glicérico presenta una constante de afinidad de 0.06 mM mientras que el mismo compuesto no tiene efecto sobre la enzima correspondiente del músculo de conejo a una concentración de 5 mM.

En la piruvato cinasa de *L. mexicana* y *T. brucei* existe un sitio de unión que puede ser regulado alostéricamente y que se encuentra en las asas que comprenden los aminoácidos 443-453 y del 480-489. A partir de esta idea, se ha observado que los

análogos de la fructosa-6-fosfato como los 2,5-anhidro-D-manitoles (diseñados originalmente para inhibir a la fosfofructocinasa (Claustre S., *et al.*, 2002) inhiben la enzima de tripanosomas uniéndose a este sitio regulatorio; la constante de inhibición del mejor de los compuestos probados es aproximadamente 75  $\mu$ M.

La compartimentalización de las enzimas glicolíticas de tripanosomátidos en el glicosoma, también ha sido punto de interés para el diseño de fármacos. Un gran número de experimentos han dado evidencias de que la deslocalización de las enzimas glicolíticas es deletérea para los tripanosomas. Por ejemplo, los tripanosomátidos poseen dos isoformas distintas de la PGK, una glicosomal, que sólo se expresa en la forma sanguínea, y una citosólica, que se encuentra únicamente en los tripanosomas procíclicos. Cuando se expresa un transgene de la PGK citosólica o una forma de la PGK glicosomal sin el extremo C-terminal, que la dirige al glicosoma, las formas que se encuentran en el torrente sanguíneo mueren rápidamente (Blattner, J., *et al.*, 1998). La toxicidad depende de la actividad de ambas enzimas, ya que cuando se expresa una mutante de la PGK, los tripanosomas sobreviven. Cuando se expresa el transgene de la PGK glicosomal en tripanosomas procíclicos tiene un efecto menos dramático, sin embargo, la velocidad de crecimiento es más lenta y se presenta un cambio aparente en la morfología de las células. De igual manera cuando se expresa la triosafosfato isomerasa citosólica después de la transfección de la forma sanguínea con el gen de la enzima de *Saccharomyces cerevisiae*, se inhibe el crecimiento celular (Helfert, S., 2001). Estos ejemplos demuestran que la compartimentalización correcta de las enzimas glicolíticas en el glicosoma en la forma sanguínea de *T. brucei* es esencial para su sobrevivencia.

Por otro lado, se ha sugerido que la integridad y biogénesis del glicosoma también es fundamental para la vida de los tripanosomas. El proceso de biogénesis del glicosoma involucra interacciones de un gran número de proteínas diferentes, denominadas peroxinas, ya que son homólogas a las involucradas en la biogénesis de los peroxisomas en mamíferos, levadura y plantas (aunque presentan porcentajes muy bajos de identidad en sus secuencias de aminoácidos). Se ha visto que la disminución de la expresión de algunas peroxinas de tripanosomátidos, trae como consecuencia que se detenga el crecimiento de los parásitos causándoles la muerte. El hecho de que las peroxinas responsables en la biogénesis del glicosoma sean esenciales para la viabilidad de los tripanosomas, y que tengan un bajo grado de conservación en sus

secuencias, hacen posible visualizar a estas proteínas como blancos potenciales para el diseño de fármacos antiparasitarios que actúen previniendo la formación de organelos funcionales y una compartimentalización metabólica correcta.

Otro blanco importante para el diseño de fármacos han sido algunas proteasas específicas de parásitos, ya que juegan un papel importante en el control de la síntesis y degradación de proteínas. Estas proteasas se encuentran involucradas en un gran número de procesos fisiológicos como la diferenciación celular, señalamiento, defensa inmunológica y apoptosis. Cuando se tratan parásitos en cultivo o animales infectados con moléculas inhibitoras de una proteasa de cisteína de *T. brucei*, se observa muerte del parásito (Troberg, L., *et al.*, 1999; Scory, S., *et al.*, 1999; Caffrey, C.R., *et al.*, 2000). Esta muerte se ha relacionado con la inhibición de la proteasa de cisteína llamada brucipaina (Scory, S., *et al.*, 1999). Las proteasas de cisteína se dividen principalmente en tres grupos estructurales: similares a papaína, similares a caspasas y las proteasas picorna-virales, que son parecidas a las proteasas de serina, pero que poseen una cisteína en lugar de serina. El grupo de proteasas parecidas a papaína es el que se encuentra presente con mayor frecuencia en parásitos; algunas de ellas tienen un papel importante en la nutrición del parásito y la invasión de la célula huésped.

El estudio de este grupo de proteasas como blanco potencial para el desarrollo de fármacos antiparasitarios posee grandes ventajas ya que miembros homólogos de esta familia de proteasas se encuentran en muchos organismos parásitos con mecanismos catalíticos idénticos; en segundo lugar, existen una gran cantidad de datos acerca de la relación función-estructura de esta familia de enzimas. Para que un inhibidor de proteasa sea efectivo debe ser potente, altamente selectivo en la unión de una proteasa en particular, además de considerar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Las proteasas de cisteína de parásitos más estudiadas son las de *Leishmania* (Selzer, P.M. *et al.*, 1999), *Trypanosoma cruzi* (Engel, J.C., *et al.*, 1998) y *Plasmodium* (Olson, J.E., *et al.*, 1999). La investigación sobre inhibidores sintéticos de proteasas de cisteína como agentes quimioterapéuticos contra la tripanosomiasis Africana se encuentra todavía en sus inicios.

### 3.3. La Triosafosfato isomerasa como blanco para el diseño de fármacos antiparasitarios.

Desde 1995 Gómez-Puyou, Pérez-Montfort y cols, han estudiado a la triosafosfato isomerasa como blanco para el diseño de fármacos antiparasitarios, partiendo de la propuesta que se puede inhibir en forma especie-específica enzimas ortòlogas con un alto nivel de selectividad (Gòmez-Puyou *et al.*, 1995). Si bien enzimas de diferentes especies que poseen actividades catalíticas idénticas son muy similares en su secuencia de aminoácidos y en su estructura tridimensional, y generalmente los aminoácidos del sitio catalítico son altamente conservados. Hay regiones poco conservadas que son cercanas al sitio catalítico; el problema principal es determinar si las regiones no conservadas son importantes para la actividad catalítica o para la estabilidad de la enzima. En este contexto se ha estudiado a la triosafosfato isomerasa, con el propósito de perturbar algún o algunos residuos no conservados que sean importantes para la actividad y/o estabilidad de la enzima.

La cisteína 14 (numeración correspondiente a la TIM de *T. brucei*), es un aminoácido no conservado, que forma parte de la interfase entre los dos monómeros y se ha determinado que alteraciones en este aminoácido, dan como resultado perturbaciones estructurales y la pérdida de la actividad catalítica (Gómez-Puyou *et al.*,1995; Garza Ramos *et al.*,1998; Hernández-Alcántara *et al.*, 2002). Este residuo ha sido ampliamente estudiado en su susceptibilidad a agentes derivatizantes de grupo sulfhidrilo, como el metil metano tiosulfonato (MMTS) y el 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), (Hernández-Alcántara, *et al.*,2002; Pérez-Montfort, *et al.*,2002; Reyes-Vivas *et al.*, 2001; Pérez-Montfort, *et al.*1999).

Hasta el momento, se han diseñado varios compuestos derivados del benzotiazol capaces de inhibir a la TIM de *T. cruzi*, en concentraciones del orden de  $\mu\text{M}$ . Los inhibidores más potentes fueron el ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-propanosulfónico (compuesto 8), el ácido 2-(p-aminofenil)-6-metilbenzotiazol-7-sulfónico (compuesto 9), y el ácido 2-(2-4(4-aminofenil) benzotiazol - 6- metilbenzotiazol-7-sulfónico (compuesto 10, Fig. 4).

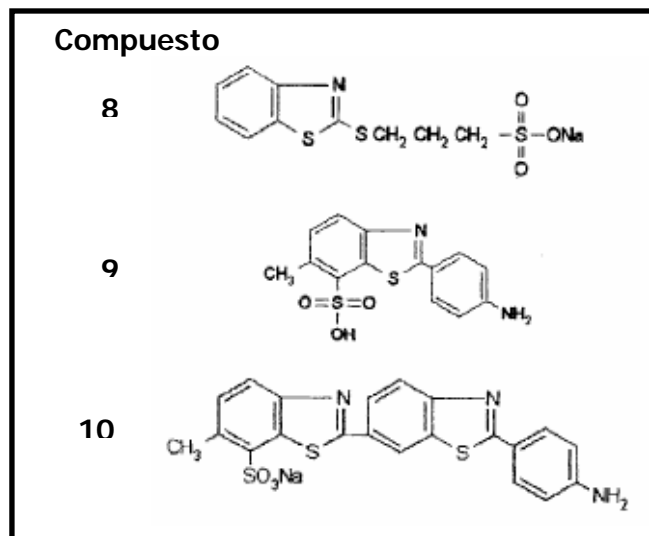


Fig 4. Compuestos derivados de Benzotiazol, que inhiben TcTIM en el orden de concentración  $\mu\text{M}$ . Compuesto 8: ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-propanosulfónico; compuesto 9: ácido 2-(p-aminofenil)-6-metilbenzotiazol-7-sulfónico; compuesto 10: ácido 2-(2-(2-(4-aminofenil) benzotiazol - 6- metilbenzotiazol-7-sulfónico

La mitad de la inhibición máxima producida por estos compuestos se obtuvo a concentraciones de 33, 56, y 8  $\mu\text{M}$ , respectivamente; en la TIM de humano para alcanzar la mitad de la inhibición máxima se requieren de concentraciones de 422  $\mu\text{M}$ , 3.3 mM, y 1.6 mM, respectivamente. En la TcTIM, el efecto de los benzotiazoles disminuyó conforme la concentración de la enzima aumentó. Debido a que la acción de estos compuestos depende de la concentración de la enzima, se sugirió que interfieren con la asociación entre los dos monómeros de TcTIM ([Téllez-Valencia A. et al., 2002](#)). Mediante ensayos calorimétricos y bioquímicos, utilizando el compuesto 8, se demostró que éste inhibe la actividad de TcTIM con un alto grado de selectividad. El cristal de la enzima en presencia del compuesto 8, a una resolución de 2 Å, mostró que el inhibidor se encuentra en la interfase del dímero a menos de 4 Å de residuos de las dos subunidades. De igual manera se demostró que se requieren dos moléculas del compuesto para la completa inactivación de la enzima ([Téllez-Valencia A. et al., 2004](#)).

### 3.4 Características de la triosafosfato isomerasa.

La triosafosfato isomerasa (TIM, E.C. 5.3.1.1) es una enzima glicolítica ubicua, que cataliza la interconversión de dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y gliceraldehído 3-fosfato (G3P), pasando por un intermediario cis-enediol (Fig. 5).

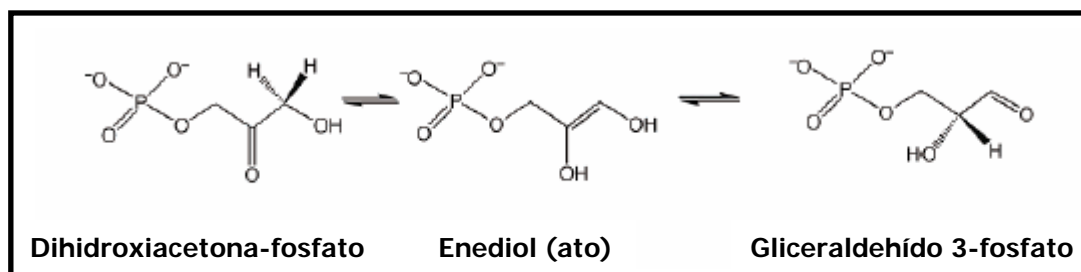


Fig 5. Reacción catalizada por la triosa-fosfato isomerasa.

En la TIM, la eficiencia catalítica se encuentra limitada por la difusión de los sustratos, por lo que esta enzima se ha definido como un "catalizador perfecto", la relación  $k_{cat}/K_m$  para gliceraldehído-3-fosfato como sustrato es de  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Los residuos del sitio catalítico son aminoácidos altamente conservados, el Glu 167 localizado en el extremo amino de la hebra- $\beta_6$ , cuyo carboxilo actúa como base sustrayendo un protón del sustrato; la His 95, localizada en el extremo amino de la hebra- $\beta_4$ , cuyo anillo imidazol actúa como electrófilo polarizando el grupo carbonilo del sustrato y permitiendo su enolización y la Lys 13 localizada en el extremo amino de la hebra- $\beta_1$ , el cual es responsable de la especificidad de la enzima por su sustrato natural.

### 3.4.1 Características estructurales de la triosafosfato isomerasa

La triosafosfato isomerasa pertenece a una de las familias de proteínas con estructura de barril  $(\alpha/\beta)_8$ , está formada por ocho hebras  $\beta$  paralelas en el interior de la proteína, rodeadas por ocho hélices- $\alpha$  que se encuentran en el exterior del barril. Las hélices- $\alpha$  y las hebras  $\beta$  se unen por medio de asas (Fig. 6). El sitio activo de todos los barriles  $(\alpha/\beta)_8$  conocidos se localiza en las asas  $\beta \rightarrow \alpha$  (Wierenga R. K., 2001). Los residuos de las asas 6, 7 y 8 unen con alta especificidad al grupo fosfato del sustrato. El asa 3 se conoce como asa de interdigitación ya que mantiene rodeada a la Cys 14 de la subunidad adyacente.

Los residuos de las asas 6, 7 y 8 unen con alta especificidad al grupo fosfato del sustrato. El asa 6 es conocida como el asa del sitio activo, es un asa flexible que puede adoptar una forma abierta que facilita la unión y la liberación del ligando y una forma cerrada que estabiliza, controla y protege los intermediarios de reacción (Desamero, R., *et al.*, 2003). Después de la unión del ligando, los átomos de esta asa se mueven alrededor de  $8 \text{ \AA}$ , protegiendo al sitio activo del solvente. La forma cerrada es estabilizada por un puente de hidrógeno entre el asa y uno de los átomos de oxígeno del grupo fosfato del ligando. Se ha demostrado que este movimiento del asa del sitio activo se lleva a cabo de manera concertada con la liberación del producto y que puede ser el paso limitante de la reacción catalizada por la TIM (Rozovsky, S., *et*

*al.*, 2001), en donde se lleva a cabo la isomerización de la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato (Fig. 5). Esta asa flexible es la responsable del desplazamiento de la base catalítica 2 Å para hacer contacto con el sustrato y ubicarlo en una posición favorable entre los carbonos relevantes del sustrato (Jogl, G., *et al.*, 2003).

Experimentos cinéticos sugieren que esta asa se mantiene cerrada debido al tiempo de vida de los intermediarios para prevenir la hidratación del intermediario catalítico y la consecuente eliminación del fosfato en el intermediario enol para formar el producto colateral: el metilglioxal. La secuencia de esta asa se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución. Estudios de mutagénesis del asa 6 han demostrado que cuando se acorta, resultan grandes cambios en las propiedades catalíticas por ejemplo, este tipo de mutación dio origen a una nueva variante con características de una metilglioxal sintasa (Pompliano, D. L., *et al.*, 1990; Sampson, N. S., *et al.*, 1992).

El cambio conformacional del asa 7 involucra la reorientación en dos planos peptídicos, los residuos del asa 8 (232-242) no presentan cambios conformacionales en presencia del ligando. A pesar de que los residuos que conforman esta asa no se encuentran involucrados en la catálisis, existen interacciones entre los grupos amino de la hélice 3.10 que forma, que permiten que esta asa se una al grupo fosfato del ligando. Una mutación puntual en el asa 8 ha mostrado la importancia de la Ser 237 para la estabilidad de la enzima (Alvarez M., *et al.*, 1998). Esta fuerte unión del grupo fosfato en una cavidad limita la especificidad de la enzima por el DHAP y el GAP. De los seis residuos que hacen contacto directo con el grupo fosfato, cuatro son glicinas (Gly 173 del asa 6, Gly 212 del asa 7, la Gly 234 y la Gly 235 del asa 8). Los nitrógenos peptídicos de estos residuos y de la Ser 213 del asa 7 forman puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno del grupo fosfato.



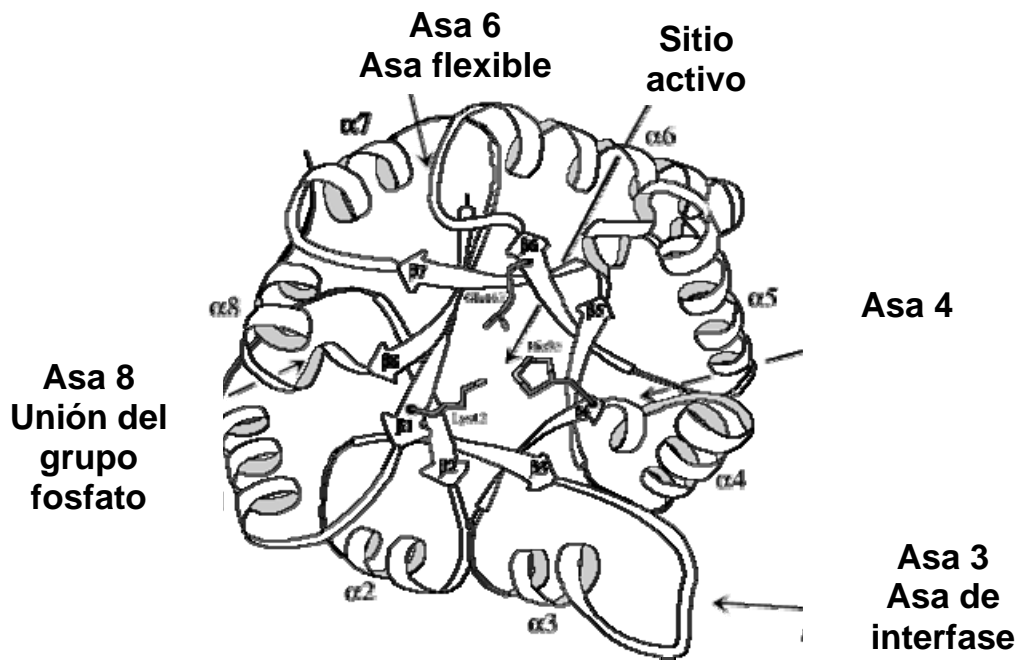


Fig. 6. Modelo estructural de un monómero de barril  $\alpha_8/\beta_8$  de la triosa-fosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (Modificado de Wierenga, *et al.*, 1991)

La TIM de tripanosomátidos es un homodímero, que requiere estar estrictamente como tal para tener actividad, a pesar de que los residuos catalíticos se encuentran en cada monómero y pertenecen a la misma cadena polipeptídica. En algunos organismos como *Pyrococcus woesei*, *Methanothermus fervidus* (Kohlhoff M., *et al.* 1996) *Thermotoga maritima* (Maes, D., *et al.* 1999) y *Giardia lamblia* (López-Velázquez G., *et al.*, 2004) la TIM se encuentra en forma de tetrámero.

### 3.4.2 La interfase de la triosafosfato isomerasa.

Los residuos de la interfase entre los dos monómeros se encuentran principalmente en las asas 1-4. Cada residuo de la interfase posee por lo menos un átomo que hace contacto con un átomo de la otra subunidad dentro de 4 Å. El área de superficie de la interfase de TcTIM es de 1476 y 1491 Å<sup>2</sup> para los monómeros A y B respectivamente (Maldonado E., *et al.*, 1998). En TbTIM estos valores son 1522 y 1533 Å<sup>2</sup> (Wierenga *et al.*, 1992); de tal forma que en la formación del dímero aproximadamente 3200 Å<sup>2</sup> de la superficie de la proteína se encuentran ocultos (Fig. 7).

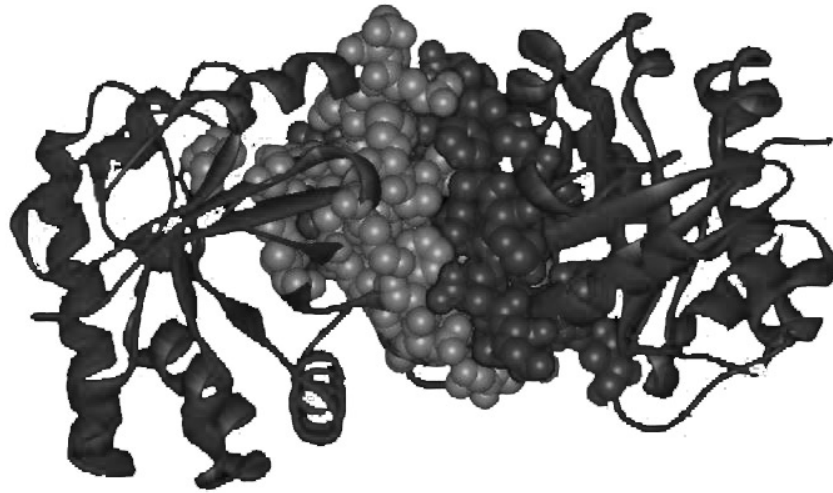


Fig. 7. Interfase de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*. Las coordenadas fueron tomadas del archivo 5TIM del PDB.

Se han reportado 40 aminoácidos que forman la interfase, entre los cuales TbTIM y TcTIM comparten 82 % de identidad. Las dos enzimas difieren que en TbTIM posee Gln, Gln, Val, Leu, Ala, Phe, Val en las posiciones 18, 19, 46, 48, 49, 86, 88 respectivamente, mientras que en TcTIM estos residuos son Glu 19, Ser 20, Leu 47, Ile 48, Pro 50, Tyr 87 e Ile 89.

TcTIM			TbTIM		
Asn12	Gly 73	Ile173	Asn11	Gly 72	Ile172
Lys14	Ala 74	Gly174	Lys13	Ala 73	Gly174
Cys15	Phe75		Cys14	Phe74	
Asn16	Thr76		Asn15	Thr75	
Gly17	Gly77		Gly16	Gly76	
Ser18	Glu78		Ser17	Glu77	
Glu19 *	Val79		Gln18 *	Val78	
Ser20 *	Ser80		Gln19 *	Ser79	
Thr45	Ile83		Thr44	Ile82	
Phe46	Leu84		Phe45	Leu83	
Leu47 *	Asp86		Val46 *	Asp85	
His48	Tyr87 *		His47	Phe86 *	
Ile49 *	Ile89 *		Leu48 *	Val88 *	
Pro50 *	Val93		Ala49 *	Val92	
Met51	His96		Met50	His95	
Gln66	Glu98		Gln65	Glu97	
Asn67	Arg99		Asn66	Arg98	
Ile69	Tyr102		Ile68	Tyr101	
Ser72	Tyr103		Ser71	Tyr102	

Tabla 1. Residuos que forman la interfase en TcTIM y TbTIM, los residuos marcados con \* son los residuos no conservados entre ambas enzimas.

A lo largo de la interfase existen 20 puentes de hidrógeno entre los átomos de residuos de las dos subunidades. Además se encuentran 15 interacciones de puente de hidrógeno mediadas por agua, lo cual resalta la importancia de las moléculas de agua en la interfase para la estabilidad del dímero. Muchas de las moléculas de agua que se encuentran en la interfase se encuentran totalmente ocultas. En la interfase se encuentran siete cavidades, en las cuales se encuentran 18 moléculas de agua.

Dentro de la interfase hay interacciones de superficies apolares, tal es el caso de la Val 46, la cual se encuentra completamente expuesta en el monómero pero completamente oculta en el dímero debido a sus interacciones con las cadenas laterales de la Phe45, Leu 48 (al principio de la hélice 2 y la Val 78, Ile82, Leu 83 y Phe 86 (Hélice 3). Existen solo cuatro puentes de hidrógeno a través de la interfase, estos son el puente de hidrógeno entre las Cys 14 y la Gly 72 de la otra subunidad; y los pares equivalentes en la otra subunidad.

Hay tres residuos que se encuentran completamente expuestos en el monómero y completamente ocultos en el dímero: Cys 14, Val 46 y Thr75. Estos residuos se encuentran en las asas 1, 2 y 3, respectivamente. La cadena principal de la Cys 14 se encuentra rodeada por los átomos del asa 3 de la otra subunidad. Como se mencionó anteriormente, la Cys 14, que se encuentra en la interfase ha sido objeto de estudio para el diseño racional de fármacos contra algunos parásitos patógenos (Gómez-Puyou *et al.*, 1995; Garza Ramos *et al.*,1998; Hernández-Alcántara *et al.*, 2002; [Téllez-Valencia A. et al.](#), 2002). Es un aminoácido no conservado, en algunos parásitos el residuo 14 es una cisteína, mientras que en las TIM's de humano, y conejo esta posición puede estar ocupada por Met, y en levadura, por ejemplo, este residuo es una Leu. Mediante estudios de mutagénesis dirigida y modificación química de este residuo, se ha demostrado que esta porción de la interfase es central en la estabilidad del dímero (Gómez-Puyou *et al.*,1995; Schliebs W., *et al.*, 1997; Mainfroid V.,*et al.*, 1996; Garza-Ramos G., *et al.*, 1996; Hernández-Alcántara G., *et al.*, 2002)

La Thr 75 está localizada en la punta del asa 3. Se encuentra en una cavidad cercana al sitio activo de la otra subunidad y a través de una red de puentes de hidrógeno su grupo hidroxilo es importante para la ubicación de las cadenas laterales de algunos de los residuos catalíticos del sitio activo.



digieren con subtilisina; TcTIM presenta un decaimiento progresivo de su actividad a medida que la concentración de subtilisina aumenta. Una vez que la subtilisina y la TcTIM se encuentran a concentraciones equimolares se pierde casi por completo su actividad, en cambio la disminución de la actividad de TbTIM es menos notoria y la pérdida completa de su actividad catalítica requiere concentraciones mucho mayores de subtilisina (Reyes-Vivas *et al.*, 2002).

Se han llevado a cabo estudios cinéticos de reactivación con monómeros desplegados por efecto de cloruro de guanidina en donde se demuestran que la formación del dímero activo es más rápida y más eficiente en la TcTIM que en la TbTIM (Zomosa-Signoret. *et al.*, 2003).

Cuando se hacen ensayos de termoestabilidad seguidos por dicróismo circular a 222 nm, para monitorear la señal de hélices- $\alpha$ , para TcTIM se obtiene una temperatura aparente de desnaturalización de 57.6° C y para TbTIM de 53.02° C, lo que nos indica que TcTIM presenta mayor estabilidad a la desnaturalización por efecto de la temperatura.

Estas diferencias entre la TcTIM y la TbTIM en la susceptibilidad, y sensibilidad a distintos factores que llevan a la pérdida completa de la actividad catalítica así como las diferencias en la cinética de reactivación de los monómeros de ambas enzimas, sin duda son producto de las diferencias estructurales entre las dos enzimas. Se está explorando para averiguar cuáles aminoácidos son los responsables de los diferentes comportamientos de la TbTIM y TcTIM ante los reactivos de sulfhidrilo, la digestión con subtilisina, y cinética de reactivación.

#### **3.4.4 Mutante de TcTIM con la interfase de TbTIM.**

Dada la diferencia de 7 aminoácidos entre las interfases de TcTIM y TbTIM, en nuestro laboratorio se decidió explorar si el distinto comportamiento que tienen ambas enzimas era debido a estas diferencias, por lo que se decidió construir una mutante de TcTIM, que tuviera los aminoácidos de la interfase de TbTIM, la cual en adelante se referirá a ella como TcTIM7mutTbTIM (TcTIM que posee 7 mutaciones en la interfase, y los residuos corresponden a los de TbTIM). Esta mutante fue sobreexpresada, purificada y caracterizada. Se observó que el cambio de la interfase de TcTIM no altera las propiedades cinéticas, estructura secundaria y terciaria de la enzima; por

otro lado la estabilidad térmica de la enzima mutante es 2 °C menor que la TcTIM silvestre y su Tm se encuentra exactamente a la mitad de las Tm´s calculadas para la TbTIM y TcTIM silvestres. Cuando se digiere esta mutante con subtilisina, a partir de relaciones muy bajas de concentraciones subtilisina/TIM, pierde por completo su actividad. En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos para esta mutante.

Ensayo	TcTIM w.t.	TbTIM w.t	TcTIM7mutTbTIM
Parámetros Cinéticos	$K_m$ : 0.43 mM $k_{cat}$ : $2.7 \times 10^5$ min <sup>-1</sup>	$K_m$ : 0.45 mM $k_{cat}$ : $3.1 \times 10^5$ min <sup>-1</sup>	$K_m$ : 0.40 mM $k_{cat}$ : $2.98 \times 10^5$ min <sup>-1</sup>
Efecto del MMTS en la actividad de la enzima	$k_2 = 40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_2 = 0.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_2 \approx 40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Susceptibilidad a la digestión por subtilisina	sub/TIM= 0.25, <20% Act	sub/TIM= 0.25, > 50% Act	sub/TIM= 0.05, 0% Act
Termoestabilidad seguida por dicroísmo circular a 222 nm	57.6 °C	53.02 °C	54.36 °C

Tabla 2. Comportamiento cinético y efecto de diversos factores que alteran la catálisis en TcTIM, TbTIM, y la mutante de TcTIM con la interfase de TbTIM (TcTIM7mutTbTIM).

Al observar que los residuos de la interfase de TbTIM no generaron un cambio importante en la susceptibilidad a los agentes derivatizantes en TcTIM, pero si en la hidrólisis por subtilisina; se decidió mutar estos mismos aminoácidos en TbTIM, es decir generar una mutante de TbTIM con los aminoácidos de la interfase de TcTIM. En otras mutantes que se han generado en el laboratorio, hemos observado que mutar en posiciones equivalentes tanto en TbTIM y en TcTIM no resulta en un comportamiento similar, es por eso el interés de mutar los mismos aminoácidos pero ahora en TbTIM y determinar su comportamiento.

## 4. OBJETIVOS.

### 4.1 Objetivo general.

Caracterizar una triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* con residuos de la interfase de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y comparar con las proteínas silvestres.

### 4.2 Objetivos particulares.

- Obtener una mutante de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* con 7 residuos de la interfase de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*.
- Purificar dicha mutante.
- Determinar cambios en la estructura secundaria y terciaria con respecto a la enzima silvestre.
- Determinar el efecto de la concentración de proteína en la actividad de la enzima mutante.
- Determinar sus constantes cinéticas.
- Determinar el efecto del MMTS y DTNB en la actividad de la enzima mutante
- Determinar el efecto de la hidrólisis por subtilisina en la actividad de la enzima mutante.





## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 Diseño de Oligonucleótidos Mutagénicos.

Los oligonucleótidos mutagénicos se diseñaron con base en la secuencia del gen de la TbTIM, reportada por Swinkels B. W. *et al.*, 1986., los oligonucleótidos constan de 21-25 pares de bases, aproximadamente nueve hacia el extremo 5´ y nueve hacia el extremo 3´ del codón sustituido.

En la Tabla 3 se presentan los oligonucleótidos mutagénicos para la obtención de la séptuple mutante, que en adelante se llamará TbTIM7mutTcTIM (Mutante de TbTIM que posee 7 mutaciones que corresponden a los aminoácidos de la interfase de TcTIM). Algunos oligonucleótidos se utilizaron para obtener dos mutantes debido a la cercanía de los aminoácidos involucrados.

Residuo de aa en TbTIM mutado por el correspondiente en TcTIM.	Oligonucleótido mutagénico	Tm ( °C)
<b>Q18E/Q19S</b>	Oligonucleótido directo 5´ACGGCTCCGAGAGTTCTTTGT 3´ Oligonucleótido reverso 5´ACAAAGA <u>ACTCTCGGAGCCGT</u> 3´	59
<b>V46L</b>	Oligonucleótido directo 5´TCCACCTTTCTCCACCTTGCC 3´ Oligonucleótido reverso 5´GGCAAGGTGGAGAAAGGTGGA 3´	61
<b>L48I/A49P</b>	Oligonucleótido directo 5´TCTCCACATCCCAATGACGAAGGAG 3´ Oligonucleótido reverso 5´CTCCTTCGTCATTGGGATGTGGAGA 3´	65
<b>F86Y/V88I</b>	Oligonucleótido directo 5´CAAAGATTATGGTATCAACTGGA 3´ Oligonucleótido reverso 5´TCCAGTTGATACCATAATCTTTG 3´	57

Tabla 2. Diseño de oligonucleótidos mutagénicos para la obtención de la mutante de TbTIM con la interfase de TcTIM (TbTIM7mutTcTIM). Los nucleótidos subrayados corresponden a la posición donde se incorpora la mutación.

Así mismo se utilizó otro par de oligonucleótidos, T7 Promotor y T7 Terminador, para amplificar el gen completo (ver sección 5.2) y para poder clonar los genes mutantes en un plásmido de expresión (ver sección 5.3), cuyas secuencias se presentan a continuación:

**T7 Promotor**  
 5´TAATACGACTCACTATA 3´  
**T7 Terminador**  
 5´GCTAGTTATTGCTCAGCGG3´

### 5.2 Mutagénesis Mediada por PCR.

La mutagénesis de los residuos de la interfase de TbTIM, se realizaron mediante tres reacciones de PCR, tal y como Erlich H.A. (1992) lo reporta (Fig. 9), tomando como templado el DNA de la TbTIM silvestre. En la primera reacción de PCR se amplifica un primer fragmento con el oligonucleótido externo directo (T7 Promotor) y con el oligonucleótido reverso mutagénico, en la segunda reacción se amplifica con el oligonucleótido externo reverso (T7 Terminador) y el oligonucleótido directo mutagénico, se calculó el peso esperado de los fragmentos para cada mutante (tabla 4). Finalmente se lleva a cabo una tercera reacción de PCR en la que se amplifica el gen completo (1102 pb) utilizando ambos oligonucleótidos externos.

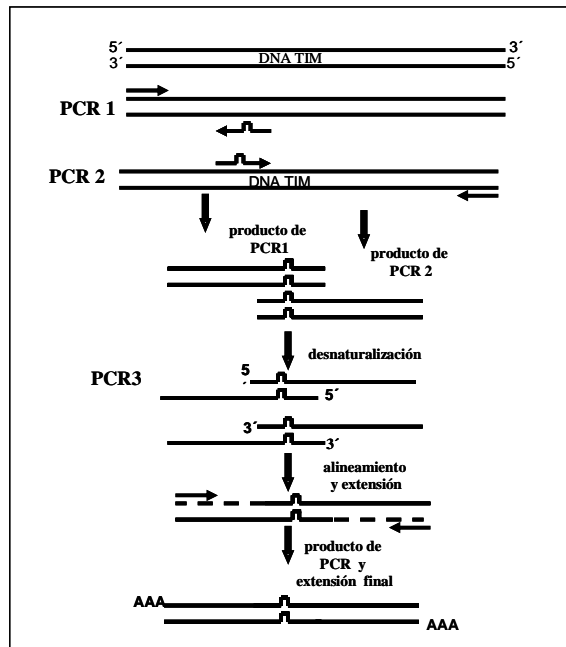
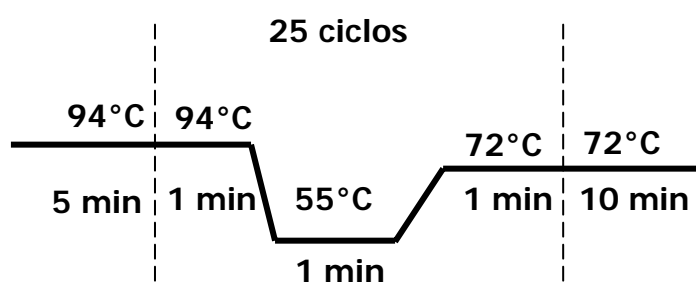


Figura 9.  $\rightarrow$  Oligonucleótido mutagénico "forward"  $\rightarrow$  T7 promotor  
 $\leftarrow$  Oligonucleótido mutagénico "reverse"  $\leftarrow$  T7terminador

Peso esperado para cada fragmento (pb)			
Mutación	PCR1	PCR2	PCR3
Q18E/Q19S	143	976	1102
V46L	226	893	1102
L48I/A49P	238	885	1102
F86Y/V88I	351	771	1102

Tabla 4. Peso esperado para cada fragmento (pb), de las reacciones de PCR para cada mutante parcial.

La amplificación de los fragmentos se llevó a cabo con el sistema de alta fidelidad "Expand High Fidelity" de Roche<sup>®</sup>, utilizando el siguiente ciclo de PCR para todas las mutantes:



Sólo las reacciones de PCR 2 para las mutantes V46L y L48I/A49P respectivamente, se llevaron a cabo a una temperatura de alineamiento de 58° C, todas las demás reacciones de PCR se obtuvieron con la temperatura de alineamiento de 55° C, ilustrada en la imagen anterior. Finalmente los productos de PCR, fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Las mutaciones se incorporaron consecutivamente, es decir la primera mutante sólo poseía dos mutaciones (Q18E/Q19S), se incorporó la siguiente mutación para tener Q18E/Q19S/V46L y así consecutivamente hasta obtener la séptuple mutante: Q18E/Q19S/V46L/L48I/A49P/F86Y/V88I. Una vez que se obtuvo cada mutante parcial, cada una de ellas fue clonada en un plásmido de expresión (ver sección 5.3).



Con el DNA del PCR3 digerido de cada mutante parcial así como el de la séptuple mutante, y con el plásmido digerido y defosforilado, se hicieron las reacciones de ligación incubando tanto el inserto digerido como el plásmido digerido y defosforilado en una relación 1:3 (plásmido:inserto) en presencia de la T4 DNA Ligasa (4 U/ $\mu$ L) a 16° C durante toda la noche.

Los productos de las reacciones de ligación se usaron para transformar células competentes de alta replicación de *E. coli* Top 10 y se plaquearon en cajas con medio LB con ampicilina.

De las colonias transformantes obtenidas, se hicieron parches en cajas de LB con ampicilina para purificar el DNA (QIAprep Spin, Miniprep Kit, Qiagen) de cada clona. Para monitorear las clonas y saber cual de ellas posee el inserto, el DNA de cada clona fue digerido con la enzima de restricción Pst-I, ya que hay un sitio de reconocimiento en el gen, que permite verificar la orientación del fragmento clonado en el plásmido. Si está clonado en la dirección 5´- 3´ se obtienen dos fragmentos, uno con peso molecular de 1877 pb y otro con peso molecular de 3733 pb. Si el gen se encuentra clonado en dirección 3´-5´ se generarán dos fragmentos con pesos moleculares de 1693 y 3917 pb, respectivamente.

Las clonas positivas se crecieron nuevamente en placas con medio LB con ampicilina, para purificar DNA para ser secuenciado y corroborar, por un lado, que se haya incorporado correctamente la mutación, y por el otro que no existan mutaciones no deseadas.

#### **5.4 Sobreexpresión de la Séptuple Mutante (TbTIM7mutTcTIM).**

El DNA secuenciado, en el que se había confirmado la incorporación exitosa de las siete mutaciones, la posición correcta del gen y la ausencia de errores en la secuencia; se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21DE3pLysS. Estas células presentan características que son compatibles con el sistema de expresión pET.

El sistema de sobreexpresión empleado se esquematiza en la figura 11.

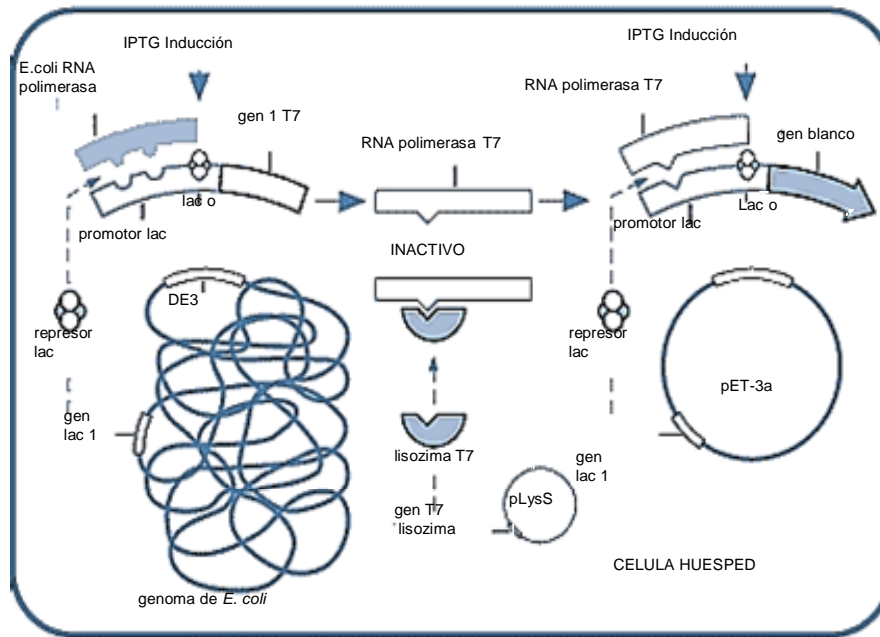


Figura 11. Sistema de expresión pET en *E. coli* BL21De3pLysS. La cepa BL21De3pLysS contiene una copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa del fago T7. Este gen se encuentra bajo el control del promotor LacUV45, que a su vez es inducido por IPTG. Esta cepa además contiene el plásmido pLysS que codifica para la lisozima del fago T7 que inhibe a la T7 RNA Polimerasa, de tal forma que se puede controlar la expresión del gen clonado en pET-3a .

Una vez clonado el DNA en esta cepa, se hicieron ensayos de sobreexpresión en cultivos pequeños para después escalar las mejores condiciones a un cultivo más grande y así purificar la enzima. Para iniciar, un cultivo de 50 mL de LB con ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se inoculó en una  $A_{600 \text{ nm}} = 0.1$  y se incubó a  $37^\circ \text{C}$  hasta alcanzar una  $A_{600 \text{ nm}} = 0.8-1.0$ ; después se agregó el inductor isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.4 mM y se dividió el cultivo en partes iguales (aprox. 16 mL), para incubar estos cultivos pequeños a distintas temperaturas durante 12 horas. Las temperaturas probadas fueron 21, 30 y  $37^\circ \text{C}$ . Se decidió inducir los cultivos a  $30^\circ \text{C}$ , ya que no se observaron grandes diferencias en las temperaturas probadas (Ver apartado 6.2), para prevenir la expresión de proteínas carentes de interés.

## 5.5 Purificación de TbTIM7mutTcTIM.

A causa de sus diferentes puntos isoeléctricos, 8.64 para TcTIM y 9.08 para TbTIM estas enzimas presentan protocolos de purificación diferentes (Ostoa-Saloma P., *et al.*, 1997; Borchert T.V., *et al.*, 1993; respectivamente). Debido a que esta mutante, a pesar de ser TbTIM, posee la interfase de TcTIM, se pensó que algunas de sus características en cuanto a purificación podrían cambiar, de tal forma que se diseñó un protocolo en el que se monitorearan todas las etapas de purificación con el fin de observar el comportamiento de esta mutante. El protocolo que se utilizó se muestra en la figura 12.

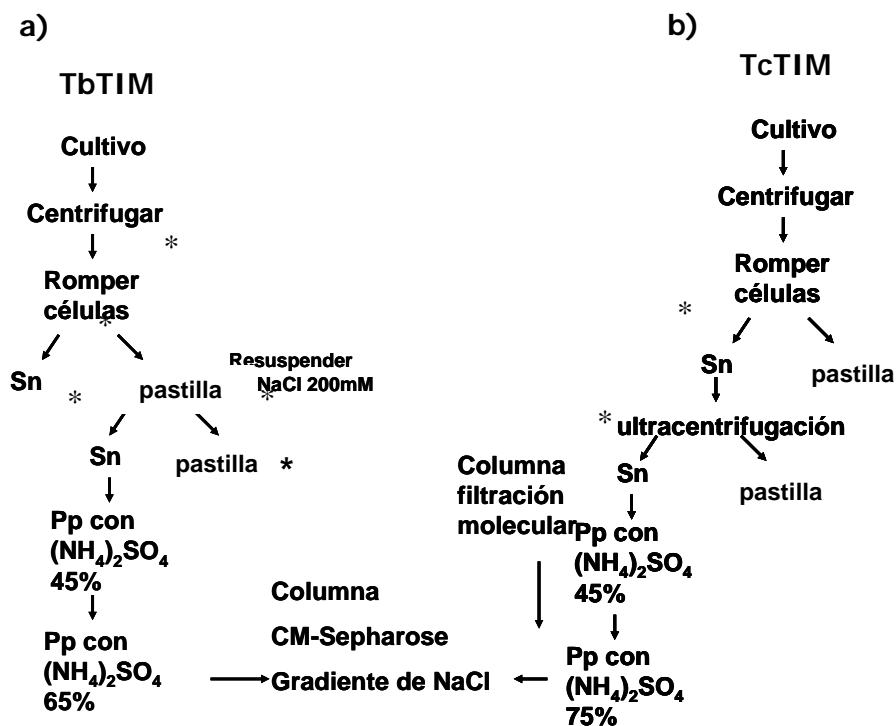


Figura 12. Esquemas de purificación de TbTIM (a) y TcTIM (b). Con la finalidad de saber el comportamiento de TbTIM7mutTcTIM, se monitoreó la presencia de la enzima en geles SDS-PAGE al 16% en los pasos marcados con \*.

La TbTIM7mutTcTIM presentó el mismo comportamiento que la enzima silvestre (ver sección 6.3), por lo que se purificó según el método reportado por Borchert T.V. *et al.*, 1993., que se ilustra a grandes rasgos en la figura 12a. Los detalles de la purificación se mencionan a continuación: 1 L de medio LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con la cepa de bacterias inducida y la proteína sobreexpresada se centrifugó por 15 min a 27,000 g. El botón se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis (MES/NaOH 25 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y PMSF 0.2 mM, pH 6.5). Las células se rompieron por sonicación mediante 7 ciclos de 40 seg con descansos de 1 min entre cada uno. El lisado se centrifugó a 27,000 g por 15 min. El botón se resuspendió en 40

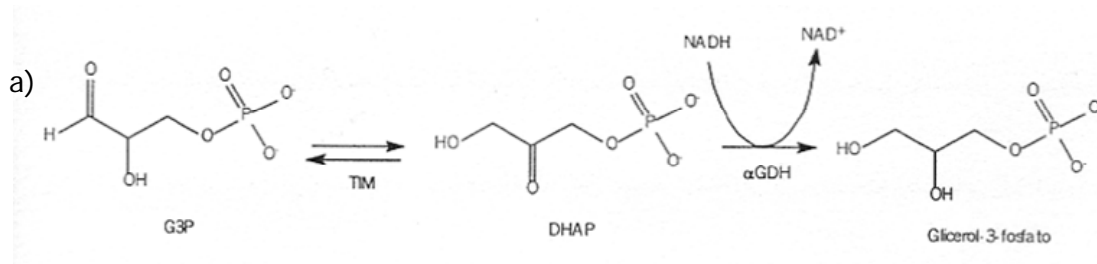
mL de amortiguador de lisis con NaCl 200 mM en agitación constante durante 30 min y se centrifugó a 27,000 g por 15 min. El sobrenadante se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 45% de saturación durante 12 hrs y se centrifugó a 27,000 g por 15 min. El sobrenadante se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 65 % de saturación durante 12 hrs y posteriormente se centrifugó a 27,000 g por 15 min. El botón obtenido se disolvió en 10 mL de amortiguador A (trietanolamina 100 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y  $\text{NaN}_3$  1 mM, pH 8) y se dializó contra el mismo amortiguador durante 12-17 hrs. La muestra se pasó por una columna de carboximetil-sefarosa equilibrada previamente con amortiguador A, y se eluyó con una gradiente de 50-150 mM de NaCl. Se colectaron fracciones de 1 mL. La proteína pura se almacenó precipitada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 70%. Todos los pasos anteriores se llevaron a cabo a 4°C. Todo el proceso de purificación se monitoreó en geles SDS-PAGE al 16%, tiñendo con azul de Coomassie.

En los pasos intermedios de la purificación se cuantificó proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA, Protein Assay Reagent Kit) a 562 nm, la proteína pura se cuantificó por absorbancia a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de  $36\ 130\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ .

## **5.6 Determinación de la Actividad Catalítica.**

La actividad de TbTIM7mutTcTIM, se midió espectrofotométricamente siguiendo la desaparición de absorbancia a 340 nm, por la oxidación del NADH, en un ensayo acoplado con la enzima  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH). La actividad enzimática de la TIM se mide en la dirección de GAP a DHAP. La reacción catalizada por la TIM y la reacción acoplada se presentan en la figura 13, de igual manera se muestra la mezcla de reacción utilizada. Para iniciar la reacción, se adicionó la proteína a una concentración final de 5 ng/mL. Lo mismo se hizo para la actividad de TbTIM y TcTIM silvestres así como para la mutante TcTIM7mutTbTIM, con el fin de comparar su comportamiento con la nueva mutante generada.





b)

### Mezcla de reacción

TEA	100	mM
EDTA	1	mM pH 7.4
G3P	1	mM
NADH	0.2	mM
$\alpha$ GDH	1.25	U/ml
$\lambda$	340	nm

5 ng de proteína  
Volumen final: 1 mL

Figura 13. a) Reacción acoplada para medir la actividad de la TIM. La transformación de G3P a DHAP llevada a cabo por la TIM, se sigue espectrofotométricamente por la reacción acoplada de la  $\alpha$ -GDH, enzima que convierte la DHAP en glicerol 3-fosfato. b) Mezcla de reacción utilizada.

**Nota importante:** Para medir la actividad de TbTIM7mutTcTIM, en la celda de reacción se requiere 5 ng/mL de proteína, pero se requiere que la proteína no se diluya demasiado en las diluciones previas; es decir se necesita una primera dilución en el orden de 250  $\mu$ g/mL, después otra dilución de tal forma que la proteína se encuentre alrededor de 2  $\mu$ g/mL para después tomar una alícuota y llevarlo a la celda de reacción a 5 ng. Ya que se observó que de otra forma la enzima va perdiendo actividad por efecto de dilución.

### 5.7 Caracterización Cinética de TbTIM7mutTcTIM.

Se realizaron curvas de concentración de sustrato (G3P, de 0.05 a 2 mM) contra actividad específica de la TbTIM7mutTcTIM, con el fin de determinar sus parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $V_{max}$  y  $k_{cat}$ . Estos experimentos se hicieron por triplicado, las curvas obtenidas se ajustaron al modelo de Michaelis y Menten (Ec. 1) y se calcularon  $K_m$  y  $V_{max}$  mediante regresión no lineal, y se reporta un promedio de los parámetros obtenidos de un total de tres experimentos independientes que difieren en menos del 10%.

$$V_0 = V_{max} (S) / K_m + (S)$$

Ec. 1. Ecuación de velocidad de Michaelis y Menten en donde  $V_0$ : velocidad inicial;  $V_{max}$ : velocidad máxima; (S): concentración inicial de sustrato;  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten.

## 5.8 Propiedades Espectroscópicas.

### 5.8.1 Estructura secundaria seguida por Dicroísmo Circular.

Para cuantificar la contribución de hélices- $\alpha$  y hebras- $\beta$  a la estructura secundaria de TbTIM7mut, se tomaron espectros de dicroísmo circular para visualizar los mínimos a 208 y 222 nm (hélices- $\alpha$ ) y un mínimo entre 210-220 nm (hebras- $\beta$ ). También se determinaron los espectros correspondientes para TbTIM, TcTIM silvestre así como para TcTIM7mutTbTIM para hacer una comparación entre estas enzimas. Los espectros se colectaron en un espectropolarímetro AVIV (Lakewood,NJ) 62 HDS. Usando una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz con un ancho de banda de 1 nm, para el UV-lejano. Las enzimas se dializaron contra amortiguador de fosfatos 25 mM, NaCl 20 mM, pH 4 durante 12 hrs. Después se filtraron por membranas estériles de 0.45  $\mu$ m. Todas las enzimas se usaron a una concentración de 200  $\mu$ g/mL. Se hicieron 5 repeticiones por espectro en un intervalo de 195 a 240 nm. Para calcular los valores de elipticidad molar se determinó la concentración de proteína a una absorbancia de 280 nm utilizando los coeficientes de extinción molar para cada enzima que se ilustran en la tabla 5. La elipticidad molar se calculó de acuerdo a la ecuación 2.

Enzima	$\epsilon_{280}$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )
TbTIM	34 850
TbTIM7mutTcTIM	36 130
TcTIM	36 130
TcTIM7mutTbTIM	34 850

Tabla 5. Coeficientes de extinción molar ( $M^{-1} cm^{-1}$ ) para las enzimas a las cuales se les realizó espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano.

$$\theta = (\theta \text{ obs (grados)} \times MRW \times 100) / (C \times l)$$

Ec. 2. Ecuación para determinar la elipticidad molar a partir de los datos generados en los espectros de dicroísmo circular, en donde  $\theta$  es la elipticidad molar en grados;  $\theta$  obs, es la medida de la elipticidad observada en grados; MRW es la media del peso molecular de los residuos de cada enzima; 100 es el factor que convierte la concentración molar a  $dmol/cm^2$ ; C es la concentración de proteína en mg/mL y l es el paso de luz de la celda en cm.

### 5.8.2 Estabilidad Térmica seguida por Dicroísmo Circular.

Las enzimas se calentaron en un intervalo de temperatura entre 20 y 70° C, y se monitoreó la estabilidad de la enzima por cambios en su elipticidad molar a 222 nm, donde se observa, predominantemente, la señal de hélices- $\alpha$ . Las enzimas se dializaron en un amortiguador de MOPS 20 mM, pH 7.0, EDTA/DTT/ $\text{NaN}_3$  1 mM, en los experimentos se utilizó una concentración de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para cada enzima. Los espectros se realizaron en un espectropolarímetro AVIV (Lakewood, NJ) 62 HDS, la temperatura se incrementó 1° C cada 2.5 min. La fracción desplegada ( $f_D$ ) se calculó con la ecuación 3.

$$f_D = (y_N - y) / (y_N - y_D)$$

Ec. 3. Ecuación para determinar la fracción desplegada  $f_D$  en donde:  $y_N$  y  $y_D$  corresponden a los valores de elipticidad de la especie nativa y desnaturalizada, respectivamente; los cuales se determinaron a partir de una extrapolación lineal de la porción inicial y final de la curva de elipticidad ( $y$ ) contra la temperatura.

Se realizaron gráficas de Temperatura vs  $f_D$  para cada mutante y después mediante un ajuste al modelo de Boltzman se determinaron las temperaturas medias aparentes de desnaturalización ( $T_m$ ).

### 5.8.3 Estructura terciaria seguida por Fluorescencia intrínseca.

Las proteínas pueden ser monitoreadas mediante fluorescencia debido a tres aminoácidos que actúan como fluoróforos: triptofano, tirosina y fenilalanina. La fluorescencia de una proteína plegada es la mezcla de la fluorescencia individual de los residuos aromáticos. Las proteínas son excitadas generalmente a 280 nm o a longitudes de onda mayores como 295 nm. La mayor parte de la emisión observada es debida a los residuos de triptofano.

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron a 25°C en un espectrofluorómetro RF-5000U Shimadzu. Se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz excitando a 280, 295 nm y midiendo la emisión entre 300 y 500 nm. A 280 nm se excitan principalmente tirosinas y triptofanos, mientras que en 295 nm sólo se observa la emisión de los triptofanos excitados. Todas las enzimas fueron dializadas en amortiguador de Trietanolamina 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4, y utilizadas a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se corrió un espectro solo con el amortiguador y los

valores obtenidos fueron restados a los espectros de las enzimas. Para calcular el Centro Espectral de Masas (SCM, "Spectral Center of Mass") de cada espectro se calculó de acuerdo a la ecuación 4.

$$\text{SCM} = \frac{\sum \lambda I_{\lambda}}{\sum I_{\lambda}}$$

Ec. 4. Ecuación para determinar el centro espectral de masas a partir de los espectros de fluorescencia intrínseca en donde;  $I(\lambda)$  es la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda ( $\lambda$ ).

## **5.9 Efecto de los Reactivos de Sulfhidrilo en la Actividad de la Enzima.**

### **5.9.1 Ensayos de inactivación por Metilmetanotiosulfonato.**

El metilmetanotiosulfonato (MMTS) reacciona exclusivamente con Cys produciendo un derivado relativamente pequeño (metildisulfuro) (Fig. 14). Se probó el efecto del MMTS en la actividad de la mutante TbTIM7mut y en las otras enzimas utilizadas en los ensayos anteriores. Se hicieron dos tipos de experimentos: probando diferentes concentraciones del derivatizante y midiendo la actividad al tiempo cero, y a las dos horas, y ensayos temporales durante dos horas utilizando una concentración fija del derivatizante. Para el primer tipo de experimentos, se incubaron las enzimas a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en amortiguador TE 100/10 a 25° C. Se probaron concentraciones de MMTS en un intervalo de 0 a 1000  $\mu\text{M}$ . Se midió la actividad de las enzimas al tiempo cero y se incubaron en presencia de MMTS durante dos horas, en ese tiempo se tomó una alícuota de cada muestra para determinar su actividad. Las alícuotas se diluyeron en el amortiguador TE 100/10 hasta tener una concentración final en la celda de 5 ng y así medir su actividad. El porcentaje de la actividad residual para cada enzima se calculó con respecto al valor de la actividad del tiempo cero.

Para los ensayos temporales, TbTIM7mut se incubó a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubó en presencia de una concentración fija de 0.7 Mm de MMTS. Se midió la actividad en el intervalo de 2 a 120 minutos. El porcentaje de la actividad residual para cada enzima se calculó con respecto al valor de la actividad del tiempo cero.

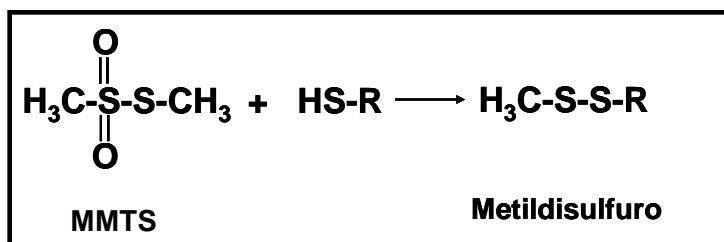


Figura 14. Reacción de derivatización entre el metil metano tiosulfonato y el grupo sulfhidrilo.

### 5.9.2 Ensayos de inhibición por el ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico.

El 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) reacciona equimolarmente con grupos sulfhidrilo dando lugar al ácido 1-benzoico, 2-nitro, 5-disulfuro (Fig. 15). Se realizaron al igual que con el MMTS, dos tipos de experimentos, primeramente se probaron concentraciones de DTNB en un rango de 0 - 2 mM, incubando las enzimas a una concentración de 250 µg/mL a 25° C, se tomaron alícuotas para medir actividad al tiempo cero y a las dos horas. Así mismo, se realizaron experimentos temporales incubando las enzimas a una concentración de 250 µg/mL y con una concentración fija de DTNB, 1 mM; se tomaron alícuotas para medir actividad al tiempo cero, y a los 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. En ambos experimentos el porcentaje de la actividad residual para cada enzima se calculó con respecto al valor de la actividad del tiempo cero y la concentración final de cada enzima en la celda de reacción fue de 5 ng/mL.

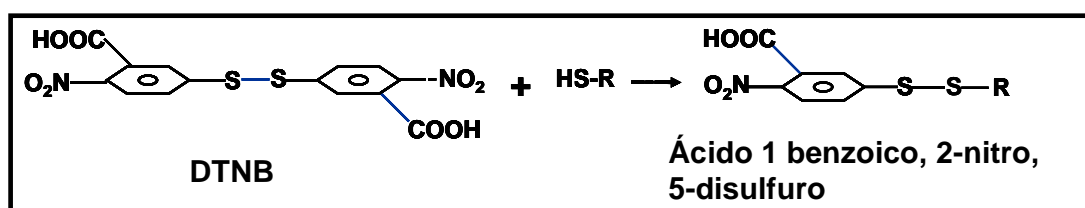


Figura 15. Reacción de derivatización entre el 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico y el grupo sulfhidrilo.

### 5.9.3 Determinación de la constante de inactivación ( $K_2$ ) para el efecto de los derivatizantes en la actividad de TbTIM7mutTcTIM.

Las constantes de inactivación para TbTIM y TcTIM silvestres, ya han sido reportadas tanto para el efecto del MMTS como del DTNB (Pérez-Montfort *et al.*, 1999). Con el fin de comparar el efecto de estos reactivos de grupo sulfhidrilo en

TbTIM7mutTcTIM con los valores ya reportados, se hicieron ensayos temporales de inhibición utilizando concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.7 mM de MMTS, y de 0.5, 0.75 y 1 mM de DTNB. Se tomaron alícuotas para medir actividad en el intervalo de 2 a 120 minutos utilizando una concentración final de enzima de 5 ng/mL. El porcentaje de la actividad residual para la enzima se calculó con respecto al valor de la actividad del tiempo cero. Se realizaron gráficos de actividad residual vs tiempo para cada concentración utilizada de derivatizante, las cuales fueron ajustadas a la ecuación 5, que representa una cinética de pseudo-primer orden, donde  $k_1$  es la constante de velocidad de pseudo-primer orden. La constante de velocidad de de segundo orden ( $k_2$ ) se obtuvo a partir de la pendiente de la gráfica  $k_1$  vs concentración de derivatizante.

$$y = y_0 + Ae^{-k_1 t}$$

Ec. 5. Ecuación de decaimiento exponencial de pseudo-primer orden; en donde  $y$  es la actividad residual;  $A$  es la amplitud,  $x$  es el tiempo y  $y_0$  es el valor de  $y$  a  $x = \alpha$ .

#### 5.10 Efecto de la Hidrólisis con Subtilisina en la Actividad de la Enzima.

Se examinó la susceptibilidad de TbTIM7mutTcTIM, a la hidrólisis limitada por subtilisina. Se hicieron dos tipos de experimentos: A) Se incubó la enzima a una concentración de 1 mg/mL en presencia de diferentes concentraciones de subtilisina, para tener relaciones molares desde 0.001 hasta 1 subtilisina/TIM y B) Ensayos temporales a una relación molar subtilisina/TIM de 0.01 y 0.002; ambos experimentos se realizaron durante 36 horas a 30°C en amortiguador TE 100/10, pH 7.4. En cada tiempo la proteólisis se detuvo mediante la adición de PMSF a una concentración final de 5 mM, se incubó durante 10 min y se midió la actividad con 5 ng/mL de proteína en cada celda de reacción. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad residual en el cual el 100% de actividad corresponde a la actividad de la enzima incubada en las mismas condiciones sin subtilisina.

La proteólisis de la enzima se monitoreó mediante geles SDS-PAGE al 16%, teñidos con azul de Coomassie.

Con el fin de secuenciar los fragmentos resultantes de la hidrólisis, se hicieron geles SDS-PAGE al 16%, en donde se cargaron 100 µg totales de proteína. Estos geles

fueron tranferidos a membranas de PVDF y los fragmentos fueron secuenciados por degradación de Edman en el laboratorio de Dr. Guillermo Mendoza en la Facultad de Medicina.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1. Obtención de la Séptuple Mutante.

En las figuras 16-19 se muestran los productos de PCR obtenidos para cada mutante parcial, donde se corrobora que los productos de PCR presentan los pesos esperados (Tabla 4).

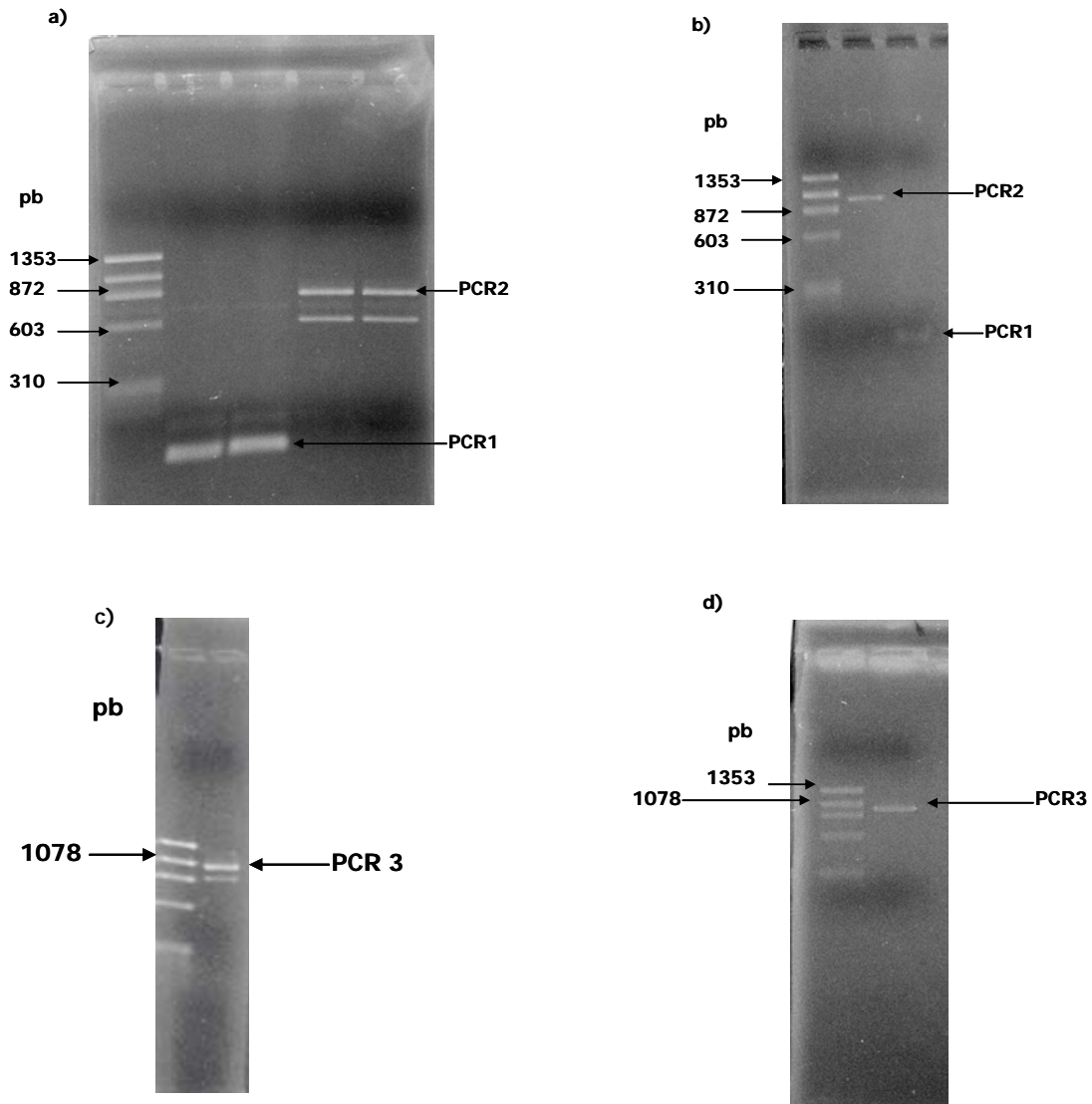


Figura 16. Electroforesis en geles de agarosa al 1%. Productos amplificados por PCR para la mutante Q18E/Q19S. a) PCR1: 143 pb, PCR2: 976 pb; b) PCR1 y PCR2 purificados; c) PCR3: 1102 pb; d) PCR3 purificado.



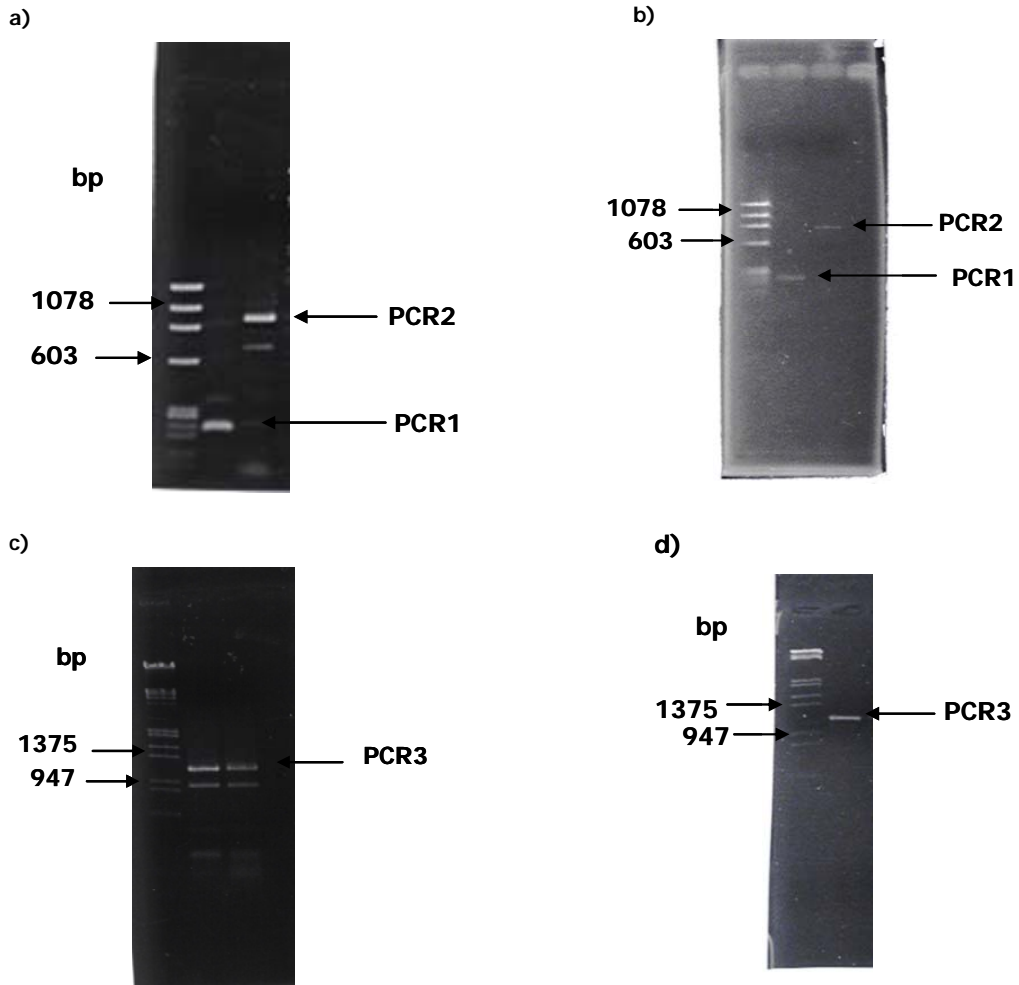
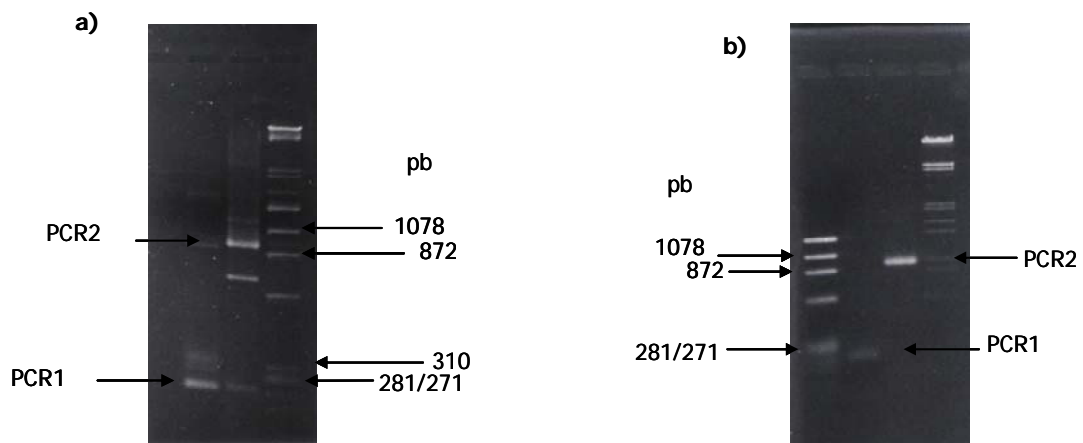


Figura 17. Electroforesis en geles de agarosa al 1%. Productos amplificados por PCR para la mutante V46L. a) PCR1: 226 pb, PCR2: 893 pb; b) PCR1 y PCR2 purificados; c) PCR3: 1102 pb; d) PCR3 purificado. El PCR3 posee las mutaciones Q18E/Q19S/V46L.



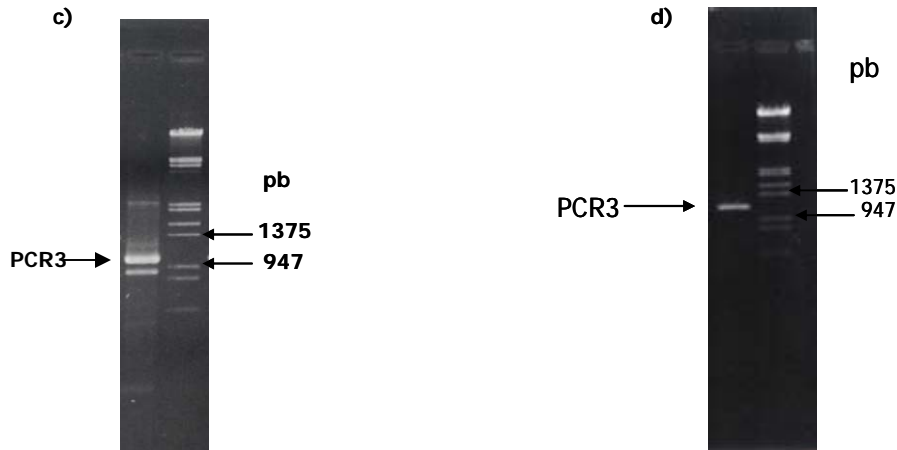


Figura 18. Electroforesis en geles de agarosa al 1%. Productos amplificados por PCR para la mutante L481/A49P. a) PCR1: 238 pb, PCR2: 885 pb; b) PCR1 y PCR2 purificados; c) PCR3: 1102 pb; d) PCR3 purificado. El PCR3 posee las mutaciones Q18E/Q19S/V46L/L481/A49P.

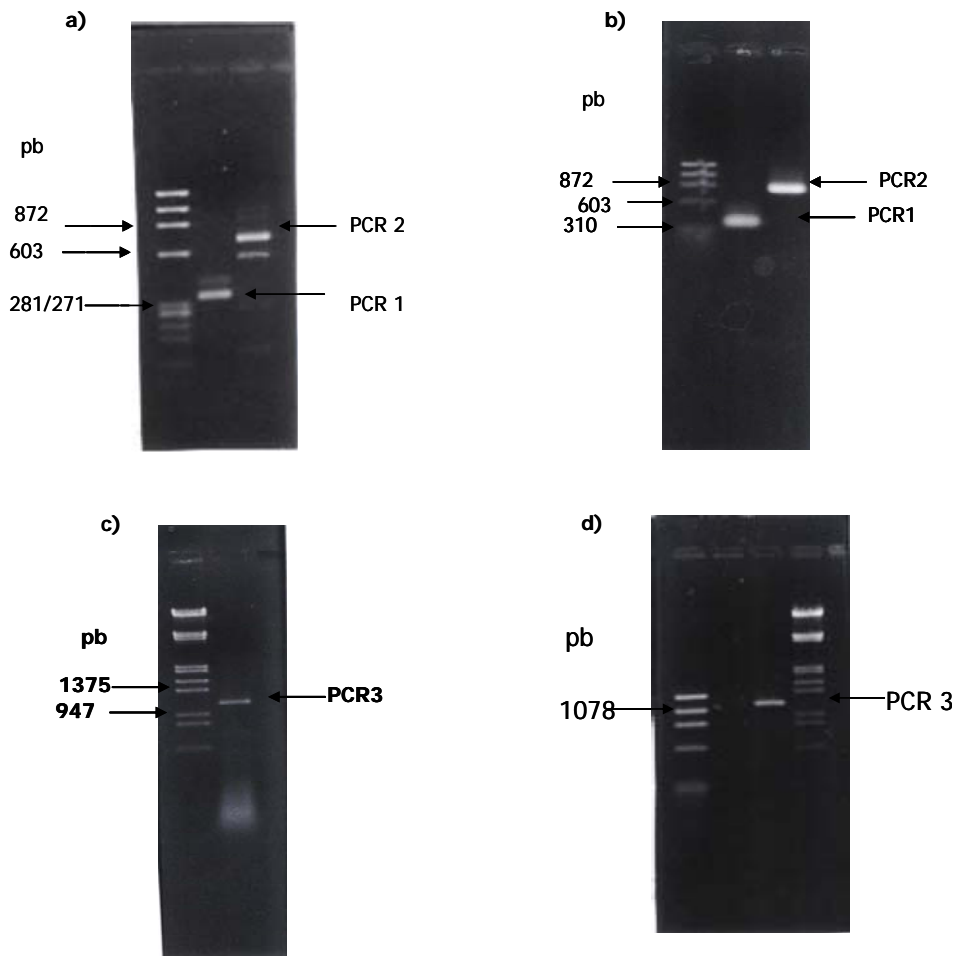


Figura 19. Electroforesis en geles de agarosa al 1%. Productos amplificados por PCR para la mutante F86Y/V88I. a) PCR1: 351 pb, PCR2: 771 pb; b) PCR1 y PCR2 purificados; c) PCR3: 1102 pb; d) PCR3 purificado. El PCR3 posee las mutaciones Q18E/Q19S/V46L/L481/A49P/F86Y/V88I.

Una vez que se obtuvo el PCR3 para F86Y/V88I que posee las siete mutaciones, se clonó este producto de PCR en el plásmido de expresión pET-3a, el cual fue utilizado para transformar células competentes *E. coli* Top 10. En la figura 20, se muestra el monitoreo de las clonas transformantes, digeridas con Pst-1 donde se observa que 7 de 13 clonas poseen el inserto. Se purificó DNA de la clona 2a y se mandó a secuenciar con los oligonucleótidos T7 Promotor y T7 terminador (Sección 5.1), que flanquean el gen. En la figura 21 se muestra el electrofluorograma del gen en donde se distinguen con un recuadro, el cambio de codones de las siete mutaciones.

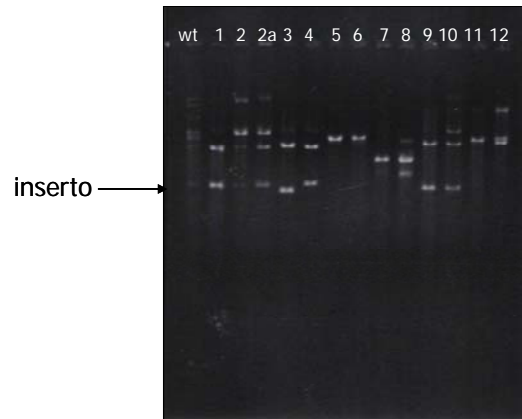


Figura 20. Clonas transformantes del gen de la séptuple mutante que codifica para TbTIM7mutTcTIM. El DNA de cada clona fue digerido con Pst-1, que da origen a dos fragmentos de 1877 pb (inserto) y 3733 pb respectivamente.

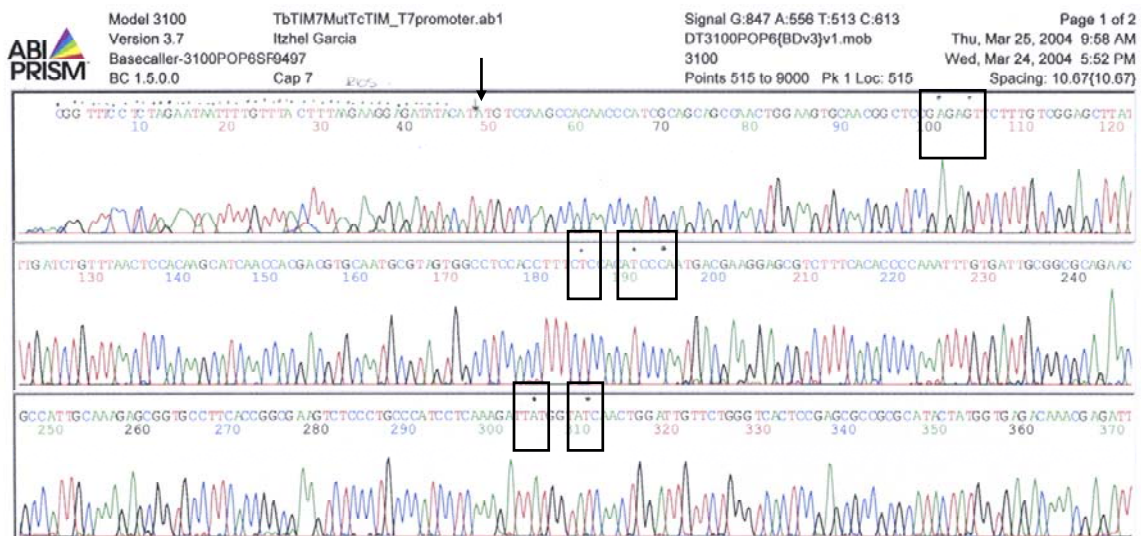


Figura 21. Electrofluorograma de secuenciación del gen de TbTIM7mutTcTIM, con el oligonucleótido externo T7 promotor. Con ↓ se muestra el codón ATG que codifica para la metionina inicial. En cada recuadro se muestra el cambio de codones para los **residuos mutagénicos** que corresponden a los de la interfase de TcTIM.  
 Q18E: CAA/ **GAG**, Q19S: CAG/**AGT**, V46L: GTT/**CTC**, L48I: CTT/**ATC**, A49P: GCC/**CCA**, F86Y: TTC/**TAT**, V88I: GTC/**ATC**.



De acuerdo a lo que se observa en el carril 3, la banda de 27 kDa que corresponde al monómero de TbTIM7mut se encuentra predominantemente en el precipitado, por lo que se decidió purificarla como TbTIM silvestre. En los carriles 4 y 5 se puede observar que una vez que la proteína se solubilizó con NaCl, se enriqueció de manera considerable y el remanente de proteína en la pastilla, que resulta después de centrifugar, fue muy poca (carril 6). Cabe hacer notar que ésta es una mutante que requiere muchos ciclos de sonicación para lisar las células, con respecto a los requeridos en enzima silvestre, ya que requiere 7 ciclos, mientras que la enzima silvestre con 4 ciclos se puede observar que la mayoría de las células se encuentran lisadas.

Un primer lote de proteína, aproximadamente de 7 mL se cargó en la columna de intercambio iónico de carboximetil-sepharosa, equilibrada con amortiguador A, pH 8.0. En la figura 24a se muestran algunas de las fracciones eluidas con un gradiente de NaCl desde 50 a 150 mM; ahí se observa que la proteína eluye desde la fracción No. 5. Se juntaron las fracciones 8-11 que se muestran en el recuadro.

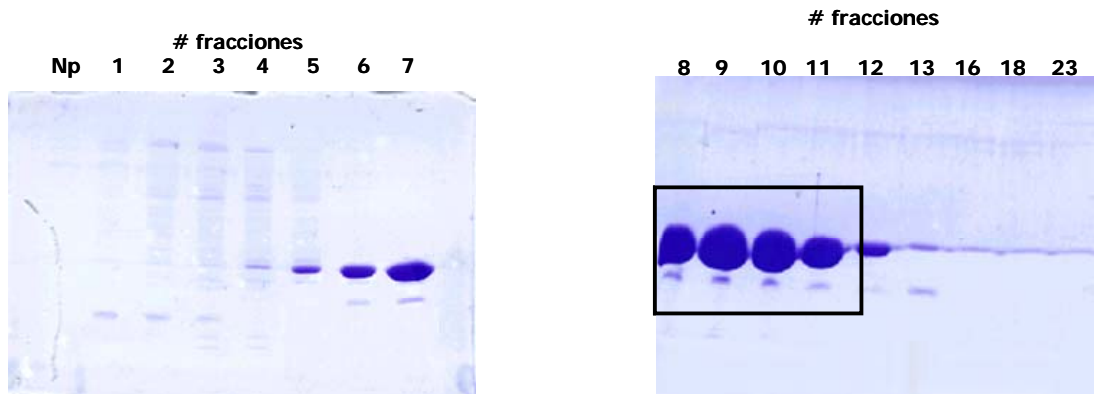


Figura 24a. Fracciones eluidas de la Columna de intercambio iónico, Carboximetil-Sepharosa con un gradiente de NaCl de 50 a 150 mM. La proteína de interés se encuentra mayoritariamente en las fracciones 8-11.

Un segundo lote de proteína, con el mismo volumen del lote anterior, se cargó también en la columna de intercambio iónico, sólo que ésta se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 150 mM. En la figura 24 b se observa que en las primeras fracciones se eluyen otras proteínas que no se adsorben a la columna y posteriormente la proteína comienza a eluir. Esto ayuda a que se eliminen otras proteínas en las primeras

fracciones y que la proteína se obtenga con mayor grado de pureza. Se juntaron las fracciones 20 - 24, que se muestran en el recuadro.

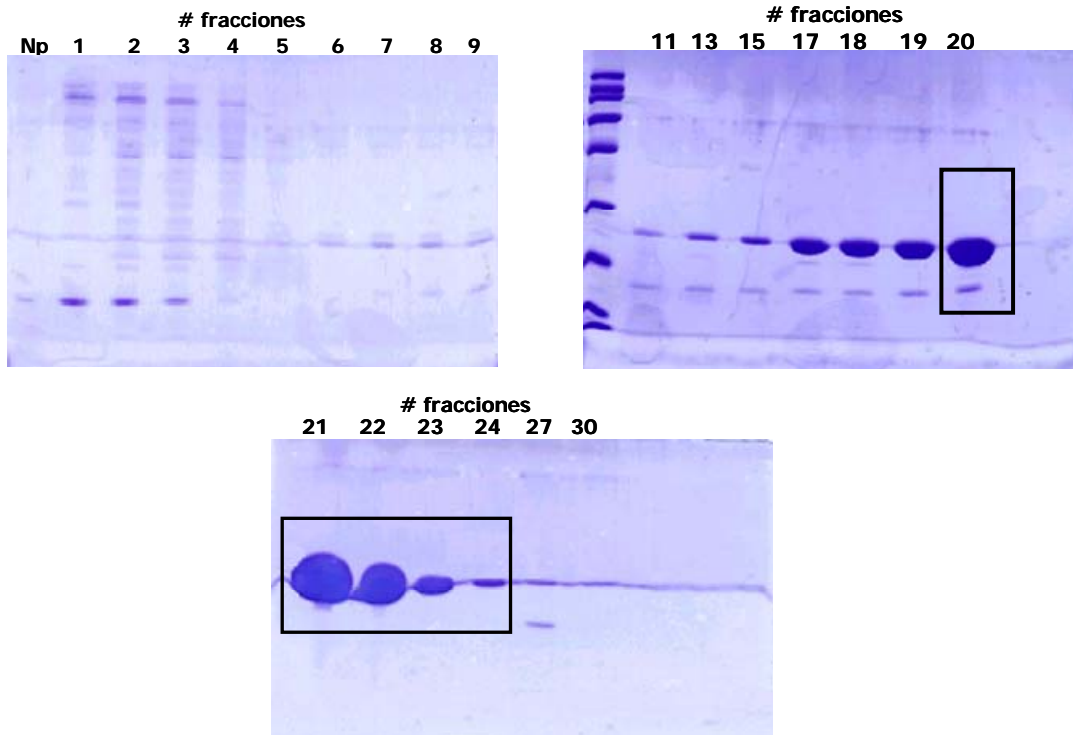


Figura 24b. Fracciones eluidas de la Columna de intercambio iónico, Carboximetil-Sepharosa con un gradiente de NaCl de 0 a 150 mM. La proteína de interés se encuentra mayoritariamente en las fracciones 17-24. Se juntaron las fracciones 20-24.

En las fracciones reunidas de ambos lotes, se cuantificó proteína a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar de  $36\ 130\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  (Tabla 5). Las concentraciones y cantidad final de proteína para ambos lotes se reportan en la tabla 6.

Lote	Concentración (mg/mL)	Volumen total (mL)	Rendimiento (mg/ 500 mL de medio de cultivo)
1	4.181	7.9	33
2	4.358	10.250	44.7

Tabla 6. Rendimiento de la purificación de TbTIM7mutTcTIM, partiendo de 500 mL de medio de cultivo.

La proteína de ambos lotes se precipitó al 70% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y se almacenó a 4°C.

#### 6.4 Determinación de la Actividad Catalítica.

La tabla 7 muestra la tabla de purificación que contiene la actividad determinada en cada paso de la purificación, así como la actividad de la proteína pura.

<b>Fracción</b>	<b>Act. Total μmol/min</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Actividad específica μmol/min/mg</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>Lisado celular</b>	298,022	1246.8	239.03	100
<b>Sobrenadante NaCl200mM</b>	74,115	211.6	350.26	49.73
<b>Diálisis</b>	36,797	38.04	967.35	12.34
<b>CM-sepharose</b>	87,112	35.23	2472.67	29.23

Tabla 7. Tabla de purificación de TbTIM7mutTcTIM.

La actividad catalítica se determinó utilizando dos diluciones seriadas de la enzima: primeramente se llevó a una concentración de 20 μg/mL, después a 500 ng/mL y, finalmente en la celda de reacción a 5 ng/mL: es decir se utilizaron tres diluciones. Al monitorear la actividad a lo largo del tiempo se pudo observar que la enzima pierde considerablemente actividad en los primeros minutos de reacción; estos resultados se observan en la tabla 8.

<b>Tiempo</b>	<b>Actividad específica μmol/min/mg</b>
<b>1er minuto</b>	<b>2472.67 ± 84.45</b>
<b>Minuto 2 al 10</b>	<b>2180.23 ± 132.85</b>
<b>Minuto 11-15</b>	<b>1997.44 ± 91</b>

Tabla 8. Actividad específica de TbTIM7mutTcTIM en los primeros minutos de reacción, utilizando dos diluciones de la enzima, primero se diluyó a una concentración de 20 μg/mL, una segunda dilución para tenerla a una concentración de 500 ng/mL y finalmente una tercera dilución que lleva una concentración a la celda de reacción a 5 ng/mL.

Debido a la inestabilidad observada, se realizaron experimentos en los que la enzima se incubó a diferentes concentraciones: desde 20 hasta 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Se midió la actividad y se observó que la actividad dependía de la concentración de incubación de la enzima (Tabla 9) de tal forma que, a partir de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la actividad se mantuvo constante y alcanzó valores semejantes a los obtenidos con TbTIM silvestre. De tal forma que en todos los ensayos siguientes la proteína se incubó a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y, para medir actividad, se hizo una primera dilución para llevar a la proteína a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para después diluirla a 5  $\text{ng}/\text{mL}$  en la celda de reacción.

<b>[Enzima] (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Actividad específica <math>\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}</math></b>
<b>20</b>	<b>2320.47</b>
<b>50</b>	<b>2423.36</b>
<b>100</b>	<b>2395.50</b>
<b>150</b>	<b>2627.47</b>
<b>200</b>	<b>2986.10</b>
<b>300</b>	<b>2984.70</b>

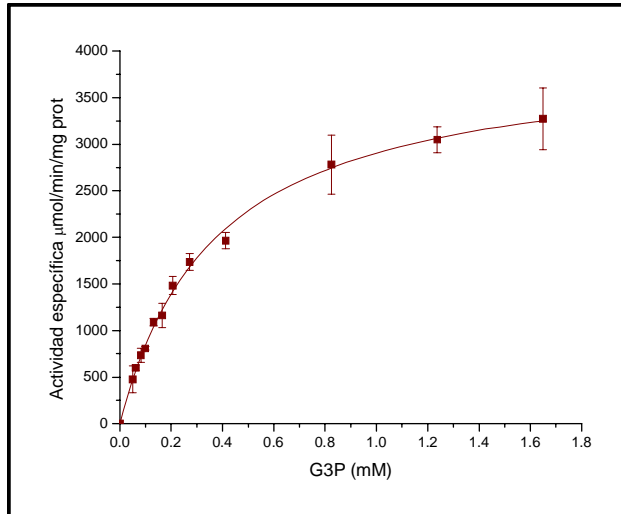
Tabla 9. Efecto de la concentración de proteína en la actividad de TbTIM7mutTcTIM

### 6.5 Caracterización cinética de TbTIM7mutTcTIM.

Se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $k_{cat}$  para TbTIM7mut, utilizando como sustrato G3P. En la figura 25a se muestra el ajuste de los datos de tres experimentos independientes, a diferentes concentraciones de sustrato. Los valores se ajustaron a la ecuación de Michaelis y Menten con la cual, mediante regresión no lineal, se obtuvieron los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ . Los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  se reportan en la figura 25b y se comparan con los datos reportados, tanto para las enzimas silvestres (TbTIM y TcTIM), como para la mutante de TcTIM, que posee la interfase de TbTIM (TcTIM7mutTbTIM).



a)



b)

Enzima	$K_m$ (mM)	$k_{cat} \times 10^5$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m \times 10^7$ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
TbTIM	0.45	3.1	1.15
TcTIM	0.43	2.7	1.05
TcTIM7mutTbTIM	0.4	2.98	1.34
TbTIM7mutTcTIM	$0.37 \pm 0.018$	$2.14 \pm 0.23$	0.96

Figura 25. Determinación de parámetros cinéticos de TbTIM7mutTcTIM. a) Gráfica de concentración de sustrato (G3P) vs actividad específica de la enzima que presenta un comportamiento tipo Michaelis Menten. b) Tabla de valores de  $K_m$ ,  $k_{cat}$  y eficiencia catalítica calculadas para TbTIM7mutTcTIM, se incluyen los valores reportados para TbTIM, TcTIM y TcTIM7mutTbTIM.

A pesar de que la constante de Michaelis disminuyó un poco, es decir la unión del sustrato a la enzima aumentó con respecto a lo observado en la enzima silvestre, su catálisis ( $k_{cat}$ ) disminuyó una unidad; es decir el sustrato se une con buena afinidad al sitio catalítico, pero la interconversión entre G3P y DHAP es más lenta. Es decir las mutaciones en la interfase de TbTIM afectan de alguna manera el sitio catalítico lo que trae como consecuencia una enzima con una eficiencia catalítica menor con respecto a la enzima silvestre.

## 6.6 Propiedades Espectroscópicas.

### 6.6.1 Estructura secundaria seguida por Dicroísmo Circular.

Los espectros de dicroísmo circular tanto de TbTIM7mutTcTIM, como de las otras enzimas utilizadas para comparar, se muestran en la figura 26, en donde se puede apreciar que todas las enzimas presentan espectros característicos de proteínas  $\alpha/\beta$ , mostrando los mínimos característicos de  $\alpha$ -hélices a 208 y 222 nm que se superponen con el mínimo correspondiente a  $\beta$ -plegadas entre 210-220 nm. No se observan diferencias significativas entre los espectros, lo que indica que, con respecto a la enzima silvestre, TbTIM7mutTcTIM no presenta cambios considerables en su estructura secundaria con respecto al estado nativo de la proteína.

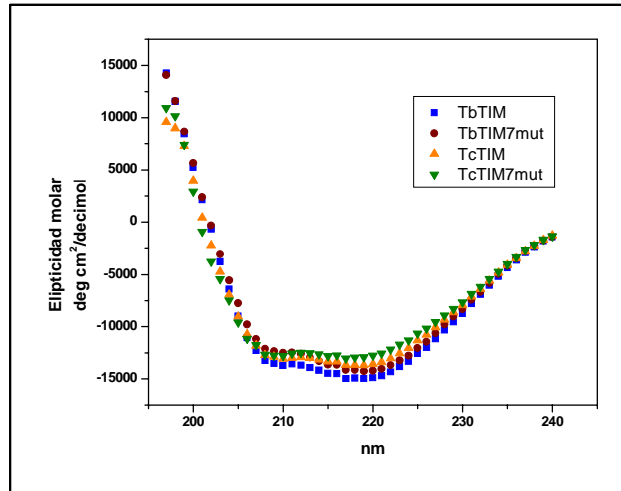
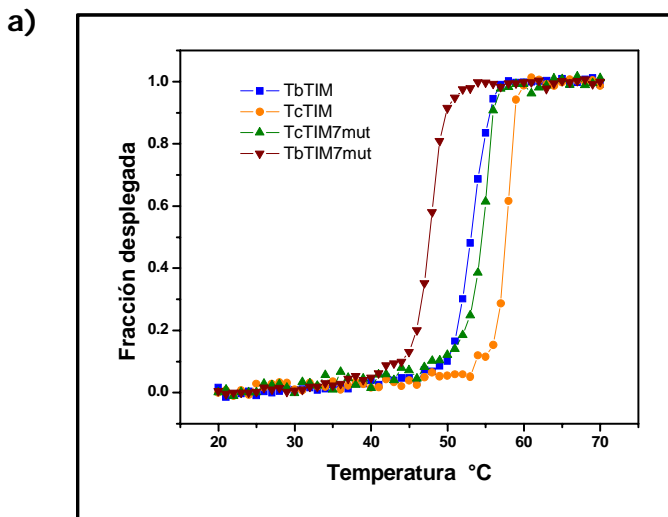


Figura 26. Espectros de Dicroísmo Circular para TbTIM, TcTIM, TbTIM7mutTcTIM y TcTIM7mutTbTIM a 25 °C y en amortiguador de fosfatos 25 mM, NaCl 20 mM pH 7.4. Concentración de proteína: 200 µg/mL.

### 6.6.2 Estabilidad térmica seguida por dicroísmo circular.

El patrón de desplegamiento térmico de TbTIM, TcTIM, TcTIM7mutTbTIM y TbTIM7mutTcTIM se siguió por dicroísmo circular monitoreando la señal a 222 nm como se muestra en la figura 27a. A partir de estas gráficas se calcularon los valores de  $\Delta T_m$  aparente (ya que el proceso de desplegamiento para TbTIM es irreversible). En el recuadro de la figura 27b se muestran los valores de  $T_m$  calculados para cada enzima.



b)

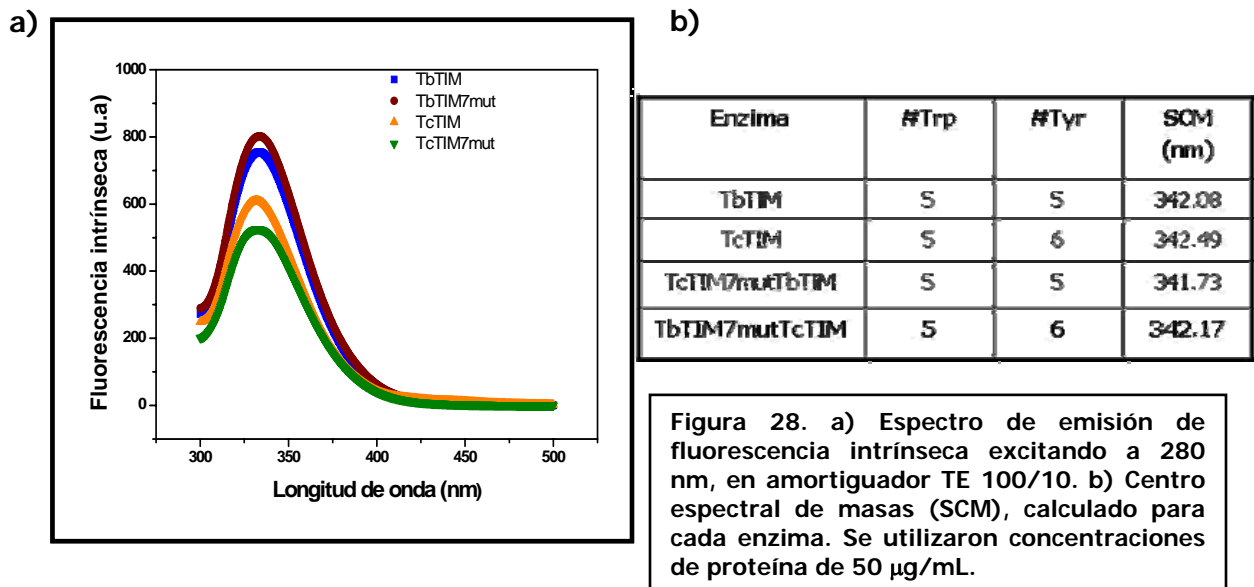
	$T_m$ °C
<b>TbTIM</b>	<b>53.02</b>
<b>TcTIM</b>	<b>57.62</b>
<b>TcTIM7mut</b>	<b>54.36</b>
<b>TbTIM7mut</b>	<b>47.60</b>

Figura 27. a) Curvas de desnaturalización seguidas por dicroísmo circular a 222 nm en un intervalo de temperatura de 20 a 70° C. b)  $T_m$  aparente calculada para cada enzima.

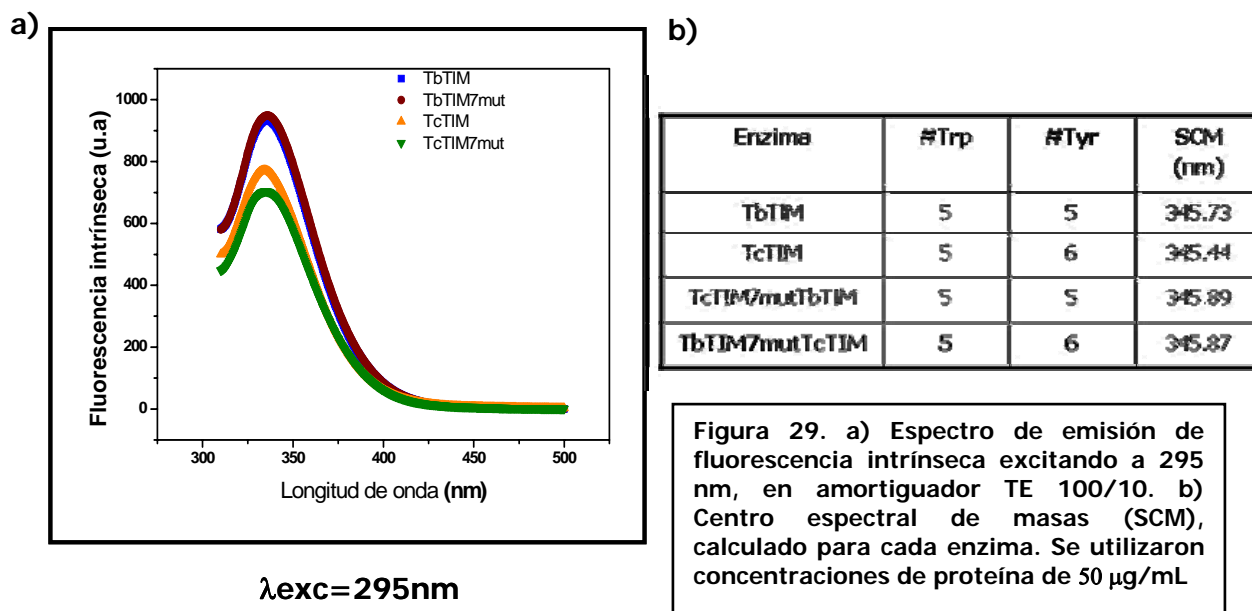
Hay una diferencia de 4° C entre las Tm´s calculadas para TbTIM y TcTIM, siendo más estable TcTIM. La interfase de TbTIM en TcTIM en la mutante TcTIM7mutTbTIM, resulta en una enzima más termosensible, ya que se observa una disminución de 3° C con respecto a TcTIM silvestre. Sin embargo, en la mutante TbTIM7mutTcTIM, que es TbTIM con la interfase de TcTIM, resultó en una enzima mucho más inestable al desplegamiento por temperatura, ya que la Tm disminuye 6°C con respecto a TbTIM silvestre.

### 6.6.3 Estructura terciaria seguida por Fluorescencia intrínseca.

Con el fin de monitorear la estructura terciaria de las enzimas mutantes y de las enzimas silvestres, se tomaron espectros de fluorescencia excitando a 280 nm, para ver la emisión de tirosinas y triptofanos (figura 28a) y a 295 nm para observar la contribución únicamente de los triptofanos (figura 29a). En la figura 28b se muestra el número total de tirosinas y triptofanos que presenta cada enzima, así como el valor del centro de masa espectral calculado para cada una.



$\lambda_{exc}=280nm$



A pesar de que TcTIM tiene un residuo de tirosina más, cuando se excita a 280 nm, presenta una menor intensidad de fluorescencia con respecto a TbTIM, lo que nos podría indicar que el ambiente de los residuos de tirosina y triptofano en TbTIM es diferente con respecto a los residuos de TcTIM, que permite que se emita una mayor intensidad de fluorescencia. Sin embargo, en la mutante TbTIM7mutTcTIM, que posee una tirosina más, presenta una intensidad ligeramente mayor de fluorescencia con respecto a TbTIM silvestre, mientras que TcTIM7mutTbTIM, que tiene una tirosina menos, la intensidad de fluorescencia es menor con respecto a TcTIM silvestre.

Cuando se excita a 295 nm para observar solamente la contribución a la fluorescencia de los residuos de triptofano, tanto TbTIM como TbTIM7mutTcTIM, presentan una intensidad de fluorescencia muy similar. TcTIM7mutTbTIM siempre presenta una intensidad de fluorescencia menor, con respecto a TcTIM silvestre y a las otras enzimas.

Cabe mencionar que los valores de Centro de Masa Espectral (SCM) a ambas longitudes de onda entre las cuatro enzimas son muy similares: no hay corrimientos hacia el rojo o a hacia el azul que nos puedan indicar que hay algún cambio en la exposición de los triptofanos al solvente en las enzimas mutantes con respecto a las silvestres.

## 6.7 Efecto de los Reactivos de Sulfhidrilo en la Actividad de la Enzima.

En múltiples experimentos se ha visto que el metilmetano-tiosulfonato (MMTS) y el 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) inactivan a las TIM's de tripanosomátidos que poseen una cisteína en la posición 14, lo cual produce alteraciones estructurales que llevan a la derivatización de residuos de Cys, originalmente no expuestos. Sin embargo estos reactivos no afectan o afectan muy poco a las enzimas que poseen un aminoácido distinto a cisteína en la posición 14. Por ejemplo, la enzima de humano que posee una metionina en esta posición no se ve alterada por este agente, a pesar de tener otras cisteínas en su secuencia (Gómez-Puyou, *et al.*, 1995., Garza-Ramos, *et al.*, 1998., Pérez-Montfort., *et al.*, 1999). Otros ensayos han demostrado que cuando la cisteína 14 de TbTIM se muta por Alanina o Serina, resulta en enzimas completamente resistentes a concentraciones altas de derivatizante (Hernández-Alcántara G. *et al.*, 2002). TbTIM y TcTIM presentan un comportamiento muy diferente ante el efecto de los derivatizantes; TcTIM es alrededor de 70 veces más susceptible con respecto a TbTIM. Se probó el efecto de los reactivos de grupo sulfhidrilo en la actividad de TbTIM7mut, con el fin de saber si los residuos de la interfase de TcTIM contribuyen en la sensibilidad al MMTS y DTNB en TbTIM. Es importante mencionar que la otra mutante de la interfase, TcTIM con la interfase de TbTIM no presentó un cambio considerable ante el efecto de los derivatizantes con respecto a TcTIM silvestre.

### 6.7.1 Ensayos de inactivación por MMTS.

El MMTS se probó a distintas concentraciones en la actividad de TbTIM7mutTcTIM, en un intervalo de 0 a 1000  $\mu\text{M}$  durante dos horas a 25 °C (Fig. 30). También se muestra el comportamiento de TbTIM, TcTIM y TcTIM7mutTbTIM.

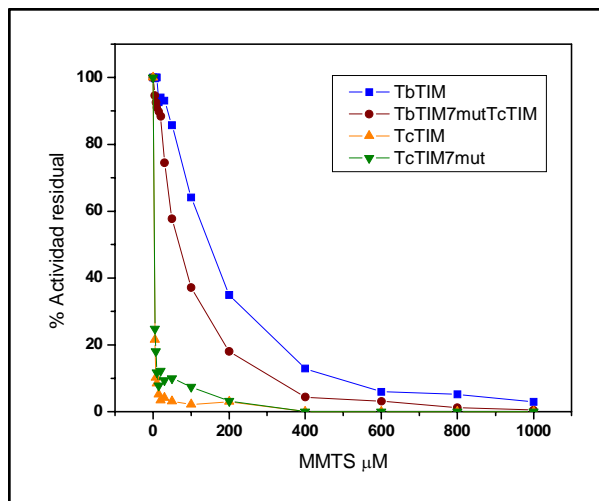


Fig. 30. Curvas de inactivación por MMTS en TbTIM, TcTIM, TbTIM7mutTcTIM y TcTIM7mutTbTIM. Las enzimas se incubaron a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en amortiguador TE 100/10, a 25°C y a diferentes concentraciones de MMTS.

Se puede observar que TbTIM7mutTcTIM es más sensible al efecto del MMTS, con respecto a TbTIM silvestre, y que desde las concentraciones más bajas se aprecia una pérdida importante de actividad. En 150  $\mu\text{M}$  de MMTS, donde TbTIM todavía presenta cerca del 70% de actividad, TbTIM7mutTcTIM ya ha perdido más del 50%. TcTIM y TcTIM7mutTbTIM pierden actividad desde concentraciones del orden de 25  $\mu\text{M}$ .

Se monitoreó la actividad de la séptuple mutante a una concentración fija de MMTS (0.7 mM) durante dos horas, tomando alícuotas a diferentes intervalos de tiempo para medir su actividad (Fig. 31).

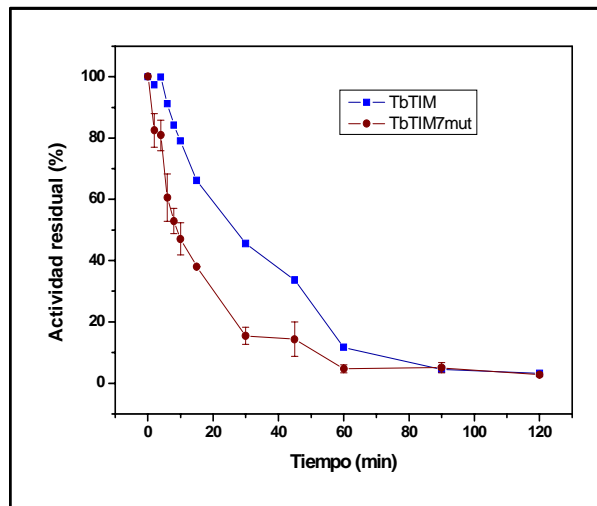


Fig. 31. Curvas temporales de inactivación por MMTS 0.7 mM en TbTIM, TbTIM7mutTcTIM incubadas a 25° C a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en amortiguador TE 100/10.

Desde los primeros minutos de incubación en presencia de 0.7 mM de MMTS, TbTIM7mutTcTIM pierde actividad; al cabo de diez minutos, donde la enzima silvestre mantiene casi el 80% de su actividad, la mutante ha perdido el 50% de su actividad; el efecto es aún mayor a la media hora, en donde la mutante presenta el 10% de su actividad y TbTIM silvestre todavía mantiene el 50%.

### 6.7.2 Ensayos de inactivación por DTNB.

Se realizaron ensayos de inactivación enzimática por el ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), utilizando concentraciones en un intervalo de 0 - 2 mM y midiendo la actividad al tiempo cero y a las dos horas de incubación. En la figura 32 se muestra el comportamiento de TbTIM7mutTcTIM, TbTIM, TcTIM y TcTIM7mutTbTIM.

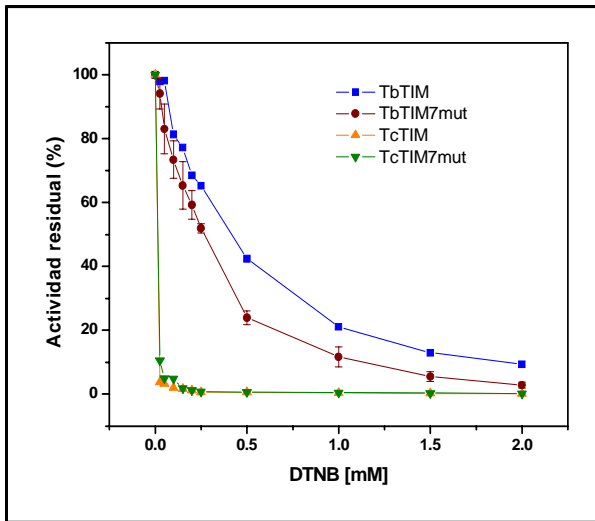


Figura 32. Curvas de inactivación por DTNB en TbTIM, TcTIM, TbTIM7mutTcTIM y TcTIM7mutTbTIM. Las enzimas se incubaron a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en amortiguador TE 100/10, a 25° C y a diferentes concentraciones de DTNB.

TbTIM7mutTcTIM pierde de manera importante su actividad desde concentraciones bajas de DTNB; sin embargo TcTIM y TcTIM7mutTbTIM pierden por completo su actividad desde concentraciones del orden  $\mu\text{M}$ . En ensayos temporales, en donde se incubó la enzima a una concentración de 1 mM de DTNB y se midió su actividad a diferentes intervalos de tiempo (Figura 33), se observa que esta mutante de TbTIM con la interfase de TcTIM, es más sensible al efecto del DTNB. De tal forma que, desde los primeros minutos de incubación hay una pérdida sustancial de su actividad y al cabo de 90 minutos, ha perdido casi por completo su actividad, mientras que TbTIM silvestre todavía presenta alrededor del 50% de actividad.

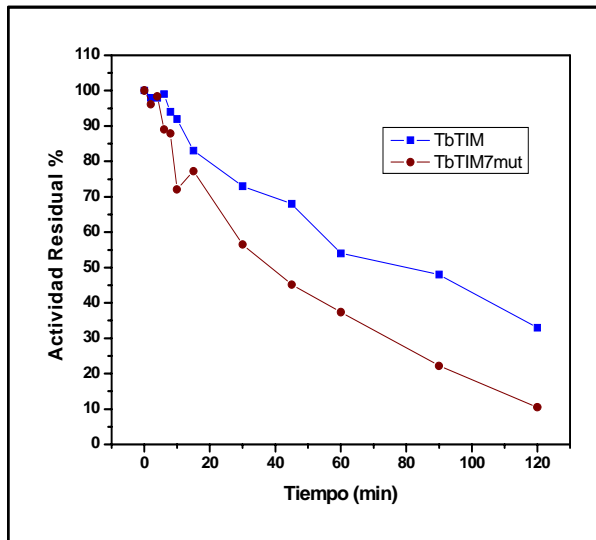


Figura 33. Curvas temporales de inactivación por DTNB 1 mM en TbTIM y TbTIM7mutTcTIM incubadas a 25° C a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en amortiguador TE 100/10.

### 6.7.3 Determinación de la constante de inactivación ( $k_2$ ) para el efecto de los derivatizantes en la actividad de TbTIM7mutTcTIM.

Para poder comparar esta mutante tanto con TbTIM y TcTIM como con otras enzimas que han sido caracterizadas en su comportamiento al efecto de estos derivatizantes, se realizaron ensayos temporales a diferentes concentraciones, tanto de MMTS como DTNB. En la figura 34a se muestran las gráficas obtenidas para la inactivación de TbTIM7mutTcTIM a diferentes concentraciones de MMTS. Estas gráficas fueron ajustadas a la ecuación 5 que obedece al decaimiento exponencial de pseudo-primer orden, de donde se obtuvieron los valores de  $k_1$  para cada concentración de derivatizante. Estas constantes se graficaron vs cada concentración utilizada (Fig 34b), y por medio de la pendiente de la recta, se obtuvo la constante de segundo orden ( $k_2$ ). En la figura 35a y 35b se presentan los datos obtenidos con DTNB. En la tabla 10 se presenta el valor de las  $k_2$  obtenidas, así como aquellas reportadas para TbTIM y TcTIM, respectivamente.

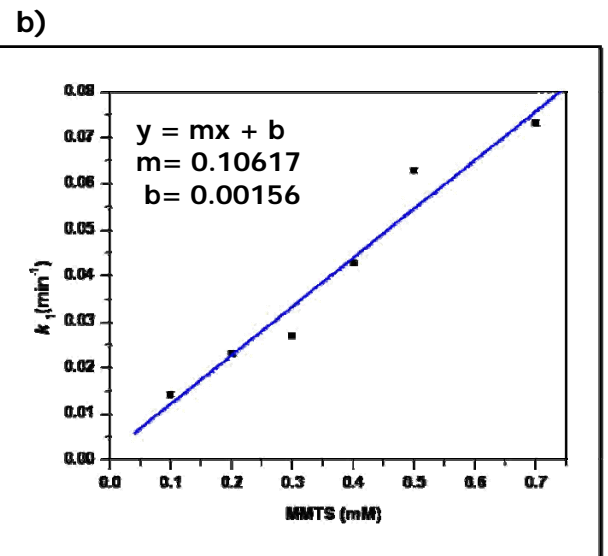
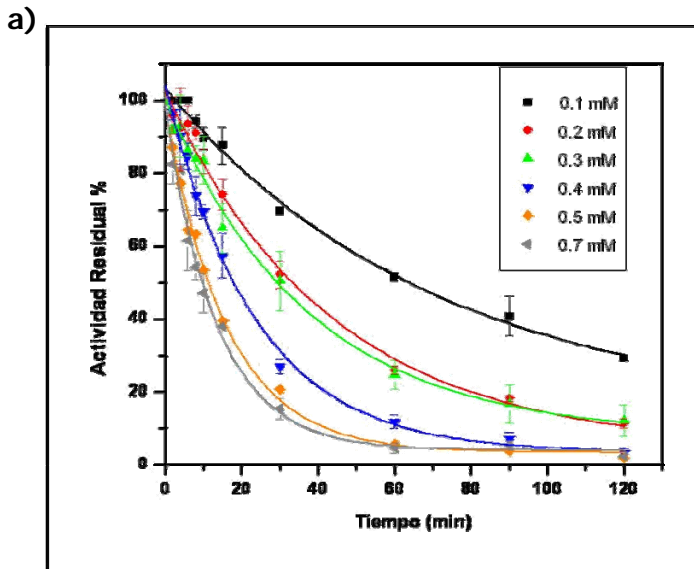
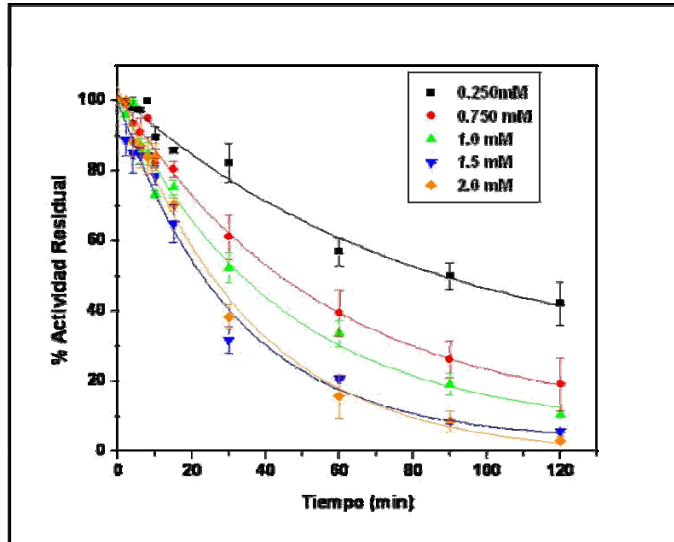


Figura 34. a) Curvas temporales de inactivación de TbTIM7mutTcTIM a diferentes concentraciones de MMTS incubadas durante 2 horas a 25° C  
b) Regráfico de las constantes de pseudo-primer orden obtenidas a partir de a) vs cada concentración utilizada de MMTS; a partir de esta gráfica se calculó la  $k_2$ .



a)



b)

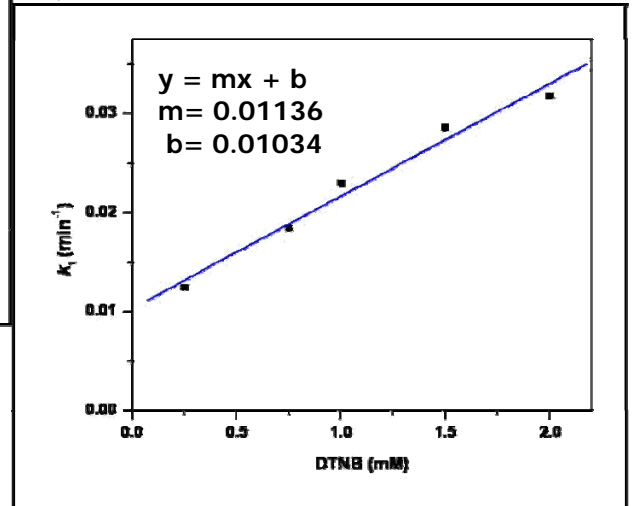


Figura 35. a) Curvas temporales de inactivación de TbTIM7mutTcTIM a diferentes concentraciones de DTNB incubadas durante 2 horas a 25° C b) Regráfico de las constantes de pseudo-primer orden obtenidas a partir de a) vs cada concentración utilizada de DTNB; a partir de esta gráfica se calculó la  $k_2$ .

TIM	$k_2$ (MMTS) $M^{-1} s^{-1}$	$k_2$ (DTNB) $M^{-1} s^{-1}$
TbTIM	0.58	0.15
TcTIM	40	24
TbTIM7mut	1.76	0.19

Tabla 10. Constantes de inactivación por MMTS y DTNB obtenidas para TbTIM7mut en comparación con las reportadas para TbTIM y TcTIM.

## 6.8 Efecto de la Hidrólisis con Subtilisina en la Actividad de la Enzima.

Inicialmente se probaron diferentes concentraciones de subtilisina, manteniendo constante la concentración de TbTIM7mutTcTIM. Paralelamente, se hicieron los mismos ensayos en TbTIM silvestre y se midió la actividad después de 36 horas de incubación (Figura 36).

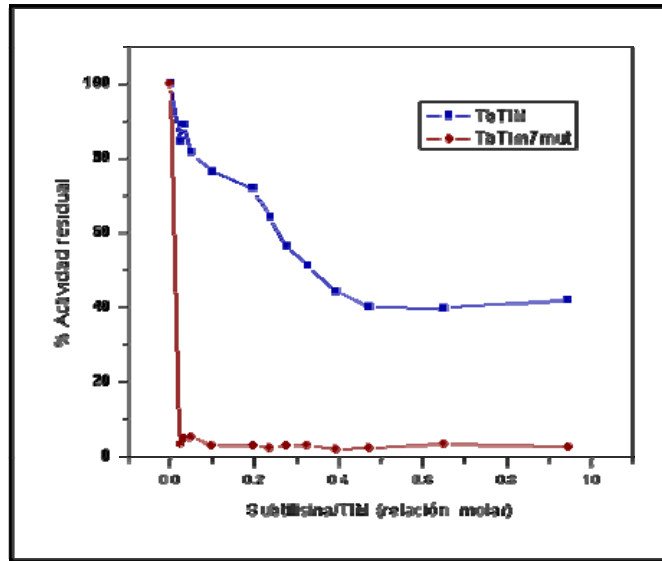


Figura 36. Efecto de diferentes concentraciones de subtilisina en la actividad de TbTIM y TbTIM7mutTcTIM. Las enzimas se incubaron a 30° C a una concentración de 1 mg/mL en amortiguador TE 100/10, en presencia de subtilisina en las relaciones molares sub/TIM indicadas. Después de 36 h de incubación, la proteólisis fue detenida con PMSF 3 mM y se midió la actividad. La actividad se reporta como actividad residual tomando como 100% la actividad de la enzima control que fue incubada en las mismas condiciones sin subtilisina.

Desde las concentraciones más bajas de subtilisina, TbTIM7mutTcTIM pierde por completo actividad, mientras que en TbTIM silvestre, aún en condiciones equimolares con subtilisina, mantiene un 50% de actividad. En la figura 37 se muestra el patrón de digestión para las dos enzimas, en donde se observa que TbTIM se digiere parcialmente, generando fragmentos de pesos moleculares desde 5 kDa a 20 kDa, mientras que en TbTIM7mutTcTIM (Fig. 38), no se observan fragmentos, y desde las concentraciones más bajas se observa la desaparición del monómero de 27 kDa.

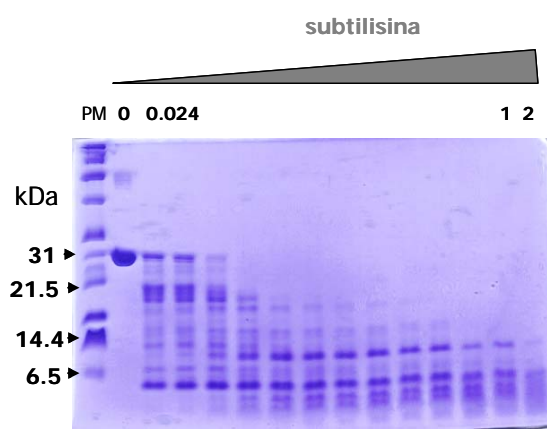


Figura 37. Patrón de digestión de TbTIM por subtilisina a diferentes relaciones molares. La enzima fue incubada en presencia de subtilisina durante 36 horas y la proteólisis fue detenida con PMSF 3 mM. Se cargaron 30  $\mu$ g de proteína en geles desnaturalizantes al 16%.

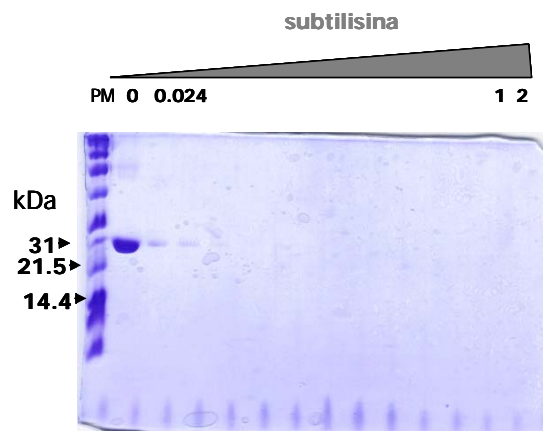


Figura 38. Patrón de digestión de TbTIM 7mutTcTIM por subtilisina a diferentes relaciones molares. La enzima fue incubada en presencia de subtilisina durante 36 horas y la proteólisis fue detenida con PMSF 3 mM. Se cargaron 30  $\mu$ g de proteína en geles desnaturalizantes al 16%.

En experimentos temporales digiriendo TbTIM con subtilisina a una relación molar 1:4 subtilisina/TIM, se observa la aparición mayoritaria de fragmentos de pesos moleculares de 13, 7.8 y 5.9 kDa, respectivamente (Reyes-Vivas., *et al.*, 2002). Para observar la desaparición gradual de la banda monomérica en TbTIM7mutTcTIM, se decidió probar concentraciones menores de subtilisina y probar si de igual manera que en la enzima silvestre se daba origen a péptidos de menor peso molecular. Se probaron relaciones molares subtilisina/TIM desde 0.02 (1:50) hasta 0.001 (1:1000) y se observó el patrón de digestión después de 36 horas de incubación (Fig. 39). Se observó que, efectivamente, la desaparición del monómero es gradual, pero no se observan fragmentos resultantes de hidrólisis.

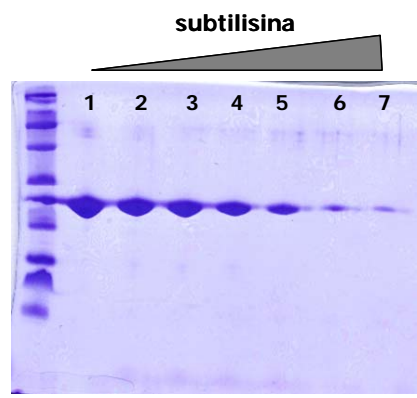


Figura 39. Hidrólisis por subtilisina de TbTIM7mutTcTIM durante 36 horas a 21° C. Relaciones molares sub/TIM utilizadas: (1) sin subtilisina; (2) 0.001; (3) 0.00125; (4) 0.0025; (5) 0.005; (6) 0.01; (7) 0.02. Se cargaron 30  $\mu$ g de proteína en geles desnaturalizantes al 16%.

Con los experimentos anteriores pudimos observar que esta mutante presenta un comportamiento muy similar al de TcTIM, ya que cuando se hacen ensayos con esta enzima, se observa un decaimiento de la banda de 27 kDa sin la aparición de fragmentos (Reyes-Vivas., et al., 2002). De esta forma se decidió trabajar con concentraciones muy bajas de subtilisina y observar el patrón de digestión en geles en condiciones desnaturalizantes en tiempos más cortos, desde las primeras horas de digestión (Fig. 40). Se seleccionaron las relaciones sub/TIM de 0.0025 (1:500) y 0.01 (1:100) (Fig. 40a y 40b, respectivamente).

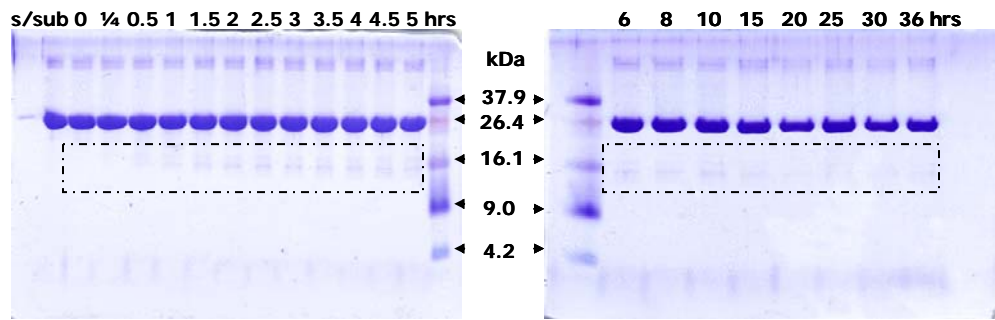


Figura 40a. Digestión temporal de TbTIM7mutTcTIM con subtilisina, a una relación molar sub/TIM de 0.0025, se tomaron alicuotas desde los quince minutos hasta las 36 horas. La reacción se detuvo con PMSF 3 mM y se cargaron geles desnaturalizantes al 16%.

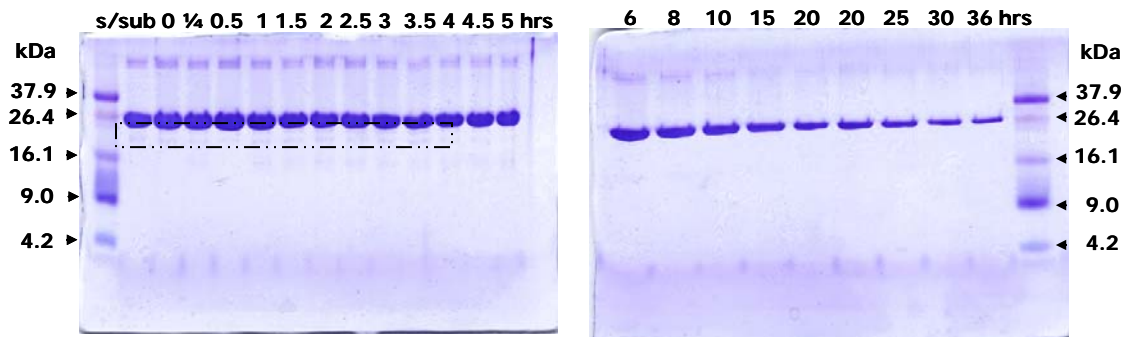


Figura 40b. Digestión temporal de TbTIM7mutTcTIM con subtilisina, a una relación molar sub/TIM de 0.01, se tomaron alicuotas desde los quince minutos hasta las 36 horas. La reacción se detuvo con PMSF 3 mM y se cargaron geles desnaturalizantes al 16%.

Utilizando estas concentraciones, y durante las primeras horas de digestión, se pudo apreciar la aparición de fragmentos de hidrólisis. En la relación 0.0025 (sub/TIM) se observa mayoritariamente un fragmento de peso aproximado a 16 kDa (se encuentra marcado en un recuadro), que en la concentración de 0.0025 (Sub/TIM) se mantiene después de las 36 horas de digestión. En el caso de la relación 0.01, los fragmentos que aparecen son de mayor peso molecular (marcados en un recuadro) y después de las cinco horas, estos fragmentos desaparecen. Tal parece que se siguen digiriendo hasta desaparecer; la desaparición de la banda del monómero es más evidente en la relación molar de 0.01 sub/TIM con respecto a lo observado en la relación de 0.0025 sub/TIM.

Se seleccionaron los tiempos de hidrólisis de 2.5, 5 y 8 horas utilizando una relación sub/TIM de 0.0025 para cargar en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 16%, 100 µg de proteína total, este gel fue transferido a una membrana de PVDF, y los fragmentos fueron secuenciados por degradación de Edman. El único fragmento detectado en la secuenciación corresponde a la banda de aproximadamente 16 kDa que se muestra en la figura 40a. La secuencia aminoterminal analizada corresponde a **GINWIV**; el primer aminoácido corresponde a la Gly 87; es decir en esta mutante el sitio de corte de la subtilisina corresponde al enlace peptídico entre la Tyr 86 y la Gly 87.

## 7. DISCUSIÓN.

Las secuencias de aminoácidos de TbTIM y TcTIM presentan una identidad del 73 %, las estructuras cristalográficas de ambas enzimas se superponen con un rms ("root mean square") de 0.96 Å en 497 átomos C<sup>α</sup> equivalentes (Maldonado E., *et al.*, 1998); sin embargo el comportamiento de estas enzimas ante el efecto de diversos agentes que afectan la catálisis enzimática es muy diferente. A lo largo de varios trabajos de investigación se han explorado diversas regiones de estas dos enzimas con el fin de conocer cuales residuos de aminoácidos son los responsables de estas marcadas diferencias (Maldonado E., *et al.*, 1998, Reyes-Vivas., *et al.*, 2001). El principal objetivo de este trabajo fue explorar los residuos de la interfase; en esta región, la identidad de entre TbTIM y TcTIM es del 82% es decir, solo hay 7 aminoácidos diferentes en ambas enzimas, que en TbTIM corresponden a la Gln 18, Gln 19, Val 46, Leu 48, Ala 49, Phe 86 y Val 88, mientras que en TcTIM en las correspondientes posiciones se encuentran Glu, Ser, Leu, Ile, Pro, Tyr e Ile.

La mutante TcTIM7mutTbTIM, TcTIM con la interfase de TbTIM, caracterizada previamente, presentó características muy similares a TcTIM silvestre. No obstante, la susceptibilidad a la hidrólisis por subtilisina aumentó y la T<sub>m</sub> disminuyó. En el caso de TbTIM, el cambio de los residuos de la interfase por los de TcTIM resultó en un cambio más drástico en el comportamiento de la enzima mutante.

En primer lugar, TbTIM7mutTcTIM es una enzima inestable a la dilución, la concentración de proteína a la que debe ser incubada para mantener su actividad, es alrededor de 25 veces mayor que la concentración a la que se incubaba una enzima silvestre. Los valores de *K<sub>m</sub>* y *k<sub>cat</sub>* para esta enzima son 30% más bajos con respecto a TbTIM silvestre.

Las características espectroscópicas de TbTIM7mutTcTIM son muy similares a las de la mutante de interfase de TcTIM y las enzimas silvestres. Los espectros de dicroísmo circular de las cuatro enzimas presentan los mínimos característicos de una proteína con estructura tipo barril α/β (Fig. 26). No obstante en los ensayos de fluorescencia intrínseca si se aprecian algunas diferencias discretas (Figs. 28 y 29). TbTIM y TcTIM poseen el mismo número de triptofanos (12, 90, 159, 170, 193 numeración para TbTIM); TbTIM presenta 5 residuos de tirosina en las posiciones 101, 102, 176, 210, 223 y TcTIM presenta una tirosina más en la posición 87, sin embargo la intensidad

de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 280 nm, en la cual se excitan tanto triptofanos como tirosinas, es mayor en TbTIM que en TcTIM.

En el caso de las mutantes, TbTIM7mut presenta la más alta intensidad de fluorescencia debido a que esta enzima posee un residuo de tirosina más que la enzima silvestre debido a la mutación en la posición 86 (Phe86/Tyr87), mientras que TcTIM7mut tiene un residuo de tirosina menos (Tyr87/Phe86) y por lo tanto su intensidad de fluorescencia es la menor. A la longitud de onda de excitación de 295 nm, la intensidad de fluorescencia debida sólo a los triptofanos, continúa siendo mayor para TbTIM y TbTIM7mut, entre sí son muy similares ya que poseen el mismo número de triptofanos; mientras que TcTIM y TcTIM7mut presentan una intensidad de fluorescencia menor.

Independientemente de la longitud de onda de excitación empleada, los centros espectrales de masas (SCM) de todas las enzimas son muy similares, lo que indica que las mutaciones realizadas no contribuyen en cambios en la estructura terciaria de estas proteínas.

La estabilidad térmica seguida por dicroísmo circular de TbTIM7mut (Fig. 27) muestra una disminución de 6°C en el valor de T<sub>m</sub> aparente en comparación con el valor obtenido para TbTIM silvestre y de 10 °C en comparación con el valor para TcTIM. Aunque es difícil conocer las características involucradas en la termoestabilidad de una proteína, si se conocen algunas fuerzas que aumentan la estabilidad, tales como aquellas que aumentan el contacto entre subunidades, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Una de las características que es común en casi todas las proteínas hipertermófilas es el incremento de las interacciones electrostáticas (Xiao, L., 1999 y Szilagyi, A., 2000), que involucra la exposición de residuos cargados que resulta en una estabilización neta de la proteína (Perl, D., *et al.*, 2000) y la formación de pares iónicos y redes de pares iónicos en las regiones interfaciales de las subunidades (Russell, R. J., *et al.*, 1997 y Yip, K. S., *et al.*, 1995).

Estos experimentos espectroscópicos y los de estabilidad a la temperatura indican que el cambio de los residuos de la interfase de TbTIM por la de TcTIM da lugar a una enzima catalíticamente competente con características estructurales muy similares a los de la enzima silvestre, aunque es probable que estas mutaciones afecten la

constante de asociación de la forma dimérica de TbTIM7mut debido a que solo a altas concentraciones de proteína esta enzima es estable y más aún estas mutaciones dan origen a una enzima más susceptible a la desnaturalización por temperatura.

De manera similar, esta enzima es más sensible al efecto de derivatizantes y en particular presenta una susceptibilidad mayor al MMTS, la constante de inactivación de segundo orden para este derivatizante ( $k_i$ , Tabla 10), es tres veces mayor en comparación con la calculada para la enzima silvestre, pero no se acerca a la constante de inactivación de TcTIM ( $40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). En el caso del DTNB si hubo un aumento en su susceptibilidad, pero el valor de la constante es similar al reportado para la enzima silvestre.

TcTIM es más sensible a la acción proteolítica de la subtilisina que TbTIM. La subtilisina provoca alteraciones importantes en la estructura de TcTIM, ya que mientras TbTIM conserva el 50% de su actividad después de una hidrólisis limitada, TcTIM pierde por completo su actividad. Los enlaces peptídicos en TbTIM en donde corta la subtilisina se encuentran entre la Thr139 y Ala140 y entre la Gln181 y Gln182. En TcTIM la subtilisina corta entre Gln181 y Gln182 al igual que en TbTIM, pero se observaron dos sitios más de proteólisis, entre la Thr130 y la Asn131 y entre la Asn13-Glu132 (Reyes-Vivas *et al.*, 2002). TbTIM7mutTcTIM presentó una mayor sensibilidad a la proteólisis en comparación con TbTIM silvestre (Figs. 36-38). Cuando se utiliza una relación molar subtilisina/TIM de 0.0025 (1:500) se aprecia un fragmento de hidrólisis de peso aproximado a 15.9 kDa que aparece entre las primeras 10 horas de incubación (Fig. 40a). Este fragmento fue secuenciado mediante degradación de Edman, y en el extremo amino-terminal se encontró la secuencia GINWIV en donde la glicina inicial corresponde a la posición 87, es decir la subtilisina reconoció un sitio diferente de hidrólisis en esta mutante, con respecto a la enzima silvestre, entre la Tyr86 y la Gly87, justo en este sitio fue donde se incorporaron dos mutaciones en las posiciones 86 y 88.

Se hizo un modelo de la mutante utilizando como molde la estructura cristalográfica de TbTIM (5TIM, PDB) con el programa Swiss Model. De manera particular nos enfocamos en los posibles cambios en la estructura de la proteína mutante en la región de la interfase, ya que las mutaciones se incorporaron en este sitio. Este modelo se analizó con el programa Ligplot, que esquematiza las interacciones de puentes de



hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en la interfase de proteínas oligoméricas; el número de interacciones tanto de puentes de hidrógeno como de carácter hidrofóbico se resumen en la tabla 11.

<b>Tipo de interacción</b>	<b>TbTIM</b>	<b>TbTIM7mutTcTIM</b>
<b>Puentes de hidrógeno</b>	23	18
<b>Hidrofóbicas</b>	36	38

Tabla 11. Interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno en la interfase de TbTIM yTbTIM7mutTcTIM de acuerdo al programa Ligplot.

De acuerdo a los datos cristalográficos reportados para TbTIM (Wierenga *et. al.*, 1991) en la interfase se encuentran alrededor de 20 puentes de hidrógeno y además hay 15 interacciones de puente de hidrógeno mediadas por moléculas de agua. También en la interfase se encuentran siete cavidades ocupadas por moléculas de agua, en total hay 18 moléculas de agua dentro de estas cavidades. De acuerdo con los datos obtenidos por el programa Ligplot, en la interfase de TbTIM existen 23 puentes de hidrógeno, mientras que en TbTIM7mutTcTIM se conservan solo 18.

Entre los puentes de hidrógeno faltantes, nos llamó la atención la región que se encuentra al final del asa 1 de un monómero y la hélice 3 de la subunidad adyacente. En TbTIM silvestre, al final del asa 1 y al inicio de la primer hélice se encuentra el Gln 18, el nitrógeno del grupo amida se encuentra a distancia de puente de hidrógeno del oxígeno del enlace peptídico entre el Asp 85 y Phe 86 de la otra subunidad, además el oxígeno del grupo carboxilo del Asp 85 también se encuentra a distancia de puente de hidrógeno del nitrógeno del enlace peptídico entre la Ser17 y el Gln18, es decir se pueden generar dos puentes de hidrógeno por cada subunidad (Fig. 41). En el modelo generado para TbTIM7mutTcTIM por Swiss model y analizado con el programa Ligplot, en esta región solo se observan un puente de hidrógeno por cada subunidad (Fig. 42), cabe mencionar que uno de los aminoácidos involucrados en el puente de hidrógeno faltante se encuentra en la posición 18, en donde se realizó la mutación de una Gln por Glu.

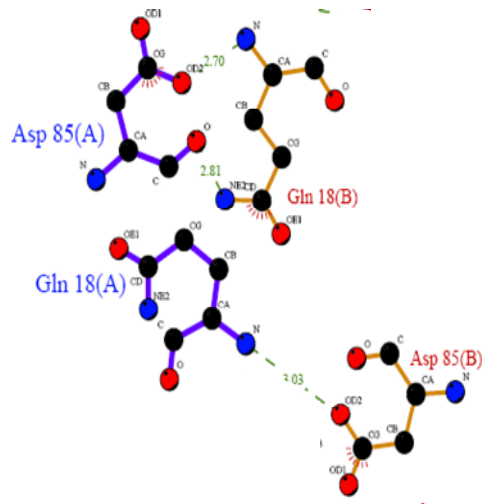


Figura 41. Puentes de hidrógeno posibles entre el Gln18 y Asp 85 en la interfase de TbTIM silvestre. Figura obtenida del análisis de la estructura cristalográfica de TbTIM en el programa Liplot. Las coordenadas cristalográficas fueron tomadas del archivo 5TIM del PDB.

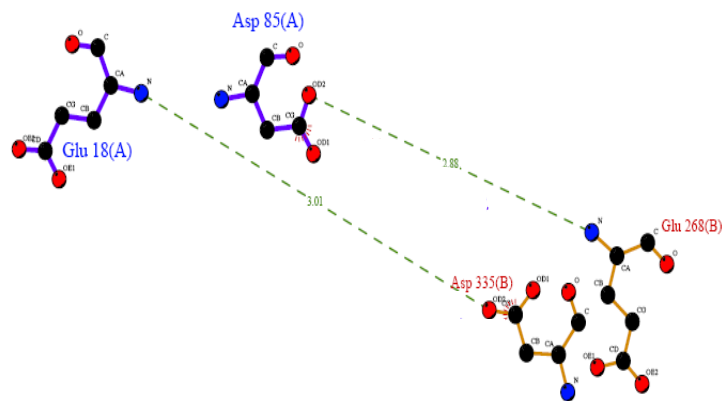


Figura 42. Puentes de hidrógeno posibles entre el Glu18 y Asp 85 en la interfase de TbTIM 7mutTcTIM. Figura obtenida del análisis de la estructura cristalográfica del modelo de esta mutante en el programa Liplot. El modelo se realizó tomando como molde el cristal de TbTIM (5TIM) en el programa Swiss model.

Esta región ya había sido monitoreada antes y se había dado importancia a las diferencias en las interacciones en esta región como posibles responsables del distinto comportamiento entre TbTIM y TcTIM ante el efecto de los agentes derivatizantes (Maldonado E., *et al*, 1998). El residuo en la posición 18 se encuentra al inicio de la hélice 1 y el Asp 85, con quien se forman los puentes de hidrógeno, se encuentra en la hélice 3 de la otra subunidad; ambos residuos se encuentran muy próximos a la cisteína de interfase y forman una cavidad que pudiera ser la entrada de los reactivos sulfhidrilo. Esta cavidad es mucho mayor en TcTIM con respecto a TbTIM (Fig. 43).

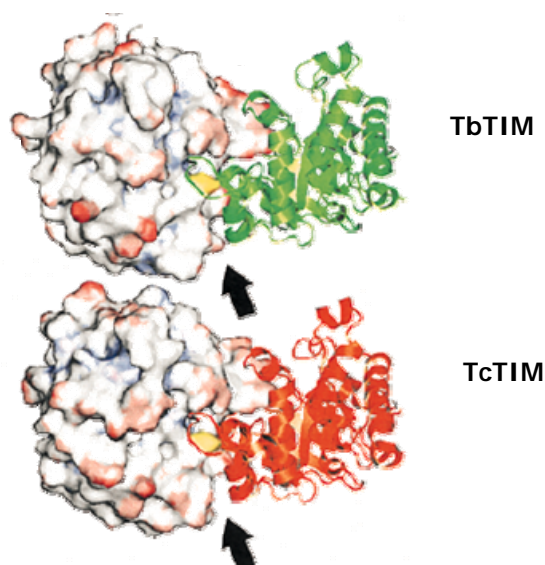


Figura 43. Cavidad observada entre la hélice 1 de una subunidad y la hélice 3 de la subunidad adyacente en TbTIM y TcTIM. En amarillo se muestra la cisteína de interfase. Tomada y modificada de Maldonado E., *et al*, 1998

Una mutante de TcTIM en donde se sustituyó el Glu 18 por Gln (E18Q), mostró una constante de inactivación de segundo orden ( $k_2$ ) por MMTS de  $90 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Reyes-Vivas *et al*, 2001), de manera contraria a como se esperaba, ya que al sustituir en TcTIM en la posición 18 por el aminoácido correspondiente en TbTIM, se podrían formar los puentes de hidrógeno faltantes de tal manera que la sensibilidad de esta mutante fuera menor y de manera contraria, resultó ser 100% más susceptible comparada con TcTIM ( $k_2 = 40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). TbTIM7mut es más susceptible al efecto de los derivatizantes, en particular al efecto del MMTS; pensamos que este aumento en la susceptibilidad puede ser debido a la pérdida del puente de hidrógeno en la región de la hélice 1 y la

hélice 3 de la otra subunidad debido a la sustitución de la Gln 18 por el Glu (Q18E). Cuando se analizó esta región tanto en TbTIM (Fig. 44) como en TbTIM7mut (Fig. 45), para medir las distancias entre los residuos de las posiciones 17 y 18 de una subunidad y los que se encuentran en las posiciones 85 y 86 de la subunidad adyacente, pudimos observar que en TbTIM7mut hay una distancia mayor entre las dos subunidades con respecto a la distancia observada en TbTIM, particularmente entre la Glu18 y el Asp85 de la otra subunidad con lo que se pudiera facilitar el acceso de los reactivos de grupo sulfhidrilo para derivatizar la cisteína de interfase (Cys14) dando como consecuencia un aumento en la susceptibilidad a los reactivos de grupo sulfhidrilo.

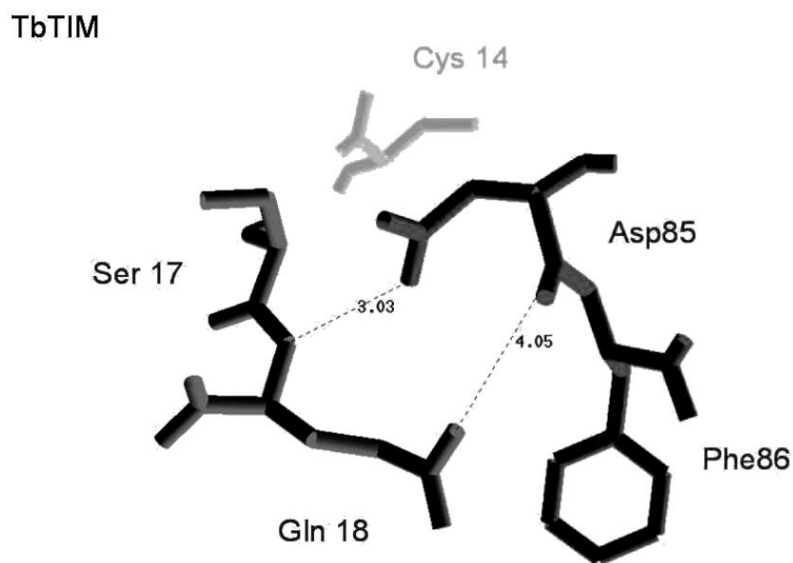


Figura 44. Distancias observadas entre las subunidades de TbTIM en la región de la hélice 1 y la hélice 3 de la subunidad adyacente.

TbTIM7mut

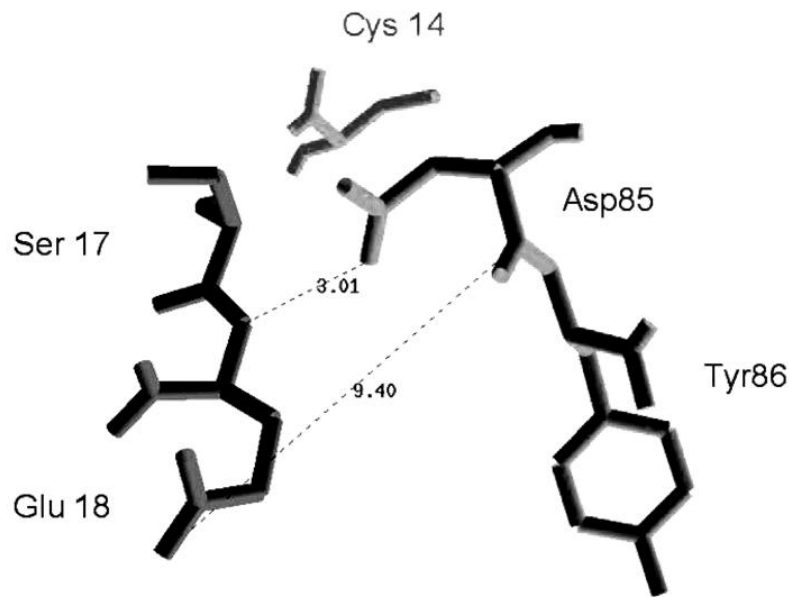


Figura 45. Distancias observadas entre las subunidades de TbTIM7mut en la región de la hélice 1 y la hélice 3 de la subunidad adyacente. La distancia entre el oxígeno del grupo carboxilo del Glu18 y el oxígeno del enlace peptídico entre el Asp85 y la Phe86 es 9.40 Å, mucho mayor a la que presenta TbTIM de 4.05 Å.

## 8. CONCLUSIONES.

TbTIM7mut es una enzima catalíticamente competente con estructura secundaria y terciaria muy similar a la que presenta la enzima silvestre, sin embargo, es una enzima inestable a la dilución, ya que requiere ser incubada a una concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$  para mantener su actividad, probablemente por un cambio en su constante de asociación.

La  $T_m$  de TbTIM7mut es 6° C menor con respecto a TbTIM silvestre y 10 ° C menor con respecto a TcTIM silvestre. Es una enzima que presenta una mayor susceptibilidad al efecto de los reactivos de grupo sulfhidrilo, particularmente la constante de inactivación por MMTS resultó tres veces mayor con respecto al valor reportado para TbTIM silvestre. También se observó un incremento en la susceptibilidad a la hidrólisis por subtilisina, con un sitio único de corte entre la Tyr86 y la Gly87, que se encuentra muy cercano al sitio de las mutaciones realizadas en la posición 86 y 88.

Mediante un modelo molecular de TbTIM7mut se pudo observar que uno de los puentes de hidrógeno entre el Glu 18 y los residuos en la posición 86 y 87 de la subunidad adyacente no se podía formar, lo que trajo como consecuencia un aumento entre la distancia entre las dos subunidades en esta región, lo que podría explicar el aumento de sensibilidad de esta mutante a los agentes derivatizantes.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez M, Zeelen JP, Mainfroid V, Rentier-Delrue F, Martial JA, Wyns L, Wierenga RK, Maes D. (1998) Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *Journal of Biological Chemistry*. 273:2199–2206.
- Aronov, A.M., Verlinde, C.L.M.J., Hol, W.G.J. and Gelb, M.H. (1998) Selective tight binding inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase via structure-based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*. 41: 4790–4799.
- Aronov, A.M., Suresh, S., Buckner, F.S., Van Voorhis, W.C., Verlinde, C.L.M.J., Opperdoes, F.R., Hol, W.G.J. and Gelb, M.H. (1999) Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 96 4273–4278.
- Aman, R.A., Kenyon, G.L., Wang C.C. (1985) Cross-linking of the enzymes in the glycosomes of *Trypanosome brucei*. *Journal of Biological Chemistry*. 260: 6966-6973.
- Bakker, B.M., Westerhoff, H.V., Michels P.A., (1995) Regulation and control of compartmentalized glycolysis in bloodstream form *Trypanosome brucei*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 27:513-525.
- Bakker, B.M., Michels P.A., Opperdoes F.R., Westerhoff H.V. (1997) Glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei* can be understood in terms of the kinetics of the glycolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 272:3207-3215.
- Bakker, B.M., Mensonides, F.I., Teusink, B., van Hoek, P., Michels, P.A., Westerhoff, H.V. (2000) Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proceedings of National Academy of Sciences. U.S.A.* 97:2087-2092.
- Bernstein, B.E., Michels, P.A.M., Hol, W.G.J. (1997), Synergistic effects of substrate-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase activation. *Nature*, 385: 275-278.
- Blattner, J., Helfert, S., Michels, P. and Clayton, C. (1998) Compartmentation of phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei* plays a critical role in parasite energy metabolism. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA* 95: 11596–11600.
- Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J. P., Callens, M., Noble, M. E. M., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. M., and Wierenga, R. K. (1993) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterization of a dimer-interface mutant. *European Journal of Biochemistry*, 211: 703-710.
- Caffrey, C.R., Scory, S., Steverding, D. (2000) Cysteine proteinases of trypanosome parasites: novel targets for chemotherapy. *Current Drug Targets*, 1: 155-162.

Cazzulo J.J., Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB Journal*, 6:3153-3161.

Chudzik, D.M., Michels, P.A.M., de Walque, S., Hol, W.G.J. (2000) Structures of type 2 peroxisomal targeting signals in two trypanosomatid aldolases. *Journal of Molecular Biology*, 300: 697-707.

Claustre, S., Denier, C., Lakhdar-Ghazal, F., Lougare, A., Lopez, C., Chevalier, N., Michels, P., Périé, J., Willson, M. (2002) Exploring the active site of *Trypanosoma brucei* phosphofructokinase by inhibition studies: specific irreversible inhibition. *Biochemistry*, 41(32):10183-93.

De Souza W., (2002). Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitology Research*, 88: 1013-1025.

Desamero, R., Rozovsky, S., Zhadin, N., McDermott, A. & Callender, R. (2003). Active site loop motion in triosephosphate isomerase: T-jump relaxation spectroscopy of thermal activation. *Biochemistry*, 42: 2941–2951.

Duszenko, M. and Mecke, D. (1986) Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 19: 223–229.

Engel, J.C., Doyle, P.S., Hsieh, I., McKerrow, J.H. (1998) Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 188: 725-734.

Erlich, H.A., ed. PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, E.U., 1989.

Espinoza-Fonseca L.M., Trujillo-Ferrara J.G. (2004) Exploring the possible binding sites at the interface of triosephosphate isomerase dimer as a potential target for anti-tri-panosomal drug design. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Jun 21; 14(12): 3151-4.

Garza-Ramos G., Perez-Montfort R., Rojo-Dominguez A., de Gomez-Puyou M.T., Gomez-Puyou A.(1996) Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *European Journal of Biochemistry*, 241:114–120.

Garza Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R., & Gómez-Puyou, A. (1998); Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity: triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *T.cruzi* and *Leishmania mexicana*. *European Journal of Biochemistry*, 253: 684-691.

Gómez-Puyou A., Saavedra-Lira E., Becker I., Zubillaga R.A., Rojo-Domínguez A, Pérez-Montfort R. (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action-studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & Biology*. 2(12):847-855.



Hardré, R., Bonnette, C., Salmon, L., y Gaudemer, A. (1998) Synthesis and evaluation of a new inhibitor of phosphoglucose isomerases: the enediolate analogue 5-phospho-D-arabinohydroxamate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8 (23): 3435-8.

Helfert, S., Estevez, A.M., Bakker, B., Michels, P. and Clayton, C. (2001) Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal*, 357: 117–125.

Hernández-Alcántara G., Garza-Ramos G., Méndez-Hernández G., Gómez-Puyou A., Pérez-Montfort R.(2002). Catalysis and Stability of Triose phosphate isomerase from *trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry*,41:4230-4238.

Jogl, G., Rozovsky, S., McDermott, E. A., and Tong, L. (2003) Optimal alignment for enzymatic proton transfer: structure of the Michaelis complex of triosephosphate isomerase at 1.2-Å resolution. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 100: 50-55.

Kim, H., Feil, I.K., Verlinde, C.L.M.J., Petra, P.H., Hol, W.G.J. (1995). Crystal Structure of Glycosomal Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Leishmania mexicana*: Implications for Structure-Based Drug Design and a New Position for the Inorganic Phosphate Binding Site. *Biochemistry*, 34: 14975-14986.

Kohlhoff M, Dahm A, Hensel R. (1996) Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Letters*, 383:245-50.

Ladame, S., Bardet, M., Périé, J., Willson, M. (2001). Selective inhibition of *Trypanosoma brucei* GAPDH by 1,3-bisphospho-D-glyceric acid (1,3-diPG) analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9:773-783.

Larsen, T. A., Olson, A. J., Goodsell, D. S. (1998). Morphology of protein-protein interfaces. *Structure*, 6: 421-427.

López-Velázquez G, Molina-Ortiz D, Cabrera N, Hernández-Alcántara G, Peon-Peralta J, Yépez-Mulia L, Pérez-Montfort R, Reyes-Vivas H.(2004). An unusual triosephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 55:824-834.

Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Dao Thi, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R., y Wierenga, R. (1999) The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: A comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 37: 441-453.

Mainfroid V., Terpstra P., Beauregard M., Frere J.M, Mande S.C., Hol W.G., Martial J.A., Goraj K. (1996). Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer, *Journal of Molecular Biology*, 257: 441–456.

Maldonado E., Soriano-García M., Moreno A., Cabrera N., Garza-Ramos G., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. & Pérez-Montfort R. (1998). Differences in the

intersubunit contacts in Triosephosphate Isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *Journal of Molecular Biology*, 283:193-203.

McKerrow, J.H., Engel, J.C., Caffrey, C.R. (1999) Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7: 639-644.

Misset, M., [Bos, O.J.](#), [Opperdoes, F.R.](#) (1986) Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. *European Journal of Biochemistry*, 157: 441-453.

Olson, J.E., Lee, J.K., Semenov, A., Rosenthal, P.J. (1999) Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7(4): 633-668.

Opperdoes, F.R. and Borst, P. (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Letters*, 80:360-364.

Opperdoes, F.R., Baudhuin P., Coppens I., De Roe C., Edwards S.W., Weijers P.J., Misset O.,(1984). Purification, morphometric analysis and characterization of the glycosomas (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosome brucei*. *Journal of Cell Biology*, 98: 1178-1184.

Opperdoes, F.R., (1987) Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annual Review of Microbiology*, 41: 127-151

Ostoa-Saloma P., Garza-Ramos G., Ramírez J., Becker I., Berzunza M., Landa A., Gomez-Puyou A., Tuena de Gomez-Puyou M., Perez-Montfort R. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosome cruzi* *European Journal of Biochemistry*, 244: 700-705.

Pérez-Montfort R., Garza-Ramos G., Hernández-Alcántara G., Reyes-Vivas H., Gao X., Maldonado E., Gómez-Puyou M.T. & Gómez-Puyou A. (1999). Derivatization of the interface cystein of triose phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry*, 38: 4114-4120

Pérez-Montfort R., Gómez-Puyou M.T., & Gómez-Puyou A. (2002); The interfaces of oligomeric proteins as targets for drug design against enzymes from parasites. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2: 457-470.

Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. & Schmid, F. X. (2000). Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nature Structural Biology*, 7: 380-383.

Pompliano, D. L., Peyman, A., y Knowles, J. R. (1990) Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 29 :3186-3194.

Reyes-Vivas H., Hernández-Alcántara G., López-Velazquez G., Cabrera N., Pérez-Montfort R., Gómez-Puyou M.T. & Gómez-Puyou A. (2001). Factors that control the reactivity of the interface cystein of triose phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry*, 40:3134-3140.

Reyes-Vivas H., Martínez-Martínez E., Mendoza-Hernández G., López-Velázquez G., Pérez-Montfort R., Gómez-Puyou M.T., & Gómez-Puyou A. (2002). Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: Characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 48: 580-590.

Rigden, D.J., Phillips, S.E., Michels, P.A.M., Fothergill-Gilmore, L.A. (1999) The structure of pyruvate kinase from *Leishmania mexicana* reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity. *Journal of Molecular Biology*, 291: 615-635.

Rosenthal, P.J., Lee, G.K. (1993) Inhibition of a *Plasmodium vinckei* Cysteine Proteinase Cures Murine Malaria. *Journal of Clinical Investigation*, 91(3): 1052-1056.

Rozovsky, S., Jogl, G., Tong, L. & McDermott, A. E. (2001). Solution-state NMR investigations of triosephosphate isomerase active site loop motion: ligand release in relation to active site loop dynamics. *Journal of Molecular Biology*, 310: 271–280.

Russell, R. J., Ferguson, J. M., Hough, D. W., Danson, M. J. & Taylor, G. L. (1997). The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, 36: 9983-9994

Sampson, N. S., y Knowles, J. R. (1992) Segmental motion in catalysis: investigation of a hydrogen bond critical for loop closure in the reaction of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 31, (36): 8488-8494.

Schliebs W., Thanki N., Jaenicke R., Wierenga R.K. (1997) A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* 36: 9655–9662.

Scory, S., Caffrey, C.R., Stierhof, Y.D., Ruppel, A., Steverding, D. (1999) *Trypanosoma brucei*: killing of bloodstream forms in vitro and in vivo by the cysteine proteinase inhibitor Z-phe-ala-CHN2. *Experimental Parasitology*, 91(4): 327-333.

Selzer, P.M., Pingel, S., Hsieh, I., Ugele, B., Chan, V.J., Engel, J.C., Bogyo, M., Russel, D.G., Sakanari, J.A., McKerrow, J.H. (1999). Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 96: 11015-11022.

Seyfang, A. and Duszenko, M. (1991) Specificity of glucose transport in *Trypanosoma brucei*. Effective inhibition by phloretin and cytochalasin B. *European Journal of Biochemistry*, 202: 191–196.

Singh, A., Rosenthal, P.J. (2001) Comparison of Efficacies of Cysteine Protease Inhibitors against Five Strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3): 949-951.

Soares M.J., De Souza W., (1988) Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *Journal of Submicroscopy Cytology Pathology* 20:349-361.

Souza, D.H., Garratt, R.C., Araujo, A.P., Guimaraes, B.G., Jesus, W.D., Michels, P.A.M., Hannaert, V., Oliva, G. (1998) *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. *FEBS Letters*, 424: 131-135.

Suresh, S., Turley, S., Opperdoes, F.R., Michels, P.A. Hol, W.G.,(2000) A potential target enzyme for trypanocidal drugs revealed by the crystal structure of NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana*. *Structure*, 8: 541-552.

Swinkels, B.W., Gibson, W.C., Osinga, K.A., Kramer, R., Veeneman, G.H., van Boom J.H., Borst, P., (1986) Characterization of the gene for the microbody (glycosomal) triosephosphate isomerase of *Trypanosoma brucei*. *EMBO Journal*, 5(6): 1291-8.

Szilagyi, A. & Zavodszky, P. (2000). Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure*, 8: 493-504.

Télez-Valencia A, Avila-Ríos S, Pérez-Montfort R, Rodríguez-Romero A, Tuena de Gómez-Puyou M, López-Calahorra F, Gómez-Puyou A (2002). Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 295(4): 958-63.

Télez-Valencia A, Olivares-Illana V, Hernández-Santoyo A, Pérez-Montfort R, Costas M, Rodríguez-Romero A, López-Calahorra F, Tuena De Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A.(2004) Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *Journal of Molecular Biology*, 341(5): 1355-65.

Tetley L. & Vickerman K.,(1991) The glycosomes of trypanosomes:number and distribution as revealed by electron spectroscopic imaging and 3-D reconstruction. *Journal of Microscopy*, 162: 83-90.

Tielens A.G.M. and Van Hellemond J.J., (1998). Differences in Energy Metabolism Between Trypanosomatidae. *Parasitology Today*, 4(7): 265-271.

Troeberg, L., Morty, R.E., Pike, R.N., Lonsdale-Eccles, J.D., Palmer, J.T., McKerrow, J.H., Coetzer, T.H. (1999). Cysteine proteinase inhibitors kill cultured bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. *Experimental Parasitology*, 91: 349-355.

Vellieux, F.M., Hajdu, J., Verlinde, C.L.J.M., Groendijk, H., Read, R.J., Greenhough, T.J., Campbell, J.W., Kalk, K.H., Littlechild, J.A., Watson, H.C., Hol, W.G.J. (1993) Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from *Laue data*. *Proceedings of National Academy of Sciences USA.*, 90: 2355-2359.

Wiemer, E.A.C., Michels, P.A.M., Opperdoes, F.R. (1995). The inhibition of pyruvate transport across the plasma membrane of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei* and its metabolic implications. *Biochemical Journal*, 312, 479-484.

Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., y Hol, W. G. J. (1991) Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate. A comparison with the structure of the

trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *Journal of Molecular Biology*, 220: 995-1015.

[Wierenga, R.K.](#), (2001). The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Letters*, 492: 193-198.

Willson, M., Alric, I., Périé, J., Sanejouand, Y.H. (1997) Yeast hexokinase inhibitors designed from the 3-D enzyme structure rebuilding. *Journal of Enzyme Inhibition*, 12: 101-121.

Yip, K. S., Stillman, T. J., Britton, K. L., Artymiuk, P. J., Baker, P. J., Sedelnikova, S. E. *et al.* (1995). The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure*, 3: 1147-1158

Xiao, L. & Honig, B. (1999). Electrostatic contributions to the stability of hyperthermophilic proteins. *Journal of Molecular Biology*, 289: 1435-1444.

Zomosa-Signoret V., Hernández-Alcántara G., Reyes-Vivas H., Martínez-Martínez E., Garza-Ramos G., Pérez-Montfort R., Gómez-Puyou M.T. & Gómez-Puyou A.(2003). Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry*, 42: 3311-3318.

