



00591  
**UNAM**  
**POSGRADO**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO  
FACULTAD DE QUIMICA  
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOQUIMICAS

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE ALGUNAS  
MUTANTES DE LA CISTEINA 14 DE LA  
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Trypanosoma  
brucei*

**T E S I S**

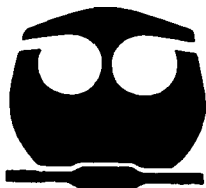
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)**

**P R E S E N T A :**

**M. en C. GLORIA HERNANDEZ ALCANTARA**

DIRECTOR DE TESIS: DR. RUY PEREZ MONTFORT



MEXICO D.F.

2003

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Ruy Pérez Montfort en el instituto de Fisiología Celular y en colaboración con la Dra. Georgina Garza-Ramos del laboratorio de Físicoquímica y Diseño de Proteínas, Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El proyecto fue apoyado por los donativos DGAPA-UNAM IN-200600, CONACyT G27551M y PAEP-UNAM 103326 y 203312. Durante el desarrollo del presente trabajo recibí una beca de doctorado del CONACyT con número de registro 129425 y una beca complementaria DGEF para la realización de mis estudios.

B

## **DEDICATORIA**

**Dedico esta tesis con especial cariño a:**

**A mis padres por la vida y el amor.**

**A mis hermanos por todos los bellos momentos juntos: Rafael, Miguel Angel, Margarita, Arely Eunice, Mariana y Victor.**

**A mis dos sobrinos, por la alegría y la chispa de unos niños llenos de ternura.**

**A Enrique por su gran cariño.  
Por ser el mejor compañero para compartir la vida.**

## Agradecimientos

Agradezco a los miembros del comité tutorial, por sus buenos comentarios cada fin de semestre para mejorar mis conocimientos y proyecto:

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Dr. Ruy Pérez Montfort

Agradezco al jurado que revisó esta tesis:

Presidente: Dra. Estela Sánchez de Jiménez

Vocal: Dr. Mario Luis Calcagno Montans

Vocal: Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero

Vocal: Dr. Rafael Zubillaga

Secretario: Dra. Rosario A. Muñoz Clares

Suplente: Dr. Daniel A. Fernández Velasco

Suplente: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Al Dr. Ruy Pérez Montfort, por brindarme la oportunidad de aprender y compartir su laboratorio, por permitirnos ser independientes y por sus buenos consejos para ser mejor.

Un profundo agradecimiento a la Dra. Marieta Tuena de Gómez-Puyou y al Dr. Armando Gómez-Puyou por permitirme participar en sus seminarios y por sus buenos comentarios.

A la Dra. Georgina Garza-Ramos le agradezco su enseñanza y paciencia en el laboratorio. Además de ser una gran amiga y apoyarme en los momentos más difíciles. Mil gracias por tus buenos consejos.

A mis anteriores y nuevos compañeros del laboratorio 201-ote, con los que he compartido la mayor parte del tiempo en estos últimos años:

Nallely Cabrera, como técnico académico la mejor. Una técnico seria y responsable con su trabajo, gracias por apoyarme, enseñarme y darme consejos de trabajo desde que llegue al laboratorio. Una gran amiga, siempre pendiente de mí y apoyándome en mis decisiones.

Emma Saavedra, recuerdo muy bien tus consejos de fin de semana en el laboratorio. Por tu amistad y por todos los momentos que compartimos.

María Elena Cháñez, una gran compañera y amiga. Por compartir muchos momentos agradables en el laboratorio, por tus consejos y por tu amistad, gracias.

Marcela Varela, la chica atrevida y alegre del laboratorio. Muy buena estudiante y gran amiga, juntas hemos llorado, reído y por supuesto divertido. Y por presentarme a Quique gracias.

Santiago Ávila, un compañero agradable, responsable y con chispa. La época en que dejamos de ser sólo mujeres en el laboratorio. Buen amigo.

Andrea González, una compañera llena de entusiasmo y dedicación.

Rosalía Lira, la chica de las frases "cuéntamelo todo" y "chiquiti-guau". Una gran persona que nos da mucho cariño. Gracias por apoyarme cuando lo he necesitado.

Melchor Roa, nuestro segundo compañero. Muy agradable y con mucho entusiasmo.

María José Cárdenas, Itzhel García y Carlos Enrique Guerrero los compañeros más recientes en el laboratorio, es poco el tiempo de conocerlos pero los estimo mucho.

Sr. Lino Méndez. Muy profesional en su trabajo, un reconocimiento muy especial por apoyarme en la preparación de reactivos. Y siempre muy pendiente de sus muchachitas. Se le recuerda con cariño.

Y finalmente a Alejandro Flores, por apoyarme recientemente en la preparación de reactivos.

A los integrantes de los seminarios de los Drs. Puyou: Dra. Marieta Tuena, Dra. Georgina Garza, Dra. Leticia Ramírez, Viviana Zomoza, Dr. Armando Gómez-Puyou, Dr. Alejandro Fernández, Dr. JJ García, Dr. Horacio Reyes, Dr. Edgar Vazquez, Lenin Domínguez, Gerardo Pérez, Hugo Nájera, Gabriel Mercado, Alfredo Téllez, Fernando Minauro, David Cisneros. Gracias por sus buenos consejos y por las discusiones para mejorar mi proyecto.

A la Sra. María Elena Ordóñez, siempre eficiente con su trabajo. Gracias por apoyarme cuando realicé experimentos en el laboratorio de los Drs. Puyou. También, por su amistad.

A mis compañeros de maestría y doctorado: Adelaida, Gerardo y Hugo, que junto con Leticia García compartimos momentos agradables cada semestre.

A mi prima Bety, amiga incondicional desde la infancia. Te extraño mucho.

A Clemen, por tú amistad, cariño y compañía, gracias amiga.

A Edgar, por escucharme siempre y por ser un gran amigo.

A Evencio, Maruca, Rafa y Roy, por su amistad incondicional, y por todos los momentos que hemos disfrutado como una gran familia.

A Luis Miguel, gracias por la amistad y por apoyar a mi familia. Que junto con mi hermana Mago formen por siempre una bonita familia.

Al Sr. Carlos Enrique, Sra. María Esther, Carmela, Claudia, Laura, mana, nena, Sonia, MaryFer, Rafael, Carlos, Isaac, Luis y Alex, a todos les agradezco su amistad y cariño.

No me pueden faltar mis grandes amigas de la universidad Veracruzana: Clara Luz Sampieri Ramírez, Citali Castillo Guevara, Olga Tejeda Sartorius y Concepción Rosas Rodríguez, por su amistad, cariño, comprensión y paciencia, mil gracias a cada una. Las quiero mucho, aunque nos vemos muy poco por la distancia, pero son y serán mis grandes amigas.

F

## **Gracias**

A la Dra. Amelia Farrés González-Saravia (ex-coordinadora) y a la Dra. Rosario Muñoz Clares coordinadora del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo que siempre me brindaron.

A Leticia García siempre atenta de todos los estudiantes para tener a tiempo nuestros trámites, excelente en su trabajo.

A Adelina González, por su apoyo en todos los trámites de beca PAEP.

Al Conjunto "E" de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme estudiar en sus aulas. Al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad nacional Autónoma de México por la realización de la parte experimental en el laboratorio 201-ote.



## Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Barriles alfa-beta.....	5
1.2 Triosafosfato isomerasa.....	6
1.2.1 El sitio activo.....	6
1.2.2 Características estructurales de la triosafosfato isomerasa.....	7
1.2.3 Análogos del sustrato de la triosafosfato isomerasa.....	9
1.2.4 Asa 6 y la formación de metilglioxal.....	10
1.2.5 La interfase.....	14
1.2.6 Cisteína 14.....	16
1.2.7 Triosafosfato isomerasas monoméricas.....	19
1.3 Importancia de la cisteína 14 en el diseño de inhibidores de la triosafosfato isomerasa contra tripanosomátidos.....	23
2. Antecedentes.....	25
3. Objetivo.....	29
4. Materiales y Métodos.....	30
4.1 Expresión y purificación.....	30
4.2 Actividad catalítica.....	32
4.3 Parámetros cinéticos.....	33
4.4 Cuantificación de metilglioxal.....	33
4.5 Efecto de la concentración de proteína en la actividad específica de las enzimas con alta actividad.....	33
4.6 Propiedades espectroscópicas.....	34
4.6.1 Dicroísmo circular.....	34
4.6.2 Estabilidad térmica.....	35
4.6.3 Espectros de fluorescencia.....	35
4.7 Determinación de la actividad específica de las enzimas mutantes C14G y C14N.....	36
4.8 Determinación de la masa molecular.....	36
4.8.1 Cromatografía de exclusión molecular.....	36
4.8.2 Análisis de sedimentación.....	37
4.9 Efecto del metilmetanotiosulfonato y ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico.....	37
4.9.1 Ensayos de inhibición por metilmetanotiosulfonato.....	37
4.9.2 Titulación de tioles.....	39
5. Resultados y discusión.....	40
5.1 Expresión y purificación.....	39
5.2 Determinación de la actividad específica de las enzimas mutantes C14G y C14N.....	40
5.3 Parámetros cinéticos.....	42

H

5.6 Efecto de la concentración de proteína en la actividad específica de las enzimas con alta actividad.....	46
5.7 Estabilidad térmica.....	48
5.8 Determinación de la masa molecular para la enzima mutante C14F.....	50
5.9 Efecto del MMTS y DTNB.....	53
5.9.1 Efecto del MMTS en las enzimas mutantes con alta actividad.....	53
5.9.2. Titulación de tioles para TbTIM, C14P, C14T, C14V por DTNB.....	57
6. Conclusiones.....	62
7. Perspectivas.....	63
8. Referencias bibliográficas.....	64
9. Apéndice.....	73
Apéndice 0.	
Gloria Hernández-Alcántara y col., (2002) <i>Biochemistry</i> 41, 4230-4238.	
Apéndice I	
Ruy Pérez-Montfort y col., (1999) <i>Biochemistry</i> 38, 4114-4120.	
Apéndice II	
Gloria Hernández-Alcántara. <i>Revista de Educación Bioquímica</i> , en prensa.	

## Abreviaturas

Da	Dalton
DC	Dicroísmo circular
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
D.O	Densidad óptica
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GAP	Gliceraldehído 3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria Bertani
MMS	Metilmetanotiosulfonato
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
Mr	Masa molecular relativa
NAD	Dinucleótido de nicotinamina y adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamina y adenina reducido
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio
PGH	Fosfoglucohidroxamato
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
Rs	Radio de Stokes
s	Coefficiente de sedimentación
SCM	Centro espectral de masas
TEA	Trietanolamina
Tm	Temperatura media de desnaturalización
TIM o TPI	Triosafosfato isomerasa
TbTIM	TIM de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM	TIM de <i>Trypanosoma cruzi</i>
PfTIM	TIM de <i>Plasmodium falciparum</i>
hTIM	TIM de humano
yTIM	TIM de levadura
$\alpha$ -GDH	$\alpha$ -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
2-PG	2-Fosfoglicolato

5

## Resumen

En el homodímero de la trifosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) la cisteína 14 (Cys14) de cada una de las dos subunidades forma parte de la región de la interfase del dímero. Este residuo es fundamental para la catálisis y estabilidad de la TbTIM. En este trabajo se sustituyó la Cys14 por los otros 19 aminoácidos para determinar que aminoácidos al ocupar la posición 14 permiten obtener una enzima activa y estable. Del grupo de mutantes obtenidas, las enzimas mutantes C14A, C14P, C14S, C14T y C14V fueron enzimas con alta actividad y estables "tipo silvestre". Las enzimas con Asn, Arg y Gly presentaron una actividad entre el 10 y el 20 % de la nativa y baja estabilidad. Las enzimas restantes presentaron baja actividad (menos del 1 % de la TbTIM silvestre).

Las enzimas con alta actividad presentaron constantes cinéticas y estructura secundaria muy similares a la TbTIM silvestre. Las mutantes con alta actividad mostraron un patrón de inactivación similar al de la TbTIM silvestre, aunque el decaimiento de la actividad ocurre a concentraciones de proteína más bajas, principalmente para C14P, C14T y C14V. Las constantes de disociación ( $K_d$ ), obtenidas de estos experimentos, mostraron ser iguales para C14A y C14S, pero mayores para C14P, C14T y C14V. La estabilidad térmica, seguida por diroísmo circular, mostró que C14A presenta una  $T_m$  de desnaturalización 1°C menor que la TbTIM silvestre; para el resto de las enzimas fue hasta 3 °C menor. Otros experimentos mostraron que C14P, C14T y C14V se inhiben irreversiblemente en presencia de metilmetanotiosulfonato (MMTS), mientras que C14A y C14S no pierden actividad a ninguna de las concentraciones de MMTS probadas.

Estudios con las enzimas C14G y C14N mostraron un decaimiento progresivo de la actividad específica durante los primeros minutos del ensayo, lo que indica que para estas enzimas hay alteraciones en la asociación entre los monómeros.

Del último grupo de enzimas con baja actividad caracterizamos una de ellas (C14F). Experimentos de cromatografía de exclusión molecular y sedimentación al equilibrio mostraron que C14F es un monómero, con una  $k_{cat(GAP)}$  ~1000 veces más baja y una  $K_{m(GAP)}$  ~6 veces más alta que la TbTIM silvestre. La estructura secundaria es muy similar a la TbTIM, aunque la eficiencia cuántica de los residuos aromáticos disminuye. Un análisis de las 19 mutantes mostró que para obtener enzimas similares a la silvestre, el residuo que sustituye a la Cys14 necesita tener baja polaridad y un volumen de van der Waals entre 65 y 110 Å<sup>3</sup>. El resultado con la enzima C14F demostró que se puede formar la estructura secundaria de la TIM aun en ausencia de contacto entre las subunidades, y fue ésta suficiente para formar estructura terciaria y mantener la catálisis.

## Abstract

In homodimeric triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* (TbTIM), cysteine 14 (Cys14) of each the two subunits forms part of the dimer interface. This residue plays a central role in the catalysis and stability of TbTIM. Cys14 was mutated to the other 19 amino acids to study the characteristics that the residue must have to yield catalytically competent stable enzymes. C14A, C14S, C14P, C14T, and C14V TbTIMs were essentially "wild type" in activity and stability (high-activity mutants). Mutants with Asn, Arg, and Gly had low activities (between 10 and 20 %) and stabilities compare to the wild type. The other mutants had less than 1 % of the activity of wild type TbTIM.

The kinetic properties and circular dichroism spectra of wild type TbTIM and the high-activity mutants were strikingly similar. The high-activity mutants exhibited similar inactivation patterns; however, the decay of activity occurred at lower protein concentrations. This was more evident with C14P, C14T and C14V. For TbTIM and the C14A and C14S mutants, the apparent dissociation constant ( $K_d$ ) values were in the same range. The C14P, C14T and C14V mutants had a higher  $K_d$ . Thermal denaturation experiments of the enzymes were monitored by circular dichroism. Showed that the C14A mutant exhibited a  $T_m$  which was 1 °C lower than the  $T_m$  of TbTIM. The other mutants exhibited  $\Delta T_m$  values which were 3 °C lower. Other experiments with methylmethane thiosulfonate (MMTS) showed that the C14P, C14T and C14V mutants undergo irreversible inhibition of their activities. MMTS did not affect the activity of the C14A and C14S mutants.

Other experiments with the C14G and C14N mutants exhibited a progressive decay of specific activity during the time of recording. The dimer probably has a low association constant in the case of these two enzymes.

One of the enzymes with very low activity (C14F) was purified to homogeneity. Size exclusion chromatography and equilibrium sedimentation studies showed that C14F TbTIM is a monomer, with a  $k_{cat(GAP)}$  ~1000 times lower and a  $K_{m(GAP)}$  ~6 times higher than those of TbTIM. Its secondary structure was very similar to the TbTIM; however, the quantum yield of its aromatic residues was lower. Analysis of the data for the 19 mutants showed that to yield enzymes similar to the wild type, the residue must have low polarity and van der Waals volume between 65 and 110 Å<sup>3</sup>. The result with C14F TbTIM demonstrate that the secondary structure of wild type TbTIM can be formed in the absence of intersubunit contacts, and that it has sufficient tertiary structure to support catalysis.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Barriles alfa-beta

Dentro de la gran diversidad de estructuras de las proteínas se encuentra un patrón de plegamiento que se conoce como estructura de barril  $\alpha/\beta$  o barril TIM para cuya formación se requieren, por lo menos, 200 residuos. El 10 % de todas las estructuras del PDB presentan este tipo de plegamiento (Reardon y Farber., 1995). Los barriles  $\alpha/\beta$  pueden ser pequeños como en el caso de la hevamina, una proteína monomérica de 273 residuos (Terwisscha van Scheltinga y col., 1996) o tan grandes como en el caso de la  $\beta$ -galactosidasa, que es un tetrámero en que cada subunidad se compone de 1023 residuos (Juers y col., 1997).

En general, la estructura de los barriles  $\alpha/\beta$  se forma por ocho hebras  $\beta$  paralelas en el interior de la proteína, rodeadas de ocho  $\alpha$ -hélices que se encuentran por fuera de la región central de la hebra  $\beta$ . Generalmente, se encuentra una  $\alpha$ -hélice entre 2 hebras  $\beta$  vecinas. Las  $\alpha$ -hélices y las hebras  $\beta$  se unen por medio de asas. Esta estructura es conocida como  $(\alpha/\beta)_n$  (Figura 1). El sitio activo de todos los barriles  $(\alpha/\beta)_n$  conocidos se localiza en las asas  $\alpha \rightarrow \beta$  (Wierenga., 2001).

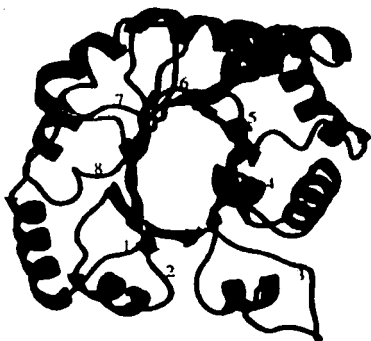


Figura 1. Estructura característica de la estructura de barril  $\alpha/\beta$  o barril TIM. Este barril TIM pertenece a la triosafato isomerasa de *Trypanosoma brucei*. La figura señala la numeración de las asas localizadas entre una  $\alpha$ -hélice y una hebra  $\beta$ . (tomada de Wierenga., 2001).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En un estudio reciente, Nagano y col. (2002) realizaron una reclasificación de los barriles  $(\alpha/\beta)_8$ , utilizando los datos de las secuencias, estructura y función de las proteínas que adoptan este tipo de estructura. En este trabajo, todas estas enzimas se agruparon por clase, arquitectura, topología y homología (CATH), obteniéndose 18 familias en total (Tabla 1). Se enfatiza que el 85 % de las enzimas de tipo barril TIM están involucradas en el metabolismo energético, metabolismo de macromoléculas, o de moléculas pequeñas. Esto se diferencia de los análisis previos realizados por Reardon y Farber (1995) en los que dividieron a los barriles TIM en 6 familias, basándose en la forma, la composición de los dominios y los mecanismos químicos de las reacciones catalizadas por las proteínas.

Recientemente, se ha intentado utilizar a la estructura de barril  $(\alpha/\beta)_8$  como esqueleto para lograr una migración en la actividad catalítica de enzimas que catalizan diferentes reacciones pero que comparten un mismo patrón de plegamiento. Se piensa que estos estudios pueden proporcionar un mejor entendimiento de los procesos de la evolución neutral y podrían permitir el desarrollo de nuevas actividades para enzimas que se pudieran utilizar en la síntesis de compuestos para la industria farmacéutica (Jurgens y col., 2000).

Tabla 1. La tabla muestra la clasificación de Nagano y col. de las 18 familias de barriles TIM.

No. Familia y nombre	cofactores	Ligandos	Sitios de unión del PP <sup>a</sup>
1. Alanina racemasa (AIR)	Unen covalentemente PLP	PLP	PP → 1.7, 1.8
2. Dihidroperatoe (DHP) cinta (DIPS)		Sustrato	PP → β8, 1.8 <sup>b</sup>
3. Proteínas fluorescentes dependientes de FMN. (LUCL)	FMA o FMNH	FMN	PP → 1.4, 1.5
4. Celulasas de 7 cadenas (7CEL.)			
5. Enzimas que unen PEP (PEPE)	Mg <sup>2+</sup> o Mn <sup>2+</sup> y K <sup>+</sup>	Sustrato	3-PP → β2, 1.2, 1.3 <sup>c</sup>
6. Aldolasas clase I (ALD1)		Sustrato de trans-aldolasas	PP-1 → 1.7, 1.8 <sup>d</sup>
7. Glicosidasas (GLYC)		Sustrato de 6-fosfo-β galactosidasa	1.8
8. Trisofosfato isomerasa (TIM)		Sustrato	√
9. Oxidorreductasa dependiente de NADP (NADO)	NADP	Sustrato NADP	di-PP → 1.7, PP → 1.8 <sup>b</sup>
10. Guanina tRNA transglicosilasa (TRGT)		Sustrato	No determinado
11. Rubisco (RUB)	Mg <sup>2+</sup>	Sustrato	√
12. Superfamilia de la enolasa (ENOL.)	Mg <sup>2+</sup> o Mn <sup>2+</sup>	Sustrato para enolasa	PP → L1, L7
13. Oxidorreductasa dependiente-FMN y enzimas que unen PP (FMOP)	FMN (y hemo o 4Fe-4S), PLP, NADPL o sin cofactor	FMN o sustrato	√
14. Hidrolasas metal dependientes (MIIYD)	Zn <sup>2+</sup> o Zn <sup>2+</sup> X 2	Sustrato de la fosfotriesterasa	PP → 1.3, β5 <sup>e</sup>
15. Enzimas que dependen de metales divalentes (XYLL)	Ni <sup>2+</sup> X 2 o Mg <sup>2+</sup> X 2 o Zn <sup>2+</sup> X 3		
16. Aldolasas clase II (ALD2)	Zn <sup>2+</sup> X 2	Sustrato	PP → 1.7, L8 <sup>b</sup>
17. Fosfatidilinositol (PI) Fosfolipasa C (PIPLC)	Ca <sup>2+</sup>	Sustrato	No determinado
18. Acido quinólico fosforribosil (QAPR) transferasa (QAPRT)	Mg <sup>2+</sup> X 2	Sustrato	

<sup>a</sup> "Motivos de unión del fosfato": los sitios comunes de unión del fosfato están alrededor de β-7, asa-7 (L7), α-7 y β-8, seguido por un α-hélice pequeña o α-hélice 8'.  
 √ Indica la existencia de un sitio de unión común fosfato en las últimas 2 asas del barril. Las asas, hebras-β y α-hélice se indican como L, β y α respectivamente. L1 indica que el sitio de unión es en el asa-1 entre la β-1 y α-hélice 1 del barril.

<sup>b</sup> No existe hélice pequeña, hélice-8', entre la β-8 y α-8 con un residuo, donde se une el fosfato como en la nota c.

<sup>c</sup> En la piruvato cinasa existe una hélice pequeña entre la β-8 y α-8 con un residuo, aunque el trifosfato del ATP se une a sitios distintos.

<sup>d</sup> En la aldolasa, uno de los dos grupos fosfato se une al sustrato como en la nota c.

<sup>e</sup> No existe ninguna hélice pequeña entre la β-8 y α-8. El fosfato se une a un sitio diferente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## 1.2 Triosa fosfato isomerasa

La triosa fosfato isomerasa (TIM o TPI, EC 5.3.1.1) pertenece a una de las familias de enzimas con estructura de barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>.

La TIM es una enzima importante de la glicólisis que cataliza la isomerización reversible de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldehído-3-fosfato (GAP o G3P; Figura 2; ver sección 1.2.1; Knowles, 1991). Sus propiedades catalíticas se han estudiado con gran detalle (Knowles y col., 1977, Rose y col., 1990).

En la TIM la eficiencia catalítica está limitada por la difusión, por lo que esta enzima se ha definido como un "catalizador perfecto". La relación  $k_{cat}/K_m$  para GAP como sustrato es de  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Este valor se encuentra dentro del calculado como límite para reacciones controladas por difusión ( $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), (Albery y col., 1976; Knowles y col., 1977; Blacklow y col., 1988; Knowles, 1991).

### 1.2.1 El sitio activo

En el sitio activo de la TIM hay tres residuos esenciales para la catálisis: el Glu167\*, localizado en el extremo amino de la hebra- $\beta$ 6, cuyo carboxilo actúa como base substrayendo 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 (Figura 2 y 3) y la Lys13 (localizada en el extremo amino de la hebra- $\beta$ 1), residuo responsable de la especificidad de la enzima por su sustrato natural.

#### Notas:

\*Para indicar la posición de un aminoácido en la secuencia o su nombre se utilizará el código de 3 letras. Para el caso de las enzimas mutantes se utilizará el código de una letra.

\*La numeración de los residuos en la secuencia se referirá siempre a la TIM de *T. brucei*, a menos que se aclare explícitamente en el texto a que otra secuencia se refiere.

En particular, la Lys13 forma un puente de hidrógeno con el carboxilato del Glu97, que se une a su vez por un puente de hidrógeno con la amida de la Thr75 del asa 3 de la otra subunidad. Se ha propuesto que esta red de puentes de hidrógeno, que involucran a la Lys13, puede explicar por qué únicamente el dímero de la TIM es catalíticamente activo (Schliebs y col., 1996, Wierenga y col., 1991a).

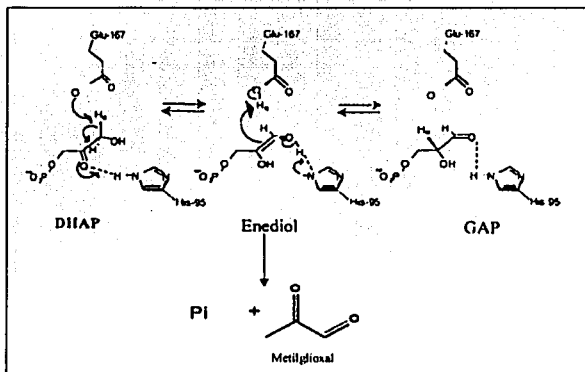


Figura 2. Mecanismo de reacción catalizado por la TIM para la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato (GAP) a través del intermediario enediol y la reacción colateral de formación de metilglioxal.

### 1.2.2 Características estructurales de la triosa fosfato isomerasa

La TIM es una enzima homodimérica, de aproximadamente 250 aminoácidos. Cada monómero está formado por 8 hojas- $\beta$  paralelas alternando con 8  $\alpha$ -hélices unidas por sus asas correspondientes (ver Figura 3). Se conoce la secuencia de aminoácidos de más de 81 especies de TIMs y se cuenta con la estructura cristalográfica de 12 especies distintas (Tabla 2). Todas las TIMs estudiadas son dímeros, excepto las TIMs de los

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Tabla 2. La tabla muestra las 12 TIMs que se han cristalizado, así como la resolución de la estructura en Å y la referencia bibliográfica.

Organismo	Resolución Å	Referencia bibliográfica
<i>Gallus gallus</i>	2.5	Banner y col., 1975
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.9	Lolis y col., 1990
<i>Trypanosoma brucei</i>	1.83	Wierenga y col., 1991a
<i>Escherichia coli</i>	2.6	Noble y col., 1993a
<i>Homo sapiens</i>	2.8	Mande y col., 1994
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	2.8	Delboni y col., 1995
<i>Plasmodium falciparum</i>	2.2	Velanker y col., 1997
<i>Vibrio marinus</i>	2.7	Alvarez y col., 1998
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1.83	Maldonado y col., 1998
<i>Leishmania mexicana</i>	1.83	Williams y col., 1999
<i>Pyrococcus woesei</i>	2.7	Walden y col., 2001
<i>Entamoeba histolytica</i>	1.5	Rodríguez-R. y col., 2002

### 1.2.3 Análogos del sustrato de la triosafosfato isomerasa

En el caso de la TIM se ha estudiado en gran detalle la geometría de los ligandos del sitio activo. Entre ellos se encuentran el 2-fosfoglicolato (2-PG) y su correspondiente hidroxamato, fosfoglucohidroxamato (PGH). El 2-PG y PGH son excelentes inhibidores de la TIM con valores de  $K_i$  cercanos a 10  $\mu\text{M}$ .

El inhibidor 2-PG, contiene un grupo hidroximetil menos que los sustratos naturales GAP y DHAP (Figura 4). Se le ha considerado como un análogo del estado de transición, porque tiene parecido a un posible estado de la reacción de isomerización, en términos de su estructura y distribución de cargas.

El PGH (Figura 4) es un compuesto estable análogo del estado de transición, cuya estructura geométrica es similar a la del intermediario propuesto. Ambos ligandos se unen más fuertemente a la TIM que sus sustratos naturales GAP y DHAP.

Algunos complejos TIM-2PG y TIM-PGH se han cristalizado para obtener información de las interacciones de los residuos de la proteína con el ligando, de tal forma que se puedan examinar los cambios estructurales locales que ocurren en el sitio activo de la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

proteína y principalmente en el asa 6, tanto en su forma cerrada como abierta (ver también sección 1.2.4; Davenport y col., 1991, Noble y col., 1993b, Zhang y col., 1994).

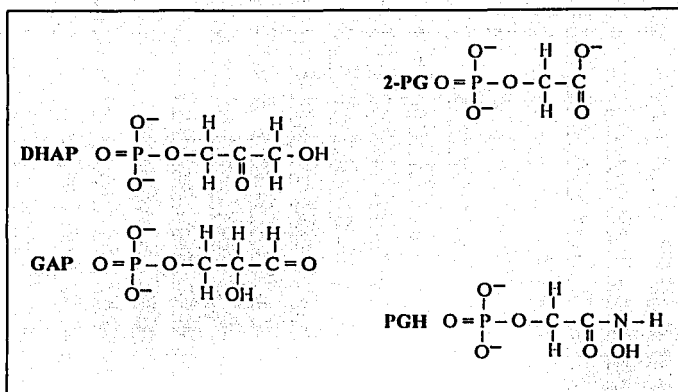


Figura 4. Comparación de las estructuras de los sustratos DHAP y GAP con sus análogos 2-PG y PGH.

#### 1.2.4 Asa 6 y la formación de metilgloxal

La TIM posee un asa cerca del sitio activo, llamada asa 6, "asa flexible" o "asa catalítica", formada por 10 a 11 aminoácidos que se localizan entre los residuos 166-176 de su secuencia. En presencia de un ligando específico el asa se mueve aproximadamente 7-10 Å de una posición "abierta" a una posición "cerrada" (Figura 5). Este movimiento aísla al sitio activo del solvente que rodea a la enzima, estableciendo un puente de hidrógeno, entre el NH de la Gly171 y el oxígeno del fosfato del sustrato, que estabiliza al intermediario enodiol de la reacción (Albert y col., 1981). En esta integración se asegura la transformación eficiente del sustrato y se inhibe la reacción de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

eliminación del grupo fosfato del intermediario, por lo que se previene la formación de metilgloxal (ver Figura 2).

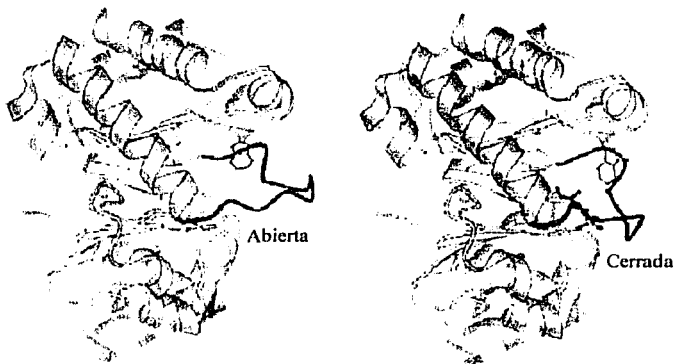


Figura 5. Se muestra el asa 6 de la TIM de levadura en posición abierta (sin ligando) y en posición cerrada (en presencia del análogo fosfoglicohidroxamato, en rojo). En este caso el Trp168 (en verde) de la bisagra amino-terminal, se utilizó como reportero marcado con deuterio para determinar el movimiento del asa 6 (tomado de Rozovsky and McDermott 2001).

Se sabe que el metilgloxal es un compuesto altamente reactivo y, aunque no se conoce su función biológica, se cree que es una molécula tóxica. El metilgloxal se metaboliza a D-lactato por las glicoxalosas I y II (Richard., 1991).

La función del asa flexible se investigó en la TIM de pollo eliminando 4 residuos contiguos de una parte del asa 6, que interacciona directamente con el sustrato. Los

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

residuos eliminados se muestran en la figura 6. De acuerdo con la estructura de la enzima silvestre, parecería que esta mutación no alteraría significativamente la conformación del resto de la cadena de la proteína. Sin embargo, la actividad específica de la enzima mutante fue  $10^5$  veces más baja que la silvestre (Pompliano y col. 1990).

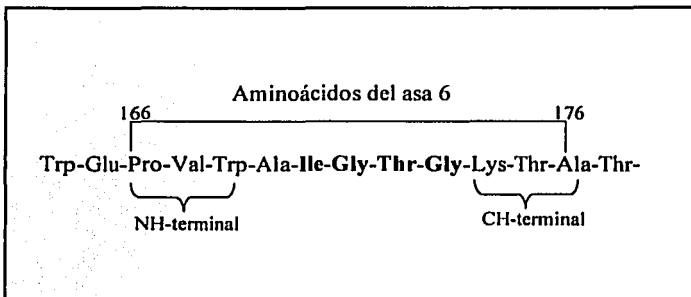


Figura 6. En la figura se muestran los residuos del asa 6, así como la bisagra amino (NH) y carboxilo (CH) terminal. En letras negras se indican los 4 residuos eliminados en la TIM de pollo (tomado de Pompliano y col. 1990).

Estudios cinéticos con la mutante demostraron que los residuos eliminados del asa 6 contribuyen notablemente en la estabilización del intermediario enediol-fosfato, debido a la baja unión de la enzima mutante por su intermediario. En ese caso, la enzima mutante no puede prevenir la pérdida de enediol-fosfato por el sitio activo y por lo tanto éste se descompone a metilglicoxal y fosfato inorgánico (Pi). Se encontró que cuando se usa el GAP como sustrato, se favorece 5.5 veces la formación de metilglicoxal que lo que cataliza a DHAP, y cuando la DHAP es el sustrato, la relación metilglicoxal a GAP fue de 0.65 veces. Por lo tanto, cuando el GAP es el sustrato, la enzima mutante cataliza la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

descomposición a metilglicoxal 5 veces más rápidamente que cuando está catalizando la conversión de DHAP. Lo que se sugiere es que esta asa evolucionó para unir fuertemente al intermediario enodiol que es altamente reactivo (Pompliano y col., 1990).

Originalmente, se pensó que la presencia del ligando provocaba un cambio de conformación del asa de la forma abierta a la cerrada (Joseph y col., 1990, Wierenga y col., 1991b, Noble y col., 1993b). Estudios posteriores con la mutante W90Y/W157F de la TIM de levadura ( $\gamma$ TIM), cuyo Trp168 (localizado en el asa flexible) se marcó en el grupo indol para obtener espectros de RMN, indicaron que el asa 6 pasa de la conformación abierta a la cerrada a una velocidad de  $3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ . La comparación de los espectros y las velocidades entre la enzima con sustrato y sin sustrato indicaron que la unión del sustrato o salida del producto no induce el movimiento, sino que el asa 6 tiene un movimiento independiente de la presencia del sustrato (Williams y McDermott, 1995). Además, se ha demostrado que la posición abierta predomina en ausencia de ligando, por ser termodinámicamente más estable. Por el contrario, en presencia de ligando la conformación cerrada es la especie predominante y más estable. Otro estudio relacionado con el movimiento del asa se enfocó sobre las bisagras amino y carboxilo-terminal del asa 6 de la proteína. La bisagra NH-terminal está formada por 3 residuos conservados (166-168) y unido a este extremo se encuentran 5 residuos hidrofóbicos. Esta región estabiliza la unión del sustrato y estabiliza al intermediario (residuos 169-173). Finalmente, el extremo CH-terminal consiste de 3 residuos que no están totalmente conservados (174-176; ver Figura 6). En dicho estudio se generó una biblioteca con 8000 posibles combinaciones de aminoácidos en los 3 residuos de la bisagra CH-terminal, para examinar las exigencias de la secuencia en el funcionamiento de la bisagra del asa 6. Las 8000 mutantes se seleccionaron usando complementación *in*



vivo en la cepa de *E. Coli* DF502 carente de TIM. Se seleccionó un grupo de mutantes activas que presentaban una prolina en la primera posición. El estudio determinó que en estas mutantes se favorece la reacción de isomerización sobre la reacción de eliminación (metilglioxal y fosfato; Sun y col., 1999, Xiang y col., 2001).

### 1.2.5 La interfase

La interfase del homodímero de la TIM de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) se forma por 32 residuos que se distribuyen principalmente en 4 asas (asa 1-4 de cada monómero) (ver Figura 3 y Tabla 3). El área de la superficie de la interfase es de aproximadamente  $1600 \text{ \AA}^2$  en cada monómero. En la interfase existen 20 puentes de hidrógeno entre los átomos de las dos subunidades de la proteína. Además, existen 15 interacciones de enlaces de hidrógeno mediados por agua, lo que enfatiza la importancia de las moléculas de agua para la estabilidad del dímero (Wierenga y col., 1991a).

Aunque se pudiera pensar que la interacción monómero-monómero debería haberse conservado en la escala evolutiva, los residuos involucrados en la interacción de la interfase muestran una variabilidad considerable en las secuencias de distintas especies. Por ejemplo, un alineamiento de las TIMs de la TbTIM y *T. cruzi* (TcTIM), muestra un 73% y un 82% de identidad en su secuencia de aminoácidos y en los residuos que forman las interfases, respectivamente (Maldonado y col., 1998). A pesar de la variabilidad de los residuos de la interfase, la estabilidad de asociación entre los monómeros es muy similar entre especies (Lolis y col., 1990).

Tabla 3. Área de superficie oculta en los residuos de la interfase durante la formación del dímero de la TbTIM, así como su localización en la estructura. Los residuos marcados con asterisco representan los residuos no conservados (tomada de Wierenga y col., 1991a).

Residuo	Estructura secundaria	Subunidad A (Å <sup>2</sup> )	Subunidad B (Å <sup>2</sup> )
Asn 11	Beta 1	6	5
Lys13	Asa 1	27	22
Cys14	Asa 1	128	123
Asn15	Asa 1	26	34
Gly16	Asa1	21	22
Ser17	Asa1	23	23
*Gln18	Hélice 1	64	77
Thr44	Asa 2	25	25
Phe45	Asa 2	69	67
*Val46	Asa 2	122	128
His47	Asa 2	20	21
*Ala49	Hélice 2	27	27
Gln65	Asa 3	36	38
Asn66	Asa 3	7	5
Ile68	Asa 3	12	12
Ser71	Asa 3	20	16
Gly72	Asa 3	44	49
Ala73	Asa 3	59	56
Phe74	Asa 3	44	47
Thr75	Asa 3	150	150
Gly76	Asa 3	70	67
Glu77	Asa 3	75	73
Val78	Asa 3	27	29
Ser79	Asa 3	3	3
Ile82	Hélice 3	93	93
Asp85	Hélice 3	76	76
*Phe86	Hélice 3	67	73
His95	Asa 4	7	7
Glu97	Asa 4	40	39
Arg98	Asa 4	45	49
Tyr101	Asa 4	29	29
Tyr102	Asa 4	74	71
32 residuos		Suma 1536 Å <sup>2</sup>	1556 Å <sup>2</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Muchos de los contactos entre los dos monómeros se encuentran en el asa 3, o asa de interdigitación, formada por los residuos 67-79 en la secuencia de *T. brucei*. El asa 3 de cada una de las subunidades penetra en una hendidura que se localiza cerca del sitio activo de la otra subunidad, por lo que los sitios activos y la interfase están en cercanía (Wierenga y col., 1991a).

Los 3 residuos que se piensa contribuyen en forma importante a la interacción entre los dos monómeros se encuentran completamente expuestos en el monómero, pero completamente ocultos en el dímero, y son: el residuo en la posición 14 del asa 1 (no conservado, Cys en tripanosomátidos), el residuo 46 de la  $\alpha$ -hélice 2 (no conservado, Val en *T. brucei*) y, finalmente, el residuo en la posición 75 del asa 3 (una Thr altamente conservada; para más detalle ver la Tabla 3).

Algunos de los estudios realizados para averiguar la importancia de la interfase de la TIM sugieren que la interfase del dímero juega un papel importante en la catálisis y estabilidad de la enzima (ver secciones 1.2.6 y 1.2.7; Borchert y col., 1994, Schliebs y col., 1997).

#### 1.2.6 Cisteína 14

En las TIMs el residuo en la posición 14 es un aminoácido no conservado. En algunos parásitos el residuo 14 es una cisteína, mientras que en las TIMs de otras especies esta posición puede estar ocupado por Met, Leu, Ser, Thr, Gln, Asn o Ala (Tabla 4).

Tabla 4. Aminoácidos presentes en la posición equivalente a la 14, en 81 secuencias conocidas para la TIM de varias especies (Alineamiento realizado con el programa DIALING 2.0).

AMINOÁCIDO	NUMERO DE SECUENCIAS QUE LO PRESENTAN
Metionina	37
Cisteína	13
Leucina	10
Treonina	12
Alanina	3
Asparagina	3
Serina	2
Glutamina	1

En la TbTIM la cisteína 14 (Cys14) se localiza en el asa 1 compuesta de 4 residuos que unen la primera hebra  $\beta$  con la primera  $\alpha$ -hélice. La Cys14 es adyacente a la Lys13, un residuo conservado del sitio catalítico que sirve para unir el sustrato.

La estructura tridimensional de TbTIM muestra que la cadena lateral de la Cys14 está rodeada estrechamente por el asa 3 del otro monómero (Figura 7a), formando un puente de hidrógeno con la Gly72 del otro monómero (Wierenga y col., 1991a) y se encuentra a menos de 0.38 nm de la Ser71, Glu77, Val78 y Ser79 del asa 3 del otro monómero (Figura 7b; Garza-Ramos y col., 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

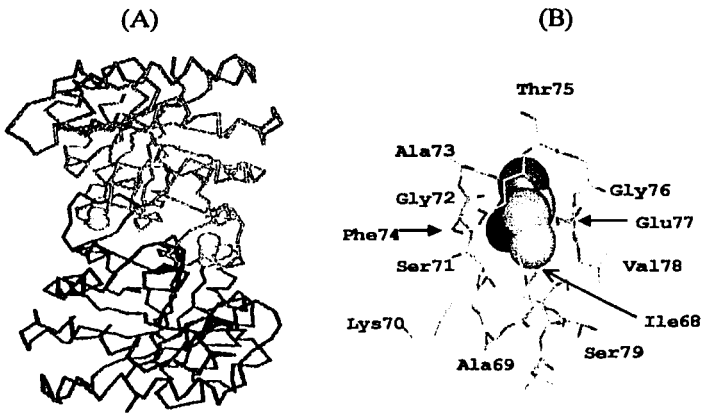


Figura 7. (A) Detalle de la interfase del dímero de la TbTIM que muestra la posición de la Cys14 (en amarillo) de una subunidad (verde) rodeada por el asa 3 de la otra subunidad (roja) y viceversa. (B) Empaquetamiento de la Cys14 entre los residuos del asa 3. Las coordenadas cristalográficas se obtuvieron del archivo 5TIM (de la TbTIM) del PDB.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La importancia del asa 3 y del residuo en la posición 14 en la estabilidad del dímero han sido evidenciadas mutando la Cys14 en la TbTIM por una Leu (Gómez-Puyou y col., 1995) y la Met 14 en la TIM de humano (hTIM) por una Gln (Mainfroid y col., 1996). Como resultado de estas sustituciones se obtuvieron enzimas inestables. Con base en estas observaciones, se ha considerado al residuo de la posición 14 importante para las interacciones de la interfase en la enzima dimerica. Así mismo, alteraciones en el asa 3 produjeron enzimas monoméricas ó dímeros con constantes de asociación bajas (ver con más detalle en la sección 1.2.7; Borchert y col., 1995a; Schliebs y col., 1997).

### 1.2.7 Triosafosfato isomerasas monoméricas

La sustitución de uno o varios residuos de la interfase entre subunidades ha permitido obtener TIMs monoméricas.

1) La primera TIM monomérica fue la monoTIM de *T. brucei*, que se obtuvo por ingeniería genética al sustituir 15 residuos correspondientes al asa 3, hebra- $\beta$  3 y  $\alpha$ -hélice 3 por una secuencia de 8 residuos en la que sólo la Leu80 permaneció invariante (Figura 8 a y b; Borchert y col., 1994). La monoTIM es una proteína monomérica estable con una  $k_{cat}$  1000 veces más baja que la enzima silvestre y una  $K_m$  10 veces más alta. Su estructura tridimensional mostró que el asa 1 y 4 presentan diferencias estructurales considerables. Los residuos Lys13-Cys14-Asn15 del asa 1 presentaron gran movilidad (no se observaron en el mapa de densidad electrónica). Los residuos 94-104 del asa 4 adoptaron una conformación bastante diferente en comparación con la silvestre TbTIM. De los residuos mencionados anteriormente, tanto el de Lys13 como el de His95 son importantes para la catálisis y ambos sufrieron modificaciones.

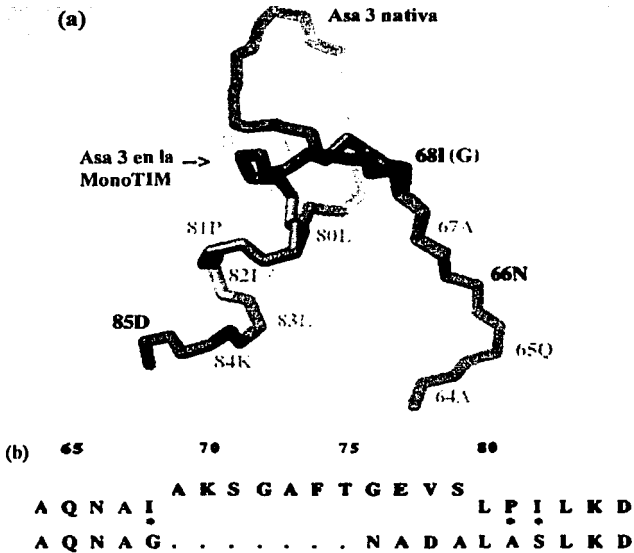


Figura 8. (a) Detalle del asa 3 nativa de la TbTIM (púrpura) comparada con el asa correspondiente de la mutante monoTIM (amarillo). En la figura, se puede observar el acortamiento de esta asa. (b) El renglón superior muestra la secuencia de aminoácidos (código de una letra) de la región del asa 3 de la TbTIM silvestre y el renglón inferior la secuencia correspondiente de la monoTIM. En TbTIM la Ala64 es el último residuo de la hebra  $\beta$  3 y la Leu80 es el primer residuo de la  $\alpha$ -hélice 3. En la monoTIM se eliminaron desde el residuo 69 al 75 (del asa 3), al tiempo que los residuos 68,76-79,81 y 82 fueron mutados (asterisco). Tomado de Borchert y col., 1994.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se han hecho algunas variantes de la monoTIM. La primera variante es la monoTIM-SS, que se obtuvo al cambiar dos residuos hidrofóbicos de la superficie de la monoTIM, la Phe45 y Val46, por Ser.

La segunda variante es la monoTIM-W en la que se sustituyó la Ala100 por Trp. En la monoTIM la Ala100 (asa 4) se encuentra ligeramente oculta, por lo que al ocupar su lugar un Trp, su cadena lateral puede hacer contacto con otros átomos. En la enzima TbTIM silvestre la misma mutación no afectó la actividad catalítica de la enzima. La estructura cristalográfica de la monoTIM-SS se obtuvo en presencia y ausencia de un análogo del sustrato PGH y la de la monoTIM-W se obtuvo en presencia del análogo 2-PG. La comparación de las estructuras de la monoTIM, monoTIM-SS, monoTIM-SS(PGH) y la monoTIM-W(2-PG) mostraron flexibilidad estructural en las asas 1, 4 y 8. En las estructuras con inhibidor, la Lys13 y la His95 adoptaron conformaciones similares a la silvestre, pero muy diferentes a la monoTIM. Estas asas carecen de flexibilidad estructural en la enzima silvestre. Los datos sugirieron que la rigidez de estas asas en la enzima silvestre es el resultado de los contactos subunidad-subunidad de la interfase del dímero, los cuales son importantes para una catálisis óptima (Borchert y col., 1995a, Schliebs y col., 1996).

Recientemente, se reportó una mutante monomérica la RMMO-1TIM, que se obtuvo por mutagénesis al azar del gen de la monoTIM y la posterior selección de las mutantes activas. La mutante RMMO-1TIM tiene mutaciones adicionales a la monoTIM que son: S43P/T44A/A149T y se comporta como monómero con una  $k_{cat}$  un orden de magnitud mayor que la monoTIM (Saab-Rincón y col., 2001).



2) En la TbTIM la His47 del asa 2 está oculta en la interfase del dímero. Interactúa vía una molécula de agua con la cadena lateral del Asp85 de la  $\alpha$ -hélice 3 de la otra subunidad. Esta molécula de agua está fija en una cavidad completamente oculta en la interfase del dímero. La His47 no se encuentra cerca de ninguno de los dos sitios activos de la TIM; de hecho, la distancia más corta entre algunos de los átomos de la His47 con el sitio activo es de 16 Å. Se construyó la variante H47N, que no permite la formación de un puente de hidrógeno mediado por agua, que tiene un comportamiento de monómero a bajas concentraciones (por debajo de 1 mg/mL) y de dímero a altas concentraciones de proteína (por arriba de 3 mg/mL; Borchert y col., 1993, y 1995b).

3) En la TbTIM se construyó la RE-TIM. Para obtener este monómero se mutaron 2 residuos conservados en el extremo del asa 3: la Thr75 y la Gly76, que se sustituyeron por Arg y Glu, respectivamente. Ambas mutaciones permitieron obtener una TIM monomérica en solución con actividad residual. La secuencia mutada TG se encuentra en la punta del asa 3 y está completamente conservada en todas las TIMs secuenciadas; de hecho se sabe que permite estabilizar la interacción con la otra subunidad.

Los resultados mostraron que la RE-TIM presenta la misma estabilidad térmica que la H47N-TIM, pero sus Tm's son menores que la de la monoTIM. La estabilidad térmica similar de ambas enzimas, sugiere que el asa 3 más grande en ambas enzimas (en comparación con la monoTIM) desestabiliza la proteína. La afinidad de la RE-TIM y la monoTIM por el PGH es la misma, pero esta afinidad es mucho más baja que la observada para la TIM silvestre (Schliebs y col., 1997).

### 1.3 Importancia de la cisteína14 en el diseño de inhibidores de la triosafato isomerasa contra tripanosomátidos

En 1995 Gómez-Puyou y col. (1995) sugirieron que es posible inhibir en forma especie-específica enzimas homólogas y ortólogas con un alto nivel de selectividad. La hipótesis consiste en localizar aminoácidos que no han sido conservados por la evolución, pero que son importantes para la estructura y función de la enzima. Ellos reportaron que las TIMs de especies que tienen una cisteína en la posición 14, como la TIM de *T. brucei*, se inhiben completamente al derivatizar la Cys14 a un metildisulfuro. Las TIMs que carecen de Cys14 o no se inhiben o sólo se afectan parcialmente por la derivatización. La TIM de humano, que tiene una metionina en la posición 14, no se inhibe con el agente derivatizante. También, encontraron que el mecanismo de acción de los agentes derivatizantes es provocar una desestabilización y un cambio conformacional importante en la enzima.

En trabajos posteriores la comparación del efecto de los agentes derivatizantes en las TIMs de *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania mexicana* proporcionó información valiosa sobre el papel de la Cys14 en las interacciones de la interfase del dímero y sobre la posible forma de penetración de estos reactivos hasta la posición de la Cys14 en la estructura cuaternaria de la TIM (Maldonado y col., 1998, Garza-Ramos y col., 1998, Pérez-Montfort y col., 1999).

En estudios sobre la estructura cristalográfica de la TIM de *T. cruzi* en solventes orgánicos, Gao y col. (1999) encontraron dos moléculas de hexano localizadas a menos de 4 Å de los residuos Ile69 y Phe75 en la región de la interfase en uno de los monómeros. Estos dos residuos rodean a la Cys15 del otro monómero en la TcTIM. De acuerdo con Mattos y Ringe (1996) este método permite identificar sitios de unión de moléculas orgánicas hidrofóbicas en proteínas, mismos que pueden representar regiones

donde pueden interactuar fármacos. La cercanía de los dos hexanos a la región de la interfase de la TcTIM confirma aun más el interés de la Cys de interfase como blanco potencial para el diseño de fármacos. Por lo tanto, es posible que en la TcTIM algunas moléculas orgánicas pudieran afectar la interacción entre los dos monómeros y provocar su inactivación.

A este respecto, Téllez-Valencia y col. (2002) encontraron que algunos derivados del benzotiazol inactivan a la TcTIM en concentraciones micromolares. El benzotiazol también inactiva la TIM de humano pero a concentraciones más altas. Una mutante de la hTIM, en la que se cambió la Met15 por Cys, mostró sensibilidad a los benzotiazoles indicando que la Cys15 de la interfase está relacionada con el mecanismo de acción de estas moléculas orgánicas. Por lo tanto, el benzotiazol se puede usar como guía para el diseño de moléculas que interactúen con alta potencia y selectividad con la región de la interfase de la TcTIM.

## 2. ANTECEDENTES

En los grupos de investigación de los Drs. Gómez-Puyou y Pérez-Montfort estamos interesados en el estudio de la Cys14 de la TIM como un residuo importante para la catálisis y estabilidad de la enzima así como en su posible papel como residuo blanco en el diseño de fármacos contra algunos tripanosomátidos. Al ser la Cys14 un residuo no-conservado, nos preguntamos: ¿Qué podría pasar con la TbTIM si el parásito llegara a mutar la Cys14 por otro aminoácido como un mecanismo de defensa contra un inhibidor específico? ¿Alguna mutación en esta posición específica puede producir una enzima igual a la silvestre? y ¿Qué características requiere esta sustitución para que pueda funcionar como un residuo de interfase que contribuya a la estabilización del dímero de la TbTIM?

Una herramienta muy utilizada en los últimos años para estudiar la importancia de un residuo dentro de la proteína es utilizar mutagénesis exhaustiva. Como antecedente de este trabajo, por dicha técnica cambiamos la Cys14 por los 19 aminoácidos restantes en la TbTIM (Hernández-Alcántara, tesis de maestría 2000).

Para obtener los 19 genes mutantes utilizamos el método de PCR. Se diseñaron 2 oligonucleótidos mutagénicos con secuencia degenerada en la posición 14 del gen (NNN y VVN, en los que N= cualquier base y V=A+C+G) y 3 oligonucleótidos mutagénicos sitio dirigidos (GCG=Ala, ATC=Ile y TGG=Trp). Con estos oligonucleótidos generamos los 19 genes mutantes que se clonaron en el plásmido de expresión pET-3a, y, posteriormente, expresamos la proteína en la cepa de *E. coli* BL21DE3pLysS. Para lograr la expresión de las 19 proteínas el paso más importante fue encontrar la temperatura óptima de expresión. Para la mayoría de las TIMs mutantes estas temperaturas fueron de 21 y 30 °C.

Después de un proceso de purificación parcial se determinó la actividad enzimática para cada enzima mutante (el proceso de purificación se llevó a cabo como se describe en la sección de Materiales y Métodos, hasta el paso de resuspender con 200 mM de NaCl). Con estos resultados observamos que el cambio de la Cys14 produjo enzimas con actividades catalíticas diferentes a la enzima silvestre. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Las enzimas mutantes se agruparon de acuerdo a su actividad específica, formando 3 grupos: Enzimas con menos del 1 % de actividad, enzimas con un 10 a 20 % actividad e inestables y enzimas con actividad igual a la silvestre.

Al buscar una explicación para estos resultados encontramos que una característica importante para reemplazar el residuo 14 es que el aminoácido por el cual debe cambiarse la Cys debe tener una hidrofobicidad y un tamaño (en volumen de van der Waals en  $\text{\AA}^3$ ) similar al de la Cys. Con estas dos características se pueden obtener enzimas activas (ver Figura 9).

La Figura 9 muestra que aminoácidos más pequeños o de igual tamaño pero diferente hidrofobicidad a la Cys producen enzimas mutantes con un 10 a 20 % de actividad e inestables. Con aminoácidos de tamaño e hidrofobicidad similares a la Cys se obtienen enzimas mutantes con actividades iguales a la silvestre. Con aminoácidos más grandes y con hidrofobicidad similar o diferente a la Cys se producen enzimas con actividades menores al 1 %.

En el trabajo de esta tesis nos propusimos estudiar más profundamente las características de algunas de estas enzimas mutantes. Primero decidimos estudiar todas las enzimas mutantes con actividad igual a la silvestre; también estudiamos las mutantes C14G y C14N como representantes de las enzimas con actividad del 10 al 20 % e inestables, y, finalmente, la mutante C14F como representante del grupo de enzimas con actividad de menos del 1 %.

Tabla 5. En la tabla se muestra la actividad específica ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) de las 19 enzimas mutantes en un proceso de purificación parcial (ver texto). La abundancia relativa en % se obtuvo por densitometría de geles desnaturalizantes (con  $10 \mu\text{g}$  de proteína) y considerando como 100% la banda de 27 kDa de la TbTIM silvestre. Las primeras 11 enzimas mutantes corresponden al grupo de enzimas con menos del 1 % de la actividad de la enzima silvestre. Las mutantes 12-14 son enzimas que tienen entre un 10 y un 20 % de la actividad de la TbTIM. Las mutantes 15-19 corresponden a las enzimas con actividad similar a la silvestre (Hernández-Alcántara, tesis de maestría 2000).

No.	ENZIMA	ACTIVIDAD ESPECIFICA ( $\mu\text{mol}/\text{des}/\text{mg}$ )	ABUNDANCIA RELATIVA EN %
1	C14M	1	23
2	C14L	2	26
3	C14Q	4	50
4	C14Y	5	50
5	C14W	6	17
6	C14I	6	46
7	C14E	6	44
8	C14H	6	35
9	C14D	18	54
10	C14K	22	32
11	C14F	23	69
12	C14G	157	86
13	C14R	537	83
14	C14N	556	85
15	C14V	2531	94
16	C14P	2575	99
17	C14S	2583	85
18	C14A	3624	99
19	C14T	3680	105
	TbTIM silvestre	2858	100

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

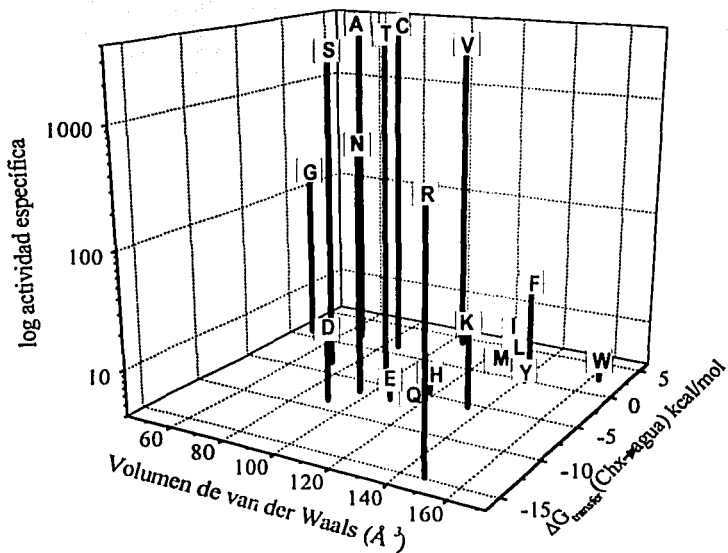


Figura 9. La gráfica muestra una correlación entre el tamaño (volumen de van der Waals  $\text{\AA}^3$ ), la hidrofobicidad ( $\Delta G_{\text{transferencia}}(\text{Chx} \rightarrow \text{agua})$  kcal/mol) del aminoácido sustituido y la actividad específica ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) de las diferentes enzimas. La actividad específica se obtuvo en enzimas purificadas parcialmente (Tabla 5; Hernández-Alcántara, tesis de maestría 2000).

### **3.OBJETIVO**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL:**

Para estudiar la contribución de la Cys14 a la estabilidad y actividad de la TbTIM nos propusimos el siguiente objetivo: purificar y caracterizar bioquímicamente a las enzimas mutantes: C14A, C14P, C14S, C14T y C14V (mutantes con alta actividad), las enzimas C14G y C14N (mutantes con 10 al 20 % de actividad) y C14F (mutante con menos del 1% de actividad).

#### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Purificar las distintas enzimas mutantes
- Determinar sus constantes cinéticas
- Determinar la producción de metilgloxal
- Determinar el efecto de la concentración de proteína en la actividad específica
- Determinar sus propiedades estructurales por fluorescencia y dicroísmo circular
- Determinar la  $T_m$  aparente de desnaturalización mediante dicroísmo circular
- Determinar el efecto del metilmetano tiosulfonato (MMTS) en la actividad de las enzimas



## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Expresión y purificación

La cepa de *E. coli* BL21 DE3pLysS se transformó con los genes mutantes y el silvestre clonados en el vector de expresión pET-3a. La expresión se realizó a partir de un litro de medio de cultivo Luria Bertani (LB) con 100 µg/mL de ampicilina. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (D. O)  $A_{600nm} = 0.6-0.8$ , se agregó 0.4 mM del inductor isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) y durante 12 horas se incubaron los cultivos a 37 °C para la enzima silvestre y C14V. Las enzimas C14A, C14G, C14N, C14P, C14T y C14S se expresaron en cultivos a 30 °C. El gene que lleva la mutante C14F se expresó en un cultivo a 21 °C. Con dichas temperaturas se obtuvieron los mejores niveles de expresión.

La purificación de las enzimas C14A, C14G, C14N, C14P, C14S, C14T y C14V se realizó de acuerdo al protocolo de purificación para la enzima silvestre descrito por Borchert y col., 1993. Brevemente, 1 L de LB con la cepa de bacterias inducida y sobreexpresada se centrifugó por 10 min a 27 000 x g a 4 °C. 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 a pH 6.5). Las células se rompieron por cambio de presión en una Prensa de French a 1500 psi y a 4 °C. El lisado se centrifugó a 27 000 x g por 15 min a 4 °C. El botón se resuspendió en 20 mL de amortiguador de lisis con NaCl 200 mM en agitación constante por 30 min y se centrifugó a 27 000 x g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se precipitó con  $(NH_4)_2SO_4$  al 45% de saturación en frío durante 12 hrs y se centrifugó a 27 000 x g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se precipitó con  $(NH_4)_2SO_4$  al 65% de saturación durante 12 hrs y posteriormente se centrifugó a 27 000 x g por 15 min. El botón obtenido se disolvió en 2 mL de amortiguador A (trietanolamina ó TEA 100 mM,

NaCl 25 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y  $\text{NaN}_3$  1 mM, pH 8.0) y se dializó contra el mismo amortiguador con dos cambios de 0.5 a 1 L. La muestra se pasó por una columna de carboximetil (CM) sefarsa. La columna se equilibró previamente con el amortiguador A y se eluyó con un gradiente de 25 a 100 mM de NaCl. El eluido se colectó en fracciones de 1 mL. La proteína pura se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 70% para su almacenamiento. Todo el proceso de purificación se monitoreó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 16 % en presencia de dodecil sulfato de sodio tñendo con azul de Coomassie, por actividad catalítica y por cuantificación de proteína por absorbancia a 280 nm para la proteína pura, y, por el método del ácido bicinónico (BCA Protein Assay Reagent Kit) para los pasos intermedios de purificación. Esta técnica de cuantificación de proteína está basada en la acción del ácido bicinónico, que reacciona con cuatro aminoácidos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) dando el color a la reacción, con un máximo de absorbancia a 562 nm. El método mide proteína en un intervalo de 20 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Smith y col., 1985).

Para la enzima C14N el proceso de purificación se realizó hasta el paso de la precipitación al 65 % con sulfato de amonio.

La enzima C14F se purificó de la siguiente forma: Las células de 1 L de medio de cultivo LB se resuspendieron en amortiguador de lisis y se rompieron pasándolas tres veces por la Prensa de French. El lisado se centrifugó a 27 000 x g por 15 min a 4 °C. El botón se resuspendió por 18 hrs a 4 °C en amortiguador de lisis con NaCl 200 mM y se centrifugó a 27 000 x g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se dializó con amortiguador A. La proteína se pasó a través de una columna de CM-sefarsa equilibrada con el mismo amortiguador, se aplicó un gradiente lineal de NaCl de 0 a 150 mM para la elución de la proteína. El eluido se separó en fracciones de 1 mL y la cantidad de proteína en cada fracción se monitoreó por espectrofotometría midiendo la absorbancia

a 280 nm. Se midió la actividad de las fracciones correspondientes a los picos en los que se esperaba colectar la proteína; las fracciones que presentaron actividad se concentraron. En todos los pasos de la purificación se determinó la actividad catalítica y se realizó un análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio. La proteína pura se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 70 % para su almacenamiento.

#### 4.2 Actividad catalítica

La actividad catalítica de las proteínas en la dirección de GAP a DHAP se siguió espectrofotométricamente por la disminución en la absorbencia a 340 nm, causada por la oxidación del NADH en un ensayo acoplado con la enzima  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH) a 25 °C. La mezcla de reacción contenía amortiguador TEA 100 mM/ EDTA 10 mM, pH 7.4 (TE 100/10), GAP 1 mM, la enzima acopladora,  $\alpha$ -GDH a 1.25 U/mL y NADH 0.2 mM, en un volumen final de 1 mL. Para iniciar la reacción se agregó la proteína a una concentración final de 5 ng/mL. Para las proteínas mutantes C14G, C14N y C14F la concentración de proteína fue 1.3, 0.05 y 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. En la dirección de DHAP a GAP se inició la reacción al agregar 100 ng/mL de proteína en un volumen final de 0.2 mL de amortiguador TE 100/10, arsenato 4 mM, DTT 120  $\mu\text{M}$ , NAD 1 mM y 1 unidad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) a 25 °C, excepto para la mutante C14F para la que se utilizaron 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  de proteína para la dirección GAP y DHAP, respectivamente.

### 4.3 Parámetros cinéticos

Se realizaron curvas de concentración de sustrato para GAP (0.06 a 2 mM) y DHAP (0.325 a 10 mM) contra actividad para la TbTIM, las diferentes proteínas con alta actividad y la mutante C14F, con el fin de determinar sus parámetros cinéticos. Utilizando GAP como sustrato se realizaron dos experimentos, el promedio en ambos valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  difieren en menos del 10 %. En el caso de DHAP como sustrato, se realizó un solo experimento. Las curvas obtenidas se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten y se calcularon la  $K_m$  y la  $V_{max}$  por regresión no lineal.

### 4.4 Cuantificación de metilgloxal

La cuantificación de metilgloxal se realizó siguiendo el método reportado por Richard, J. P. 1991. Se utilizaron las diferentes enzimas a una concentración de 18  $\mu\text{M}$  y  $[\text{P}^{32}]\text{DHAP}$  0.5  $\mu\text{M}$  como sustrato. Las enzimas se incubaron durante 20 h y a diferentes tiempos se tomaron muestras para medir la eliminación de fosfato.

### 4.5 Efecto de la concentración de proteína en la actividad específica de las enzimas con alta actividad

La TbTIM y las mutantes con alta actividad se incubaron en un intervalo de concentración de proteína de 0.5 a 400  $\mu\text{g/mL}$  en amortiguador de TE 100/10 a 25 °C. La actividad catalítica se determinó con 5 ng/mL de proteína después de 24 h de incubación. Se graficó la actividad remanente contra la concentración de proteína y se calculó la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) de acuerdo a la fórmula descrita por Mainfroid y col. (1996).

$$\text{SpA} = \text{SpA}_{\text{max}} [4E_0 + K_d - (8E_0 K_d + K_d^2)^{1/2} / 4E_0]$$

Donde:  $SpA$  es la actividad específica,  $SpA_{max}$  la actividad específica máxima y  $E_0$  la concentración total de monómero. En esta ecuación se asume que el dímero es la única especie activa.

#### 4.6 Propiedades espectroscópicas

##### 4.6.1 Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se realizaron en un espectropolarímetro AVIV (Lakewood, NJ) 62 HDS. Usando una celda de cuarzo de 0.1 cm y 1.0 cm de paso de luz con un ancho de banda de 1.0 nm, para el UV-lejano y el UV-cercano, respectivamente. Las enzimas se dializaron en amortiguador de fosfatos 25 mM y NaCl 20 mM, pH 7.4 y se filtraron por una membrana de 0.45  $\mu$ m. Se usó una concentración de proteína de 100  $\mu$ g/mL y 400  $\mu$ g/mL, respectivamente. Se realizaron 5 repeticiones por espectro en un intervalo de 195-240 nm y 260-320 nm, respectivamente. Para calcular los valores de elipticidad molar se determinó la concentración de proteína a una absorbencia de 280 nm utilizando un coeficiente de extinción molar de 34 950  $M^{-1} cm^{-1}$  para todas las enzimas. La elipticidad molar se obtuvo con la siguiente ecuación:

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

Donde,  $\theta$  es la elipticidad molar en grados;  $\theta_{obs}$ , es la medida de elipticidad observada en grados; MRW es la media del peso molecular de los residuos (del inglés mean residue weight); 100 es el factor que se origina de la conversión de 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.

#### 4.6.2 Estabilidad térmica

El patrón de desnaturalización térmica se determinó siguiendo los cambios en elipticidad de la enzima a 222 nm en un intervalo de temperatura de 20 a 70 °C. La temperatura se incrementó 1 °C cada 2.5 min. Se utilizaron 400 µg/mL de proteína previamente dializados en amortiguador de MOPS 20 mM, pH 7.0 con EDTA/DTT/NaN<sub>3</sub> 1 mM. La fracción desnaturalizada ( $f_D$ ) se calculó con la siguiente ecuación:

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

Donde  $y_N$  y  $y_D$  corresponden a los valores de elipticidad de la especie nativa y desnaturalizada, respectivamente. Los dos parámetros se determinaron a partir de una extrapolación lineal de la porción inicial y final de la curva de elipticidad ( $y$ ) contra la temperatura.

#### 4.6.3 Espectros de fluorescencia

Los cambios en la intensidad de fluorescencia de la enzima silvestre y la mutante C14F se siguieron a 25 °C en un espectrofluorómetro RF-5000U Shimadzu. Se utilizó una celda de cuarzo de 1.0 cm excitando a una longitud de onda de 280 nm y midiendo la emisión entre 300 y 400 nm. La concentración de proteína utilizada fue de 50 µg/mL en amortiguador TE 100/10. Se restaron los valores del espectro del amortiguador.

El centro espectral de masa (de las siglas en inglés SCM, "spectral center of mass") de cada espectro de fluorescencia se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$SCM = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)}$$

Donde  $I(\lambda)$  es la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda  $\lambda$ .

#### **4.7 Determinación de la actividad específica de las enzimas mutantes C14G y C14N**

La enzima mutante C14G se purificó a homogeneidad. En el caso de la enzima mutante C14N el protocolo de purificación se llevó a cabo hasta las precipitaciones diferenciales con sulfato de amonio (sección 4.1). Con esos grados de purificación las enzimas se incubaron a una concentración final de 1.3 y 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (concentración más alta a la cual se pudo medir actividad para ambas enzimas), en amortiguador TE 100/10 a 25 °C. La reacción se inició agregando la mezcla de reacción que contenía la enzima acoplante ( $\alpha$ -GDH) junto con el sustrato (GAP) y NADH a diferentes tiempos de incubación.

#### **4.8 Determinación de la masa molecular**

##### **4.8.1 Cromatografía de exclusión molecular**

La cromatografía de exclusión molecular se realizó en una columna ultraseferosa- SEC 3000 de 7.5 x 300 mm, con un tamaño de poro de 230 Å (para un intervalo de masas moleculares relativas,  $M_n$ , entre 5 000 y 700 000) y un equipo de cromatografía líquida de alta presión (Beckman). La columna se equilibró y eluyó con amortiguador de fosfato 100 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM y NaCl 150 mM. Antes de la inyección la muestra se filtró por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y la columna se eluyó a un flujo de 1 mL/min. La proteína se cuantificó por absorbencia a 280 nm. El radio de Stokes ( $R_s$ ) se determinó por el análisis del volumen de elución interpolando en una curva de calibración determinada con estándares de proteínas globulares con valores de  $R_s$  conocidos, siguiendo el método descrito por Ackers, (1967).

#### 4.8.2 Análisis de sedimentación

Los experimentos se realizaron en una ultracentrífuga analítica con capacidad de rastreo óptico (Optima model XL-A, Beckman, Fullerton, CA) La proteína se dializó extensamente a 4 °C en amortiguador de TEA 0.1 M, pH 7.4 con DTT 1 mM y EDTA 10 mM. Una parte del líquido de diálisis se utilizó como blanco de referencia. Para los experimentos de velocidad de sedimentación se utilizaron 0.4 mg/mL de proteína y se corrieron a 129 280 x g en una celda de cuarzo. El coeficiente de sedimentación se correlacionó con la temperatura (20 °C) y la viscosidad del agua ( $\nu_p=0.7468$  mL/g,  $\rho_0=1.09$  g/mL). Los datos se analizaron con el programa SVEDBERG (Imagen, Inc.).

Los experimentos de sedimentación al equilibrio se realizaron centrifugando a 18 000 y 26 000 x g a 20 °C. Los datos se colectaron por un escáner a 280 nm, con espacios de 0.001 cm, en intervalos de 4 hrs. Los datos se analizaron con el programa de regresión no lineal NONLIN. Este programa determina una masa molecular aparente de acuerdo a la siguiente relación  $\sigma = [M(1 - \nu\rho) \omega^2]/(RT)$ . Donde  $M$  es la masa molecular,  $\nu$  es el volumen específico parcial,  $\rho$  es la densidad del solvente,  $\omega$  es la velocidad radial,  $R$  es la constante de los gases y  $T$  es la temperatura absoluta en Kelvin.

#### 4.9 Efecto del metilmetanotiosulfonato y ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico

##### 4.9.1 Ensayos de inhibición por metilmetanotiosulfonato

El metilmetanotiosulfonato (MMTS) reacciona exclusivamente con Cys produciendo un derivado relativamente pequeño (metildisulfuro), como se muestra en la Figura 10A (Smith y col., 1975). Se probó el efecto del MMTS sobre la actividad de la TIM silvestre y las enzimas mutantes con alta actividad (C14A, C14P, C14S, C14T y C14V).



Las diferentes enzimas se incubaron a una concentración de 100 µg/ml. en amortiguador TE 100/10 a 25°C. Se probaron concentraciones de MMTS en un intervalo de 0 a 2500 µM. Se midió la actividad de las enzimas al tiempo cero para cada una de las concentraciones y se incubaron en presencia de MMTS durante 2 h. En ese tiempo se tomó otra alícuota de cada muestra para determinar su actividad. Las alícuotas se diluyeron en amortiguador TE 100/10 hasta dar una concentración final de 5 ng de proteína y medir su actividad. El porcentaje de la actividad residual para cada enzima se calculó con respecto al valor de la actividad del tiempo 0.

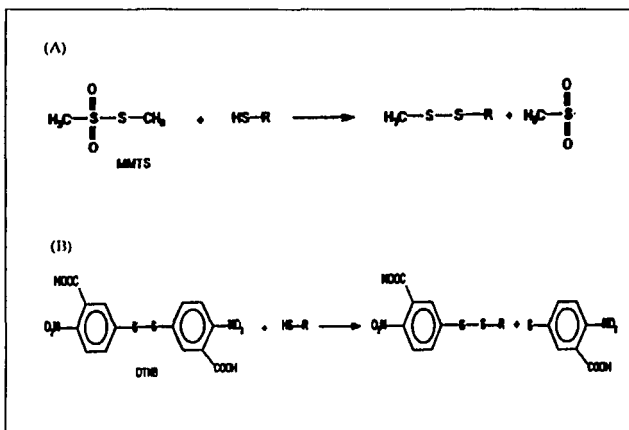


Figura 10. Reacciones generales del MMTS (A) y (B) ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) en presencia de un grupo sulfhidrilo libre.

#### 4.9.2 Titulación de tioles

Se empleó un método espectrofotométrico para titular residuos de Cys con grupos sulfhidrilo libres, utilizando la reacción del ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), procedimiento descrito por Ellman (1958). Este disulfuro reacciona equimolarmente con sulfhidrilos libres liberando un cromóforo: el ácido 2-nitro-1-benzoico (ver Figura 10B), compuesto que al tener un prominente máximo de absorberencia a 412 nm ( $\epsilon_{412} = 13\ 600\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ), puede ser medido espectrofotométricamente.

El experimento se realizó de la siguiente forma: en una celda con amortiguador TE 100/10 y DTNB 2 mM se monitoreó la absorberencia a 412 nm durante dos minutos. A los dos minutos se agregó 0.5 mg/mL de las diferentes proteínas y se siguió midiendo la absorberencia durante 90 min, junto con la de un control carente de proteína y procesado de la misma manera que las muestras. Después de corregir por la absorberencia del control (originada por la autohidrólisis del DTNB), se utilizó el valor de la absorberencia a 412 nm, considerando desde el tiempo cero. Para calcular la concentración de sulfhidrilos en la solución, se utilizó la absorberencia molar del DTNB (Ellman, 1958).

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 Expresión y purificación**

La TbTIM, las enzimas mutantes con alta actividad y la mutante C14G se expresaron y purificaron de acuerdo al protocolo reportado para la enzima silvestre (Borchert y col., 1993) con un rendimiento de 60-80 mg de enzima pura/l. de cultivo. El protocolo de purificación para la enzima C14F se modificó debido a que ésta tiende a formar agregados y el rendimiento final fue ~90 % más bajo. Las enzimas puras se corrieron en un gel de electroforesis desnaturalizante mostrando una sola banda con un peso molecular de aproximadamente 27 kDa.

### **5.2 Determinación de la actividad específica de las enzimas mutantes C14G y C14N**

En ensayos previos de actividad catalítica (durante las purificaciones parciales) las enzimas mutantes C14G y C14N mostraron un decaimiento progresivo de su actividad durante los primeros minutos del ensayo, lo que nos indicaba que estas enzimas eran inestables en tiempos muy cortos (Hernández-Alcántara, tesis de maestría 2000).

Las enzimas se purificaron como se describe en Materiales y Métodos y, posteriormente, se probaron diferentes concentraciones de proteína hasta encontrar la concentración en la cual se observaba un D.O/min inicial de 0.1. Una vez encontrada esta condición (1.3 y 0.5 µg/mL para C14G y C14N, respectivamente) se incubaron las enzimas a diferentes tiempos (como se describe en la sección 4.6). Cabe mencionar que aun a estas concentraciones de proteína, las enzimas siguen siendo inestables, ya que su actividad decae en los primeros minutos en el trazo de actividad. Para este trabajo consideramos únicamente el primer minuto del tiempo de reacción.

Con estos resultados se construyó una gráfica de la actividad remanente contra tiempo (Figura 11). La gráfica muestra que 1 min es suficiente en el caso de C14N para inducir la pérdida total de actividad. Para C14G, cerca del 15 % de la actividad remanente queda después de 2 min de incubación de la proteína. A tiempos más largos no se modifica su actividad.

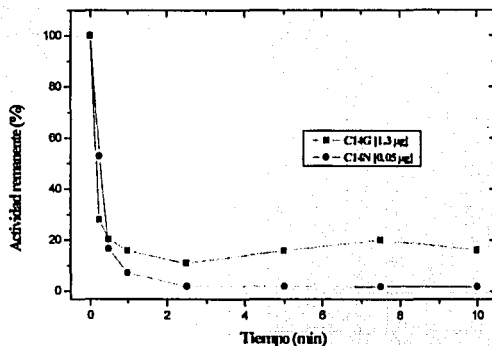


Figura 11. Cinética de inactivación de C14G y C14N a 1.3 y 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, en amortiguador TE 100/10 mM a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Las enzimas se incubaron como se describe en materiales y métodos. Los datos que se muestran corresponden a los primeros minutos del tiempo de reacción. Los resultados se presentan como actividad remanente en % donde el 100% fue 27.2 y 670.5  $\mu\text{mol/min/mg}$  para C14G y C14N, respectivamente.

A este respecto, en un trabajo anterior Borchert y col (1995b) construyeron en la T<sub>h</sub>T<sub>h</sub>M una mutante (la H47N) con el fin de estudiar el equilibrio dímero/monómero de esta enzima (para más detalle ver sección 1.2.7). Cuando la enzima se diluyó para determinar la actividad catalítica presentó un decaimiento progresivo durante los primeros minutos, lo que sugirió que la dilución de proteína llevaba a una inactivación dependiente del tiempo. Una caracterización más detallada demostró que la enzima H47N se comportaba únicamente como dímero a concentraciones por encima de 3 mg/mL de proteína. A una concentración de 1 mg/mL de proteína esta mutante se caracterizó como un monómero compacto menos estable que el dímero silvestre (Borchert y col., 1995b, Schliebs y col., 1997). Las enzimas mutantes C14G y C14N también presentan un comportamiento de inactivación a lo largo del tiempo cuando se diluyen, por lo que al parecer también presentan una alteración en el equilibrio dímero-monómero.

### 5.3 Parámetros cinéticos

Se determinaron las propiedades cinéticas de la enzima silvestre y las mutantes con alta actividad en ambas direcciones de la reacción catalizada por la TIM. Con ambos sustratos, los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  de las mutantes con alta actividad y de la enzima silvestre fueron similares (Tabla 6). Estos resultados demuestran que los residuos catalíticos no se afectaron por la mutación en las 5 enzimas con alta actividad, ya que las enzimas catalizan igual que la silvestre.

Para la enzima C14F, las  $k_{cat}$  de GAP y DHAP fueron 1000 y 3000 veces más bajas que las de la enzima silvestre, respectivamente y sus  $K_m$  para GAP y DHAP fueron 6 y 3 veces más altas con respecto a la enzima silvestre (Tabla 6). Para esta enzima mutante

es probable que alguno de los residuos que participan en la catálisis estén afectados, pues las diferencias en los parámetros cinéticos son bastante evidentes.

Tabla 6. Las constantes cinéticas se determinaron a diferentes concentraciones de GAP (0.06 a 2 mM) o DHAP ( 0.325 a 10 mM) como sustrato. Se calcularon los parámetros cinéticos correspondientes a cada enzima utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. Los datos se calcularon por un ajuste de regresión no lineal.

Constantes cinéticas para TbTIM y las mutantes de Cys14 indicadas						
	$K_m(\text{GAP})$ (mM)	$k_{\text{cat}}(\text{GAP})$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m(\text{GAP})$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$K_m(\text{DHAP})$ (mM)	$k_{\text{cat}}(\text{DHAP})$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m(\text{DHAP})$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
TbTIM	0.380	$2.4 \times 10^5$	$1.0 \times 10^7$	1.9	$2.7 \times 10^4$	$2.3 \times 10^5$
C14A	0.425	$3.1 \times 10^5$	$1.3 \times 10^7$	1.7	$2.8 \times 10^4$	$2.7 \times 10^5$
C14P	0.326	$2.2 \times 10^5$	$1.2 \times 10^7$	1.1	$2.2 \times 10^4$	$3.3 \times 10^5$
C14S	0.498	$3.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^7$	1.9	$2.8 \times 10^4$	$2.4 \times 10^5$
C14T	0.318	$2.3 \times 10^5$	$1.2 \times 10^7$	1.3	$1.4 \times 10^4$	$1.7 \times 10^5$
C14V	0.422	$2.4 \times 10^5$	$1.0 \times 10^7$	1.5	$2.5 \times 10^4$	$2.7 \times 10^5$
C14F	2.2	$1.9 \times 10^2$	527	5.2	9	29

En la Tabla 7 (página siguiente) se muestra una comparación de las constantes cinéticas de la enzima mutante C14F con las de otras TIMs monoméricas. C14F presenta constantes cinéticas similares a la monoTIM y a la RE-TIM. Además, se muestra una comparación de la  $K_i$  utilizando como inhibidor al 2-PG. Considerando que la  $K_i$  del 2-PG para la TbTIM= 0.026 mM, es claro que en este grupo de enzimas monoméricas la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

afinidad por el inhibidor no se ve afectada. Los parámetros cinéticos determinados para la mutante C14F son similares a los reportados para otras TIMs monoméricas.

Tabla 7. Se muestra una comparación de la  $k_{cat}$ ,  $K_m$ ,  $K_i$  y  $T_m$  en presencia de 2-PG de C14F con otras TIMs monoméricas. Los datos se tomaron de <sup>a</sup>Schliebs y col., 1997, <sup>b</sup>Borchert y col., 1995b y de este trabajo (C14F).

	MonoTIM <sup>a</sup>	H47N <sup>b</sup>	RE-TIM <sup>a</sup>	C14F
$k_{cat}(GAP)$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$3.1 \times 10^4$		$1.3 \times 10^2$	$1.9 \times 10^4$
$K_m(GAP)$ (mM)	4.1	0.33	1.4	2.2
$K_i$ (2-PG) (mM)	$0.052 \pm 0.007$	0.018	$0.034 \pm 0.005$	$0.076 \pm 0.008$
$T_m$ (2-PG) (°C)	57	52	52	50.6

#### 5.4 Formación de metilglioxal

Como se mencionó anteriormente (sección 1.2.4), el metilglioxal y el Pi son subproductos que resultan de la descomposición del intermediario enodiol. La reacción de eliminación catalizada por la TIM es mucho más lenta comparada con la reacción de isomerización; por lo que la única forma de poder determinar la formación de metilglioxal es incubando el sustrato en presencia de una concentración elevada de la enzima. En estas condiciones los valores reportados de la relación  $k_{cat}/K_m$  para las reacciones de isomerización y eliminación son de  $10^6$  a  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente (Richard, 1991, Komives y col., 1991, Sun y Sampson., 1999).

En nuestras condiciones,  $18 \mu\text{M}$  de enzima y  $0.5 \mu\text{M}$  de DHAP, se obtuvo para la TbTIM y las mutantes con alta actividad una velocidad de eliminación de Pi ( $k_e$ ) de 1.24 a  $2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . En la mutante C14F la  $k_e$  fue de  $3.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , sólo 2.5 veces más alta que la de

TEXTO CON  
FALLA DE ORIGEN

la enzima silvestre. La relación metilgloxal/GAP, i.e.  $k_e/(k_{cat}/K_m)$  en la C14F fue de 0.120, mientras que para la TbTIM fue de  $0.52 \times 10^{-5}$ . Esto quiere decir que la enzima silvestre produce aproximadamente 1 metilgloxal por cada  $10^5$  GAP. En el caso de la mutante C14F la relación  $k_{cat}/K_m$  para la reacción de isomerización es  $8.2 \times 10^3$  veces menor que la de la TbTIM. Si consideramos que la velocidad de formación del metilgloxal es prácticamente la misma, uno esperaría una relación metilgloxal/GAP para la mutante de:  $1/(10^5/8.2 \times 10^3) \approx 0.08$ . Este valor es muy cercano al obtenido experimentalmente (0.12). Estos datos indican que la velocidad de formación de metilgloxal en la TbTIM es  $10^5$  veces menor que la reacción de reprotonación del intermediario enodiol hacia la formación del GAP (ver Figura 2). La relación  $(k_e/(k_{cat}/K_m))_{TbTIM}/(k_e/(k_{cat}/K_m))_{C14F}$  está incrementada aproximadamente  $10^4$  veces para la mutante C14F, por lo que el paso limitante en la formación de metilgloxal no se modifica y entonces la velocidad de formación de metilgloxal no cambia. De esto se puede concluir que la estabilidad de la interfase dimerica es importante para la reacción de isomerización, pero que desestabilizarla no incrementa la velocidad de la reacción de eliminación.

### 5.5. Estructura secundaria

Los espectros de dicroísmo circular (DC) para la enzima silvestre, las mutantes con alta actividad y la C14F, en un intervalo de 195 a 240 nm y a 25 °C no mostraron diferencias significativas (Figura 12), indicando que con respecto a la proteína silvestre no hay cambios considerables en la estructura secundaria del estado nativo en este grupo de mutantes.



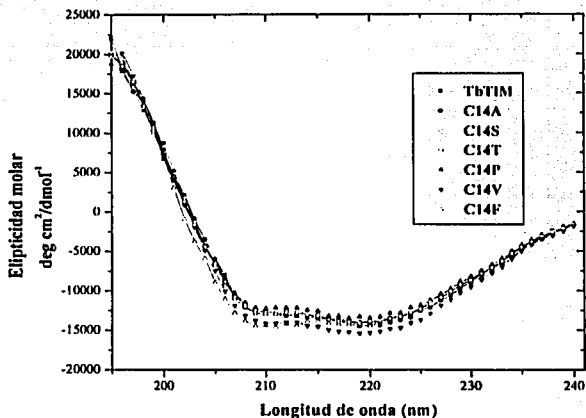


Figura 12. Espectro de DC en amortiguador de fosfatos 25 mM y NaCl 20 mM pH 7.4 a una concentración de proteína de 100  $\mu\text{g/mL}$  y a una temperatura de 25  $^{\circ}\text{C}$ . En el recuadro se muestra el símbolo correspondiente a cada proteína.

**5.6 Efecto de la concentración de proteína en la actividad específica de las enzimas con alta actividad**

En las proteínas oligoméricas, la concentración relativa de monómeros y oligómeros depende de la constante de equilibrio y de la concentración de proteína, debido a esto, algunas enzimas y en particular el homodímero de la TIM, se inactivan a bajas concentraciones de proteína. Basándonos en esta característica estudiamos el efecto de

la concentración de proteína en la actividad específica de las enzimas con alta actividad. Para los ensayos se utilizó un intervalo de concentración de proteína entre 5 y 400  $\mu\text{g/mL}$ . Se determinó la actividad de las enzimas a las 2 y a las 24 h de incubación. Se utilizaron los datos tomados a las 24 h, tiempo en el cual determinamos que la actividad específica de las enzimas ya no cambiaba. En las enzimas mutantes, el decaimiento de la actividad ocurre a concentraciones de proteína menores a los observados en la enzima silvestre (Figura 13). Por ejemplo, la enzima silvestre TbTIM llega al 90 y 100 % de actividad específica a concentraciones entre 5 y 25  $\mu\text{g/mL}$ . La enzima C14A a partir de 50  $\mu\text{g/mL}$  llega al 100 % de actividad específica. Las enzimas C14P, C14S, C14T y C14V mantienen entre un 70 y 90 % de actividad específica entre 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ . A concentraciones de proteína menores llegan a perder por completo su actividad catalítica.

Con los datos obtenidos de las curvas determinamos las constantes de disociación aparente ( $K_d$ ) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados mostrados en el recuadro de la Figura 13 indican que para la TbTIM y las mutantes C14A y C14S la  $K_d$  está en un rango de 1.3 a  $3.8 \times 10^{-7}$  M, mientras que para las mutantes C14P, C14T y C14V es más alta ( $1 \times 10^{-6}$  M). Para la mutante C14F la actividad de la enzima no cambia después de 2 h de incubación en un intervalo de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  (la concentración más baja a la que se pudo determinar actividad catalítica) a 400  $\mu\text{g/mL}$ . Estas observaciones nos sugerían que la enzima C14F podía ser un monómero con baja actividad catalítica, ya que su actividad no se modifica por la concentración de proteína, como se observa en los resultados para las otras enzimas mutantes (ver sección 5.8).

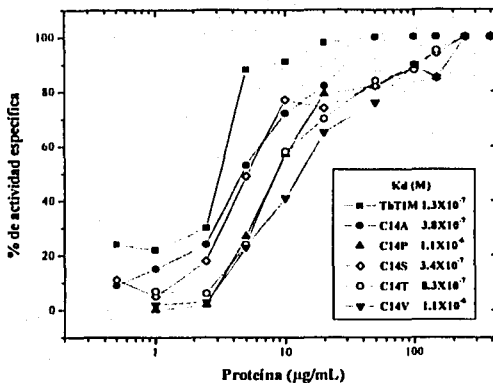


Figura 13. Ensayos de estabilidad a la dilución durante 24 hrs de incubación. En el recuadro de la gráfica se muestra la  $K_d$  calculada para las diferentes enzimas estudiadas.

### 5.7 Estabilidad térmica

El patrón de desplegamiento térmico de la TbTIM, las mutantes con alta actividad y la mutante C14F se determinó por DC a 222 nm como se muestra en la Figura 14.

El patrón obtenido permitió calcular un  $\Delta T_m$  aparente para las diferentes enzimas mutantes (es aparente porque el proceso no es reversible). Los resultados muestran un decremento de 1 a 3 °C en la  $T_m$  de las enzimas mutantes con alta actividad en comparación con la silvestre ( $T_m = 51.4$  °C). A pesar de que la  $\Delta T_m$  aparente para las enzimas con alta actividad sea muy pequeña, es de notar que, para el caso de las enzimas C14P, C14T, C14V y ligeramente menos para la mutante C14S, a partir de 40 °C se empieza a perder estructura, si se comparan con la TbTIM silvestre y la enzima

C14A. La enzima C14F pierde estructura a temperaturas más bajas pues su  $T_m$  aparente calculada fue de 46.5 °C, como se muestra en la curva de desnaturalización de la Figura 14.

El cambio de una Cys por Phe produce una enzima con propiedades catalíticas muy diferentes a las de la enzima silvestre (Tabla 6). Sin embargo, el patrón de su estructura secundaria es similar (Figura 12) y tiene una actividad específica que no se modifica por la concentración de proteína. Su patrón de desplegamiento analizado por DC en un barrido a diferentes temperaturas muestra un decremento en su  $T_m$  aparente de 6 °C, lo que indica que las interacciones no-covalentes de la estructura nativa de la proteína se pierden a temperaturas mucho más bajas. Sin embargo, cuando el sitio activo se encuentra ocupado por un análogo del sustrato (el 2-PG) se incrementa la  $T_m$  a 50.6 °C, a pesar de esto, es más baja que la observada para la TbTIM en las mismas condiciones (57 °C). Este cambio en  $T_m$  (en presencia de 2-PG) ya se había reportado para el caso de otras enzimas monoméricas obtenidas por ingeniería genética a partir de TbTIM (ver Tabla 7; Borchert y col., 1995, Schliebs y col., 1997). Para el caso de la mutante C14F la  $T_m$  resultó ser solamente 1.4 °C más baja que H47N y RE-TIM, pero 6.4 °C menor que la mono-TIM. De acuerdo con Schliebs y col. (1997) para el caso de las TIMs monoméricas el asa 3 más grande desestabiliza la proteína.

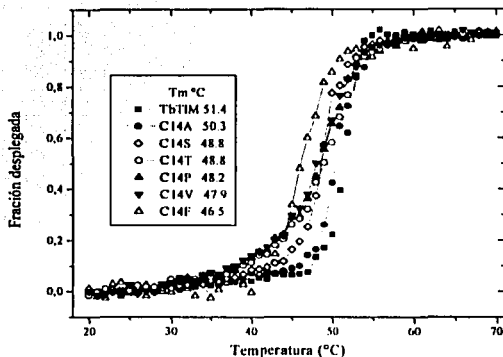


Figura 14. Curvas de desnaturalización seguidas por DC a 222 nm en un intervalo de temperatura de 20 a 70 °C. El recuadro muestra el valor de Tm aparente calculada para cada proteína.

### 5.8 Determinación de la masa molecular para la enzima mutante C14F

La posibilidad de que C14F fuera un monómero se investigó por cromatografía de exclusión molecular y análisis de sedimentación.

El  $R_s$ , calculado para la enzima silvestre fue de 29.2 Å ( $M_r=42,000$ ), para la mutante C14F se determinó un  $R_s$  de 19.2 Å con un  $M_r$  de 20,000.

El coeficiente de sedimentación calculado  $S_{20,w}=2.5044$  S corresponde al reportado para otras TIMs monoméricas. Por sedimentación al equilibrio se determinó una masa molecular de 27,200 Da, que corresponde con la masa molecular calculada para otro monómero de *T. brucei*: 26,879 Da (Borchert y col., 1994 y Schliebs y col., 1997). Estos datos confirmaron que la sustitución de C14F produce un monómero estable.

Por otra parte, los experimentos de fluorescencia intrínseca mostraron que para el caso de la enzima mutante C14F hay un corrimiento del  $\lambda_{m\grave{a}x}$  hacia el rojo de 1.6 nm, con un apagamiento de la fluorescencia del 50 % cuando se compara con la enzima silvestre (Figura 15A). Además los experimentos de DC en el UV cercano muestran alteraciones en el medio ambiente de los residuos aromáticos (Figura 15B). Estos espectros indican que algún Trp oculto se está exponiendo más al solvente. Posiblemente, el cambio se debe al Trp12, que se encuentra cerca de la Phe14. Otra posibilidad es un apagamiento de la fluorescencia del Trp12 debido a transferencia de energía por la Phe14 que antes no existía.

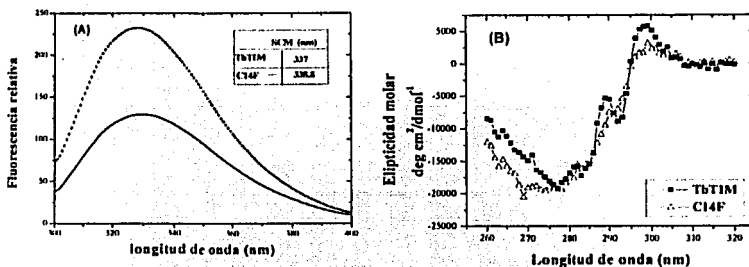


Figura 15. (A) Los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca se realizaron en amortiguador TE 100/10, excitando a 280 nm. En el recuadro se muestra el centro espectral de masas calculado (SCM). En (B) CD de UV cercano en amortiguador de fosfatos 25 mM y NaCl 20 mM pH 7.4; en ambos espectros se utilizaron 0.05 y 0.4 mg/mL de proteína para la TbTIM y la mutante C14F, respectivamente.

La triosafosfato isomerasa de *T. brucei* tiene 5 triptofanos en las siguientes posiciones: el Trp12 se encuentra localizado en el asa 1, Trp90 en la hebra  $\beta$ 4, el Trp159 en una hélice  $3_{10}$  antes de la hebra  $\beta$ 6, el Trp170 se encuentra en el asa 6 o asa catalítica y finalmente, el Trp193 se localiza en la  $\alpha$ -hélice 6. El porcentaje de exposición al solvente calculado para estos residuos de Trp es de: Trp12 0.2, Trp90 9.5, Trp159 2.5, Trp170 3.8 y Trp193 18.6. Recientemente Chánez-Cárdenas y col. (2002) demostraron por mutagénesis sitio dirigida la contribución de estos 5 Trp a la fluorescencia intrínseca de la TbTIM.

La mutante W12F mostró un apagamiento de la fluorescencia de un 40 % al compararla con la silvestre. Al sustituir un segundo Trp (W12F/W193F) mostró sólo una disminución del 20 % en la intensidad de fluorescencia, es decir, la eficiencia cuántica de W12F/W193F es mayor que la del W12F. Este resultado sugiere que el Trp193, se encuentra apagando la fluorescencia de otro Trp, lo que es posible ya que el Trp153 se encuentra muy cercano al Trp159 y, también, es el más expuesto al solvente, de manera que puede perder la fluorescencia al medio. A este respecto, la mutante C14F también presenta un apagamiento de la fluorescencia muy cercano al 40 % (como la mutante W12F). Considerando que el Trp12 es el residuo que más contribuye a la fluorescencia total de la proteína, pensamos que la mutación por Phe en la posición 14 provocó que el Trp12 ahora esté altamente expuesto al solvente por efecto de la monomerización de la enzima.

## 5.9 Efecto del MMTS y DTNB

### 5.9.1 Efecto del MMTS en las enzimas mutantes con alta actividad

Explorando la posibilidad de usar aminoácidos no conservados para producir una inhibición selectiva en enzimas homólogas de diferentes especies, se ha analizado el efecto de la derivatización de residuos de Cys para diferentes especies. El efecto de derivatizantes como el MMTS y DTNB inactiva a las enzimas de tripanosomátidos (que poseen una Cys14), lo cual produce alteraciones estructurales que llevan a la derivatización de residuos de Cys originalmente no expuestos. Sin embargo, estos reactivos que promueven alteraciones en las TIM de los tripanosomátidos afectan poco o nada a las enzimas que poseen un residuo distinto a la Cys en la posición 14. Lo anterior incluye también a la hTIM que posee una Met en esta posición (Gómez-Puyou y col., 1995, Garza-Ramos y col., 1998, Pérez-Montfort y col., 1999).

Considerando que la TIM de *T. brucei* se inhibe en la presencia de estos reactivos, se decidió probar el efecto del MMTS en las enzimas C14A, C14P, C14S, C14T y C14V. Es importante notar que este grupo de enzimas no poseen Cys en la posición 14.

A pesar de que se esperaba que ninguna de estas enzimas fuera susceptible a inhibición por MMTS, los resultados obtenidos mostraron que las enzimas C14P, C14T y C14V pierden la actividad catalítica en presencia de distintas concentraciones de MMTS. Sin embargo, las enzimas C14A y C14S son resistentes aun a las concentraciones más altas de MMTS que se probaron, como se observa en la Figura 16.



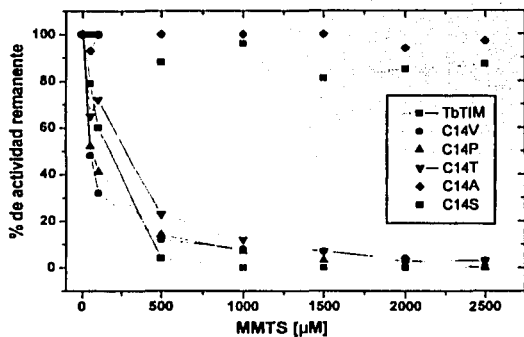


Figura 16. Curvas de inhibición por MMTS en la enzima silvestre y las mutantes con alta actividad. Las enzimas fueron incubadas a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  en amortiguador de TE 100/10, a 25  $^{\circ}\text{C}$ , a diferentes concentraciones de MMTS. La actividad se midió al tiempo 0 y a las 2 h, calculando el porcentaje de actividad remanente.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



Figura 17. Esquema de la estructura de barril  $\alpha/\beta$  de TbTIM. Se muestra la posición de los 3 residuos de cisteína de un monómero. La figura se creó a partir del archivo 5TIM (de la TbTIM) del PDB (Wierenga y col., 1991b).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para poder explicar el comportamiento que observamos en las enzimas mutantes debemos considerar lo siguiente: la TbTIM posee 2 Cys además de la 14: la Cys40 y la Cys126 (Figura 17, página anterior). La Cys40 es un residuo no conservado que forma parte de la hoja- $\beta$ 2. La Cys126 forma parte de la  $\alpha$ -hélice 4 y está estrictamente conservada en todas las especies, a pesar de no ser esencial para la catálisis de la enzima (Silverman y col., 2001). Ambas Cys se encuentran en el interior del barril, lo que las hace inaccesibles al solvente. A este respecto, la yTIM posee dos Cys en las posiciones 42 y 126, equivalentes a las de TbTIM (ver Tabla 8). Como la yTIM es completamente insensible a la acción de los agentes derivatizantes de sulfhidrilo más conocidos, se concluyó que estos residuos de Cys son inaccesibles.

Sin embargo, las enzimas mutantes C14P, C14T y C14V, que también poseen estas dos Cys, mostraron sensibilidad. Esto nos hace pensar que la diferencia observada en los estudios de concentración de la proteína y en la estabilidad térmica en estas enzimas (Figura 13 y Figura 14) se debe quizá a alteraciones de las enzimas probablemente en la región de la interfase. Esto permitiría que los agentes derivatizantes pudieran llegar hasta las posiciones 40 y/o 126 para derivatizar estas Cys. Este razonamiento concuerda con lo observado para las enzimas mutantes C14A y C14S, que son enzimas que mostraron mayor estabilidad y que por consiguiente no sufrieron modificación ante la presencia de MMTS bajo estas condiciones. Por otra parte, la enzima C14F se incubó a 10  $\mu$ g/mL en presencia de 500  $\mu$ M de MMTS durante 2 hrs. Los resultados muestran que C14F se inhibe por MMTS, lo que indica que la monomerización, acompañada de alguna alteración en la proteína, provoca que estos reactivos actúen sobre las otras dos Cys.

Tabla 8. Posición de las cisteínas en la TIM de *T. brucei*, otros parásitos, humano y levadura. De estos residuos de Cys únicamente la Cys126 o 127 es estrictamente conservada en todas las especies.

Organismo	Cisteínas (posición)				
<i>Trypanosoma brucei</i>	14	39			126
<i>Trypanosoma cruzi</i>	15	40	118		127
<i>Leishmania mexicana</i>	15	40	118		127
<i>Plasmodium falciparum</i>	13			196	126 217
<i>Homo sapiens</i>		42	67	87	126 218
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		42			126

En trabajos anteriores se propuso, que la inhibición irreversible por MMTS en la TbTIM y la TcTIM se debía a las alteraciones estructurales de la interfase provocadas en primer lugar por la derivatización del residuo Cys14 (Gómez-Puyou y col., 1995, Garza-Ramos y col., 1998, Pérez-Montfort y col., 1999, Reyes-Vivas y col., 2001). Sin embargo, aún no sabemos que tanto contribuyen la Cys40 y/o Cys126 en el mecanismo de inactivación (ver Perspectivas).

### 5.9.2. Titulación de tioles para TbTIM, C14P, C14T y C14V por DTNB

Para estar seguros que este grupo de enzimas mutantes efectivamente tienen una Cys menos que la silvestre, fue necesario cuantificar el número de Cys por monómero. Se realizaron cuantificaciones espectrofotométricas de residuos tiol, utilizando la reacción

que lleva a cabo el DTNB con grupos sulfhidrilos libres. El número de Cys calculadas para las mutantes C14P, C14T y C14V fue de 2 Cys/monómero y para la silvestre 3 Cys/monómero, tal como esperábamos. Este resultado demuestra que en los experimentos descritos en la sección 5.9.1 las Cys 40 y 126 están reaccionando a pesar de que las enzimas no poseen Cys14 (residuo propuesto como el primero que provee un cambio conformacional para que las otras dos cisteínas puedan reaccionar (Gómez-Puyou y col., 1995).

A este respecto en la TIM de *Plasmodium falciparum* (PFTIM) se realizaron recientemente algunos estudios utilizando reactivos que modifican grupos tioles como yodoacetamida y ácido yodacético seguidos por espectrometría de masas por ionización con electroaspersión, demostrando que el orden en el cual reaccionan las 4 Cys que posee la PFTIM es como sigue: Cys196>Cys13>>Cys217/Cys126. Esto correlaciona con cálculos de la superficie accesible de las Cys determinados a partir de la estructura cristalográfica. La Cys126 y Cys217 son las más inaccesibles y la Cys196 es la más expuesta y la más reactiva. Resulto interesante que la Cys13 que tiene accesibilidad limitada, sufre modificación rápida (Maithal y col., 2002). Sin embargo, para el caso de la TbTIM la modificación puede ser diferente, pues posee menos residuos de Cys que PFTIM, y posee la Cys40 que PFTIM no tiene (ver Tabla 8). En la PFTIM demostraron que la carboximetilación de la Cys13 produce una especie monomérica detectada por filtración en gel (Maithal y col., 2002). A este respecto, en la TIM de *Entamoeba histolytica* que se inactiva completamente por MMTS, se demostró que se disocia en un monómero estable que posee estructura secundaria considerable, similar a lo que sucede en la PFTIM (Rodríguez-Romero y col., 2002)

Avila Rios (tesis de licenciatura 2001) realizó un trabajo en sentido inverso al que se presenta en esta tesis. Eligió las TIMs de levadura y humano, las que ya se había demostrado que son resistentes a la acción de varios derivatizantes de grupo sulfhidrilo. La hTIM posee una Met en la posición 15 y 5 Cys en otras posiciones (ver Tabla 8). Sin embargo, su sensibilidad a reactivos de sulfhidrilo es relativamente baja, al ser la mayoría de éstas inaccesibles al solvente. La yTIM posee una Leu en la posición 13 y es completamente insensible a la acción de algunos agentes derivatizantes (ver Tabla 8) (Garza-Ramos y col., 1998). Por mutagénesis sitio dirigida Avila Rios, produjo las mutantes M15C de hTIM y L13C de yTIM (posiciones equivalentes a la Cys14 de TbTIM), con el propósito de averiguar si esta mutación efectivamente vuelve sensibles a las enzimas a la acción de diferentes derivatizantes de grupo sulfhidrilo. La introducción de Cys en posición equivalente a la 14 resultó ser crítica para la acción de los derivatizantes, volviendo a las enzimas mutantes sensibles a la acción de la mayoría de los compuestos probados, principalmente con compuestos de tamaño mayor que el del MMTS.

Con los resultados obtenidos de inhibición por MMTS de las enzimas mutantes C14A, C14P, C14S, C14T y C14V podemos contestar las preguntas que surgieron al proponer este trabajo (ver antecedentes). Repitiendo las preguntas:

¿Qué podría pasar con la TbTIM si el parásito llegara a mutar la Cys14 por otro aminoácido como un mecanismo de defensa contra un inhibidor especie-específico?,  
¿Alguna mutación en esta posición específica puede producir una enzima igual a la silvestre? y ¿qué características requiere esta sustitución para que pueda funcionar como un residuo de interfase que contribuya a la estabilización del dímero de la TbTIM?

Con el grupo de mutantes que se generaron en este trabajo podemos responder que la C14A y C14S son las mutaciones que en determinado momento podrían ocurrir en el parásito como un mecanismo de adaptación contra un inhibidor especie-específico. No obstante debemos considerar las siguientes observaciones.

#### **Vía neutral de mutación**

Los experimentos que realizamos sustituyendo el aminoácido en la posición 14 indican que este residuo puede ser sustituido por Ala o Ser sin causar ningún cambio estructural en la enzima y además producir una enzima resistente a agentes derivatizantes de grupo sulfhidrilo. Esta son mutaciones que en el parásito pudieran llevar a la adaptación frente a un posible fármaco dirigido contra la Cys14. Además, debemos considerar que existen algunos organismos que presentan Ala y Ser en dicha posición (ver Tabla 4) lo que nos lleva a pensar que los cambios se pudieran dar, puesto que existen en la naturaleza. Por otra parte, hay que considerar que se requieren de dos mutaciones simultáneas para cambiar un codón de Cys a Ala, pasando por un intermediario ya sea de Ser o Gly como se muestra en la Figura 18A. En este caso el intermediario con Gly resultó ser una enzima poco activa e inestable y el intermediario con Ser una enzima activa y estable (pero menos que con Ala) y resistente al MMTS. Por lo tanto para producir la mutación de C14A se requiere que se cambien simultáneamente 2 bases contiguas. Como se muestra en la figura 17A, para cambiar un codón de Cys a Ala pasando por Gly primero debe mutar la primera base (T por G) y después la segunda base (G por C). Para el caso del intermediario con Ser, primero debe mutar la segunda base (G por C) y después la primera base (T por G). A este evento se le ha denominado ausencia de una "vía neutral de mutación" (figura 18B), del que se dice que tiene una probabilidad cercana a cero ya que tiene que pasar por intermediarios menos activos (que serían eliminados en el

proceso de selección). Este evento ya ha sido descrito para la aspartato aminotransferasa de *E. coli* (Gloss y col., 1992 y 1996). Por lo tanto, si consideramos esta teoría, sería muy improbable que el parásito desarrolle resistencia por este mecanismo a un fármaco dirigido contra la Cys14, si pasa por el intermediario de Gly. Pero si utiliza el intermediario de Ser la probabilidad aumenta. Para el segundo caso, es importante mencionar que la enzima mutante C14S pierde hasta un 50 % de actividad incubando a 10 µg/mL de proteína durante 2 h a 37 °C. Considerando que 37 °C es la temperatura media del cuerpo humano, es posible que tampoco sea un buen intermediario.

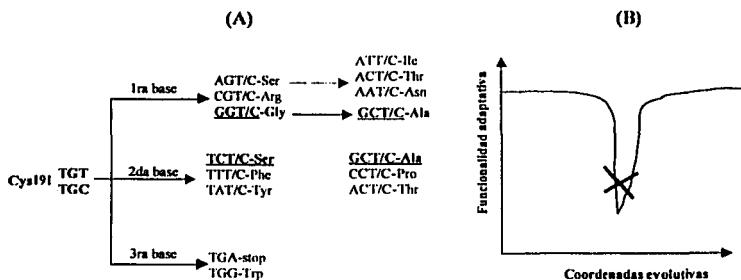


Figura 18. El esquema en (A) muestra los posibles cambios que se tienen que dar para que un codón de Cys cambie a Ala pasando por un intermediario de Gly o Ser. En (B) se muestra un gráfico hipotético sobre la teoría de la "vía neutral de mutación" en las proteínas. La X representa la inaccesibilidad de intermediarios menos funcionales para que las proteínas evolucionen (tomada de Gloss y col., 1992).



## 6. CONCLUSIONES

Nuestros datos indican que la sustitución de C14A, C14P, C14S, C14T y C14V no afecta la actividad catalítica de la enzima. Encontramos que dichas sustituciones poseen como característica común un aminoácido con un tamaño e hidrofobicidad similar a la Cys, lo que permite obtener enzimas activas. Si se modifica alguna de estas características se obtienen enzimas sin o con poca actividad.

Otros datos indican que de este grupo de enzimas mutantes sólo C14A y C14S presentan constantes de disociación iguales a la silvestre. Sin embargo, en cuanto a su estabilidad térmica sólo la enzima C14A presenta un  $\Delta T_m$  de 1°C menor en comparación con la enzima silvestre y para las enzimas C14P, C14S, C14T y C14V el  $\Delta T_m$  es cercano a los 3°C.

Experimentos con la enzima mutante C14F demuestran que la enzima se comporta como monómero estable.

La relación entre la estabilidad del dímero y la catálisis también se demuestra en el comportamiento de las enzimas mutantes C14G y C14N.

## 7. PERSPECTIVAS

La TbTIM presenta además de la Cys14, la Cys40 y Cys126, de las cuales se desconoce su función. Ambas Cys se localizan al interior de la proteína por lo que son inaccesibles al solvente. En este trabajo, encontramos que las enzimas mutantes C14P, C14T y C14V se inhiben por el efecto del MMTS. Estos resultados nos demuestran que la Cys40 y Cys126 están reaccionando a pesar de no poseer la Cys14. Estos resultados dejan abierta varias vías de exploración para el estudio de estas 2 Cys.

El alineamiento de secuencias de la TIM de más de 81 especies indica que la Cys40 es un aminoácido no conservado, e incluso en algunas especies se encuentra en posiciones no equivalentes, mientras que, la Cys126 está estrictamente conservada en todas las especies. Por lo que, el estudio de la contribución o participación de la Cys126, aportaría, además, nuevos elementos para tratar de explicar en términos evolutivos, la presencia de este residuo estrictamente conservado y no esencial para la catálisis.

Por otra parte, las mutantes C14P, C14T y C14V, que fueron sensibles a la inhibición por reactivos que modifican grupos sulfhidrilos, son buenos modelos para establecer un mecanismo detallado cinético y estructural de la inhibición de la TbTIM producido por este tipo de agentes (estos reactivos son la base para la síntesis de un inhibidor especie-específico dirigido a los tripanosomátidos).

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

**Ackers, G. K.,** (1967) Molecular sieve studies of interacting protein systems. I. Equations for transport of associating systems. *J. Biol. Chem.* **242**, 3026-3034.

**Albery, W. J. y Knowles, J. R.** (1976) Evolution of enzyme function and development of catalytic efficiency. *Biochemistry* **15**, 5631-5640.

**Alvarez, A., Zeelen, J. Ph., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K. and Maes, D.** (1998) Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. *J. Biol. Chem.* **273**, 2199-2206.

**Avila Rios, S.,** (2001) Purificación y caracterización de las triosafosfato isomerasas mutantes de humano y levadura con una cisteína en la posición 14. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

**Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Willson, I. A., Conan, P. H., Furth, A. J., Milmar, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D. and Waley, S. G.** (1975) Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**, 609-614.

**Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D. and Knowles, J. R.** (1988) Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry* **27**, 1158-1167.

**Borchert, T.V., Pratt, K., Zeelen, J., Callens, M., Noble, M. E. M, Opperdoes, F. R., Michels, P. A. M. and Wierenga, R. K.** (1993) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur J Biochem.* **211**, 703-710.

- Borchert, T.V., Abagyan, R., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1994)** Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 1515-1518.
- Borchert, T.V., Kishan, R.K.V., Zeelen, J.P., Schliebs, W., Thanki, N., Abagyan, R., Jaenicke, R., and Wierenga, R.K. (1995a)** Three new crystal structure of point mutation variants of monoTIM: conformational flexibility of loop-1, loop-4 and loop-8. *Structure* *5*, 669-679.
- Borchert, T. V., Zeelen, J. P., Schliebs, W., Callens, M., Minke, W., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1995b)** An interface point-mutation variant of triosephosphate isomerase is compactly folded and monomeric at low protein concentrations. *FEBS Lett.* *367*, 315-318.
- Chávez-Cárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincon, G., and Pérez-Montfort, R. (2002)** Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* *399*, 117-129.
- Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A. and Ringe, D. (1991)** Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry* *30*, 5821-5826.
- Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M. D., Martial, J. A. and Hol, W. G. J. (1995)** Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Science* *4*, 2594-2604.

**Ellman, G. L.** (1958) A calorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 443-450.

**Gao, X. G., Maldonado, E., Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. and Rodríguez-Romero, A.** (1999) Cristal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10062-10067.

**Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R. and Gómez-Puyou, A.** (1998) Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity. Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem.* 253, 684-691.

**Gloss, L. M., Planas, A., and Kirsch, J. F.** (1992) Contribution to catalysis and stability of the five cysteines in *Escherichia coli* aspartate aminotransferase. Preparation and properties of a cysteine-free enzyme. *Proteins* 31, 32-39.

**Gloss, L. M., Spencer, D. E., and Kirsch, J. F.** (1996) Cysteine-191 in aspartate aminotransferase appears to be conserved due to the lack of a neutral mutation pathway to the functional equivalent, alanine-191. *Proteins Struct Funct Genet.* 24, 195-208.

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

**Hernández-Alcántara, G.** (2000) Mutagénesis exhaustiva de la cisteína 14 de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.

- Jaenicke, R.** (1987) Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237.
- Joseph, D., Petsko, G. A. and Karplus, M.** (1990) Anatomy of a conformational change: of the K12M/G14A triosephosphate isomerase double mutant and electrostatic analysis of the active site. *Biochemistry* **33**, 2815-2823.
- Juers, D. H. J., Huber, R. and Matthews, B. W.** (1999) Structural comparisons of TIM barrel proteins suggest functional and evolutionary relationships between  $\beta$ -galactosidase and other glycohydrolases. *Protein Sci.* **8**, 122-136.
- Jurgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M and Sterner, R.** (2000) Directed evolution of a  $(\alpha\beta)_8$ -barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9925-9930.
- Knowles, J. R. and Albery, W. J.** (1977) Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase. *Act. Chem. Res.* **10**, 105-111.
- Knowles, J. R.** (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* **350**, 121-124.
- Kohlhoff, M., Dahm, A. and Hensel, R.** (1996) Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic archaea. *FEBS lett.* **383**, 245-250.
- Komives, E. A., Chang, L. C., Lolis, E., Tilton, R. F., Petsko, G. A. and Knowles, J. R.** (1991) Electrophilic catalysis in triosephosphate isomerase: the role of histidine-95. *Biochemistry* **30**, 3011-3019.
- Kuwajima, K.** (1995) Circular dichroism, chapter 5. En: *Protein stability and folding*. Humana Press (Ed). P 115-137.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C. and Pestko, G. A.** (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **29**, 6609-6618.

- Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A. and Hol, W. G. J.** (1994) Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase related human genetic disorders and comparison with the tripanosomal enzyme. *Protein Science* 3, 810-821.
- Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frère, J-M., Mande, S.C., Hol, W.G.J., Martial, J.A. and Goraj, K.** (1996) Tree hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* 257, 441-456.
- Maithal, K., Ravindra, G., Balaram, H., and Balaram, P.** (2002) Inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by chemical modification of an interface cysteine: electrospray ionisation mass spectrometric. Analysis of differential cysteine reactivities. *J Biol Chem.* 277, 25106-25114.
- Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Pérez-Montfort, R.** (1998) Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* 283, 193-203.
- Mattos, C., and Ringe, D.** (1996) Locating and characterizing binding sites on proteins. *Nat. Biotechnol.* 14, 595-599.
- Nagano, N., Oregon, C. A. and Thornton, J. M.** (2002) One fold with many functions: The evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.* 321, 741-765.
- Noble, M. E. M., Zeelen, J. Ph., Wierenga, R. K. Manfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A. C. and Martial, J. A.** (1993a) Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallog.* D49, 403-417.

**Noble, M. E. M., Zeelen, J. Ph. and Wierenga, R. K. (1993b)** Structures of the "open" and "closed" state of trypanosomal triosephosphate isomerase, as observed in a new crystal form: implications for the reaction mechanism. *Proteins* *16*, 311-326.

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

**Pompliano, D. L., Peyman, A. and 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.

**Putman, S. J., Coulson, A. F. W., Farley, I. R. T. Riddleston, B. and Knowles, J. R. (1972)** Specificity and kinetics of triosephosphate isomerase from chicken muscle. *Biochem. J.* *129*, 301-310.

**Reardon, D. and Farber, G. K. (1995)** The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *FASEB J.* *9*, 497-503.

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

**Richard, J. P. (1991)** Kinetic parameters for the elimination reaction catalyzed by triosephosphate isomerase and an estimation of the reaction's physiological significance. *Biochemistry* *30*, 4581-4585.



- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., Yauner, P. L., Kornhauser, A. and Fernández-Velasco, D. A. (2002) Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* *322*, 669-675.**
- Rose, I. A., Fung, W. J. and Warms, J. V. B. (1990) Proton diffusion in the active site of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* *29*, 4312-4317.**
- Rozovsky, S., and McDermott, A, E. (2001) The time scale of the catalytic loop motion in triosephosphate isomerase. *J Mol. Biol.* *310*, 259-270.**
- Saab-Rincón, G., Juárez, V. R., Osuna, J., Sánchez, F. And Soberón, X. (2001) Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein Eng.* *14*, 149-155.**
- Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R., and Wierenga, R. K. (1996) Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (mono TIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Sci.* *5*, 229-239.**
- Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., and 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.**
- Silverman, J. A. Balakrishnan R., and Harbury, P. B. (2001) Reverse engineering the ( $\alpha/\beta$ ) 8 barrel fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 3092-3097.**
- Smith, D. J., Maggio, E. T., and Kenyon, G. L. (1975) Simple alkanethiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes. *Biochemistry* *14*, 766-771.**
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallian, A. K., Gartner, F. H., Provezano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* *150*, 76-85.**

**Sun, J. and Sampson, S. N. (1999)** Understanding protein lids: Kinetic analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* *38*, 11474-11481.

**Télez-Valencia, A., Ávila-Ríos, S., Pérez-Montfor, R., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., López-Calahorra, F. And Gómez-Puyou, A. (2002)** Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *BBRC* *295*, 958-963.

**Terwisscha van Scheltinga, A. C., Hennig, M. and Dijkstra, B. W. (1996)** The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *J. Mol. Biol.* *262*, 243-257.

**Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P. and Murthy, M. R. N. (1997)** Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* *5*, 751-761.

**Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J. M., Siebers, B., Hensel, R. and Taylor, G. L. (2001)** Tiny TIM: A small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* *306*, 745-757.

**Wierenga, R.K., Noble, M.E.M., Vriend, G., Nauche, S. and Hol, W.G.J. (1991a)** Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J. Mol. Biol.* *220*, 995-1015.

**Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Postma, J. P. M., Groendijk, H., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. and Opperdoes, F. R. (1991b)** The crystal structure of the "open" and the "closed" conformation of the flexible loop of trypanosomal triosephosphate isomerase. *Proteins* *10*, 33-49.

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

**Williams, J. C. and McDermott, A. E. (1995)** Dynamic of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated. *Biochemistry* **34**, 8309-8319.

**Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vried, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A-M. and Wierenga, R. K. (1999)** Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* **12**, 243-250.

**Xiang, J., Sun, J. and Sampson, N. S. (2001)** The importance of hinge sequence for loop function and catalytic activity in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **307**, 1103-1112.

**Zhang, Z., Sugio, S., Komives, E. A., Liu, K. D., Knowles, J. R., Petsko, G. A. and Ringe, D. (1994)** Crystal structure of recombinant chicken triosephosphate isomerase – phosphoglydoloxyhydroxamate complex at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* **33**, 2830-2837.

## 9. APÉNDICE

El apéndice 0 muestra el artículo producto de este trabajo de tesis.

Gloria Hernández-Alcántara, Georgina Garza-Ramos, Guillermo Mendoza Hernández, Armando Gómez-Puyou, and Ruy Pérez-Montfort. (2002) Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry* 41, 4230-4238.

El apéndice I muestra algunos resultados en los que se estudia la derivatización de la Cys14 de TbTIM y TcTIM y la relación entre el sitio catalítico y la interfase del dímero. En este trabajo se muestran algunos resultados del efecto del MMTS de la enzima mutantes C14S producto de esta tesis.

Ruy Pérez-Montfort, Georgina Garza-Ramos, Gloria Hernández-Alcántara, Horacio Reyes-Vivas, Xiu-gong Gao, Ernesto Maldonado, Marieta Tuena de Gómez-Puyou, and Armando Gómez-Puyou. (1999) Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry* 38, 4114-4120.

El apéndice II muestra una revisión bibliográfica sobre los avances y métodos que se están utilizando para el diseño de fármacos contra *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*.

Titulada: En busca de nuevos fármacos contra algunos tripanosomátidos. Publicación en prensa, en la Revista de Educación Bioquímica (REB).

## Catalysis and Stability of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei* with Different Residues at Position 14 of the Dimer Interface. Characterization of a Catalytically Competent Monomeric Enzyme<sup>†</sup>

Gloria Hernández-Alcántara,<sup>‡</sup> Georgina Garza-Ramos,<sup>‡</sup> Guillermo Mendoza Hernández,<sup>‡</sup> Armando Gómez-Puyou,<sup>‡</sup> and Ruy Pérez-Montfort\*<sup>‡,§</sup>

Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70242, 04510 México DF, México, and Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, México

Received October 18, 2001

**ABSTRACT:** In homodimeric triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* (TbTIM), cysteine 14 of each of the two subunits forms part of the dimer interface. This residue is central for the catalysis and stability of TbTIM. Cys14 was changed to the other 19 amino acids to determine the characteristics that the residue must have to yield catalytically competent stable enzymes. C14A, C14S, C14P, C14T, and C14V TbTIMs were essentially wild type in activity and stability. Mutants with Asn, Arg, and Gly had low activities and stabilities. The other mutants had less than 1% of the activity of TbTIM. One of the latter enzymes (C14F) was purified to homogeneity. Size exclusion chromatography and equilibrium sedimentation studies showed that C14F TbTIM is a monomer, with a  $k_{cat}$  ~1000 times lower and a  $K_m$  ~6 times higher than those of TbTIM. In C14F TbTIM, the ratio of the elimination (methylglyoxal and phosphate formation) to isomerization reactions was higher than in TbTIM. Its secondary structure was very similar to that of TbTIM; however, the quantum yield of its aromatic residues was lower. The analysis of the data with the 19 mutants showed that to yield enzymes similar to the wild type, the residue must have low polarity and a van der Waals volume between 65 and 110 Å<sup>3</sup>. The results with C14F TbTIM illustrate that the secondary structure of TbTIM can be formed in the absence of intersubunit contacts, and that it has sufficient tertiary structure to support catalysis.

Triosephosphate isomerase (TIM, EC 5.3.1.1) is a glycolytic enzyme that catalyzes the interconversion between dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and D-glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) (1). At present, more than 100 amino acid sequences of TIMs from a variety of organism are available in the databases and the X-ray structures of TIMs from 12 different species have been determined (2–13). Except for TIMs from thermophilic organisms, which are tetramers (12, 13), all TIMs are composed of two identical subunits. These subunits associate through noncovalent interactions to form a homodimer with a high association constant. The monomers are formed by eight central  $\beta$ -strands and eight  $\alpha$ -helices (numbered 1–8) joined by loops, making TIM a member of the protein family with the ( $\beta/\alpha$ ) barrel

fold. Each monomer contains all the residues that participate in catalysis. Nonetheless, a well-documented property of TIM is that it is catalytically active only in its dimeric form (14, 15).

In all TIMs, the area of the dimer interface comprises a large portion of the enzyme. For example, in TIM from *Trypanosoma brucei* (TbTIM), the area of contact between the two monomers is approximately 1600 Å<sup>2</sup> (4). The dimer interface is formed mainly by loops 1–4. The protruding loop 3 of one subunit docks into a deep pocket formed by loops 1 and 4 of the other subunit and is near the catalytic site. Cys14 in loop 1 is one of the three residues that are fully exposed in the monomer and completely buried in the TbTIM dimer (Figure 1); the other two are Val46 and Thr75 that are in loop 2 and loop 3, respectively. The side chain of Cys14 is surrounded by the residues of loop 3 of the other subunit (Figure 1), which is consistent with data that indicate that the p*K*<sub>a</sub> of the –SH group of the interface Cys14 is higher than that of the same group of the amino acid in solution (16). In the crystallographic structure of TbTIM, the side chain of Cys14 is hydrogen-bonded to Gly72 of the other subunit, and less than 0.38 nm from Ser71, Glu77, Val78, and Ser79 of loop 3 of the other monomer (17).

The residue at position 14 is a nonconserved amino acid. In TIMs from some pathogenic parasites, residue 14 is Cys, whereas in TIMs from other species, including *Ilomopsis sapiens*, position 14 is occupied by a different amino acid,

<sup>†</sup> Supported by DGAPA-UNAM Grant IN-200600 and CONACYT Grant G27551M. G.H.-A. is the recipient of a fellowship from CONACYT.

\* To whom correspondence should be addressed. Telephone: (52) 55 56225657. Fax: (52) 55 56225630. E-mail: montfort@ifisid.unam.mx.

<sup>‡</sup> Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>§</sup> Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>†</sup> Abbreviations: CD, circular dichroism; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; GAP, D-glyceraldehyde 3-phosphate;  $M_r$ , relative molecular mass; PCR, polymerase chain reaction; SCM, spectral center of mass;  $R_s$ , Stokes radius; TBA, triethanolamine; TIM, triosephosphate isomerase; TbTIM, triosephosphate isomerase from *T. brucei*.

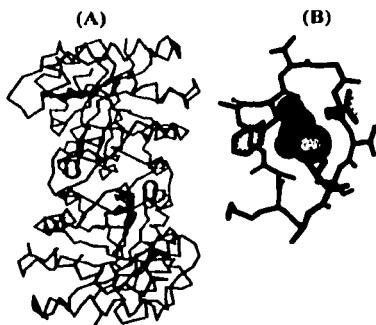


FIGURE 1: Relative position of Cys14 and the subunits of TbTIM (A) and packing of Cys14 of one subunit with the residues of loop 3 from the other subunit (B). (A) The  $\alpha$ -carbon traces of subunits A and B are shown in red and green, respectively, and a CPK depiction of Cys14 from both subunits is shown in yellow. (B) Cys14 is shown as a stick model, and the residues of loop 3 from the other subunit are shown as sticks. The color coding for the elements is as follows: gray for H and C, blue for N, red for O, and yellow for S. The three-dimensional coordinates are from PDB entry 5TIM.

the most common being Met and Leu, followed by Ser, Thr, Glu, and Ala. In TbTIM and TIMs from *T. cruzi* and *Leishmania mexicana*, Cys14 is the only cysteine that forms part of their dimer interfaces. The incubation of the trypanosomal enzymes with sulfhydryl reagents brings about large structural changes and abolition of catalysis, which results from the derivatization of Cys14 by the sulfhydryl reagents (17, 18). In addition to trypanosomal TIMs, the pathogenic parasites *Entamoeba histolytica* (19), *Plasmodium falciparum* (20), and *Giardia lamblia* (21) have the interface Cys. Therefore, this region of the interface has received considerable attention as a potential target for the design of drugs that specifically perturb the association between monomers of the parasite enzymes (17, 18, 22, 23).

In this work, we have further studied the contribution of Cys14 to the stability and activity of TbTIM. We performed exhaustive mutagenesis of Cys14 of TbTIM to investigate which amino acids can replace the interface Cys and, thus, establish the characteristics that an amino acid in that position must have to yield catalytically competent enzymes. Only a limited number of mutant enzymes exhibited activities and stabilities similar to those of wild-type TbTIM. We also found that a point mutation, the substitution of Cys14 with Phe, yields a stable monomeric variant of TbTIM that exhibits substantial catalytic activity.

## MATERIALS AND METHODS

**Construction of the Cys14 Mutants.** The substitution of Cys at position 14 with the other 19 amino acids in TbTIM was accomplished with the polymerase chain reaction (PCR) using the Expand High Fidelity PCR System (Boehringer). The mutagenic oligonucleotides were 5'AACTGGAAG-NNNAACGGCTCC3' [C14V, C14F, C14I, C14S, C14Y, C14P, and C14K forward (Fw)] and 5'GGAGCCGTTNNN-

C1TCCAGT13' [C14V, C14F, C14I, C14S, C14Y, C14P, and C14K reverse (Rv)] (where N is A, C, G, or T), 5'AACTGGAAGVNNAAACGGCTCC3' (C14T, C14H, C14Q, C14N, C14D, C14E, C14R, and C14C Fw) and 5'GGAGCCGTTNNBCTTCCAGT13' (C14T, C14H, C14Q, C14N, C14D, C14E, C14R, and C14G Rv) (where V is A, C, or G and B is T, G, or C), 5'AACTGGAAGGGCGAACGGCTCC3' (C14A Fw) and 5'GGAGCCGTTCCGCTTCCAGT13' (C14A Rv), 5'AACTGGAAGATCAACGGCTCC3' (C14I Fw) and 5'GGAGCCGTTGATCTTCCAGT13' (C14I Rv), and 5'AACTGGAAGTGGAAACGGCTCC3' (C14W Fw) and 5'GGAGCCGTTCCACTTCCAGT13' (C14W Rv). The external oligonucleotides were the T7 promoter and T7 terminator (Novagen). The respective mutations were introduced as follows: 30 cycles for 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 1 min at 72 °C and incubation for 10 min at 72 °C. The genes were cloned in the pCR 2.1 vector (Invitrogen) and sequenced. Once the genes with the appropriate mutation were identified, they were sequenced completely, subcloned into the pET-3a expression vector as *Nde*I fragments, and introduced by transformation into BL21(DE3)pLysS cells (Novagen).

**Growth of the Cells and Protein Expression.** For expression of the mutant proteins, cells were grown at 37 °C in Luria-Iertani medium supplemented with 100  $\mu$ g/ml ampicillin and 34  $\mu$ g/ml chloramphenicol. When cultures reached an  $A_{600}$  of 0.6, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside at a final concentration of 0.4 mM was added. Growth was continued overnight at 37 °C for cells with wild-type TbTIM and the C14V mutant, or at 30 °C for the rest of the mutants. BL21(DE3)pLysS cells transformed with C14F and C14K were induced at 21 °C. The growth of the cells containing the C14F mutant was continued for 3 h.

**Purification of Enzymes.** Cultures (250 mL) were collected by centrifugation and suspended in 10 mL of cell lysis buffer (25 mM Mes/NaOH) (pH 6.5), 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, and 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. The suspensions were sonicated (five intervals of 45 s) and centrifuged at 15 000 rpm for 15 min. The pellet was suspended in lysis buffer, which in addition had 200 mM NaCl, gently stirred on ice for 30 min, and centrifuged for 15 min at 15 000 rpm (24). The latter supernatant was used for an assay of activity and for determining the relative abundance of TIM concentration by SDS-PAGE analysis, Coomassie blue staining, and densitometry.

The purification of wild-type TbTIM and the mutants C14A, C14P, C14S, C14T, C14V, and C14G was carried out following the methodology described by Borchert et al. (24). The C14F mutant was purified as follows. Cells were lysed by passing them three times through a French press in 25 mM Mes/NaOH (pH 6.5), 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, and 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. The lysate was centrifuged at 15 000 rpm for 15 min. The pellet was suspended in lysis buffer with 200 mM NaCl, stirred at 4 °C for 18 h, and centrifuged at 15 000 rpm for 15 min. The supernatant was dialyzed exhaustively against 25 mM triethanolamine (TEA) (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and 1 mM sodium azide. The protein was loaded onto a carboxymethyl-Sepharose fast flow column, equilibrated with the same buffer. Protein was eluted with a gradient of 0 to 150 mM NaCl. In all the steps of the purification, catalytic activity and SDS-PAGE analysis using

Coomassie blue staining and densitometry were carried out. C14N was only partially purified. For this enzyme, we followed the procedure (24) up to the step in which it was precipitated with ammonium sulfate.

**Activity Assays.** Enzyme activity was determined at 25 °C by following the decrease in absorbance at 340 nm of a mixture that contained 100 mM TEA and 10 mM EDTA (pH 7.4), 1 mM GAP, 0.2 mM NADH, and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (20 µg/mL). Except where specified, the reaction was initiated by the addition of TIM at the indicated concentration (25). For the determination of  $K_m$  and  $V_{max}$ , the concentration of GAP was varied over a concentration range of 0.06–2 mM. The  $K_m$  and  $V_{max}$ , in the direction of DHAP to GAP, were determined at 25 °C in a mixture of 0.2 mL that contained 100 mM TEA, 10 mM EDTA (pH 7.4), 1 mM NAD, 4 mM arsenate, 120 µM dithiothreitol, 1 unit of GAP dehydrogenase, and 0.3–10 mM DHAP.

**Methylglyoxal Formation.** Methylglyoxal formation was monitored at a single substrate concentration using the method of Richard (26). The enzyme concentration was 18 µM, and the [<sup>14</sup>C]DHAP concentration was 0.5 µM. Time points were collected over the course of 20 h.

**Stability to Dilution.** Different concentrations of TbTIM mutants were incubated for 24 h at 25 °C in 100 mM TEA and 10 mM EDTA (pH 7.4). The catalytic activity was measured by adding an aliquot of the sample to the reaction mixture, yielding a final enzyme concentration of 5 ng/mL. The curves of remaining activity versus protein concentration were used to calculate the dissociation constant ( $K_d$ ) of the wild type and five mutants according to the formulations derived by Mainfroid et al. (27). The following equation was used to calculate the  $K_d$ :

$$SpA = SpA_{max} [4E_0 + K_d - (RE_0K_d + K_d^2)^{1/2}] / 4E_0 \quad (1)$$

where SpA is the specific activity, SpA<sub>max</sub> the maximum specific activity, and  $E_0$  the total monomer concentration. This model assumes that the dimer is the only active species.

**Circular Dichroism Spectroscopy.** Circular dichroism (CD) spectra were obtained at 25 °C with an AVIV (Lakewood, NJ) 62 HDS spectropolarimeter. The quartz cells had path lengths of 0.1 and 1.0 cm for measurements in the far-UV and near-UV regions, respectively. For determination of the spectra, solutions of the enzymes were equilibrated against a 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 20 mM NaCl. Each spectrum was the average of five repetitive scans and was corrected by subtracting the average spectrum of the buffer.

**Thermal Unfolding.** Thermal denaturation of the enzymes was assessed by recording protein ellipticity at 222 nm in the range between 20 and 70 °C. The temperature of the samples was increased at a rate of 1 °C/2.5 min. For the experiments, proteins (400 µg/mL) were previously dialyzed against a 20 mM MOPS buffer (pH 7.0) that included 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and 1 mM azide. Denaturation was irreversible in all samples. From the data, the apparent fraction of denatured subunits ( $f_D$ ) was calculated using the equation

$$f_D = (y_N - y)/(y_N - y_D) \quad (2)$$

where  $y_N$  and  $y_D$  are the ellipticity values characteristic of the native and unfolded subunits, respectively. The two parameters were linear extrapolations from the initial and final portions of the curve of  $y$  versus temperature.

**Fluorescence Measurements.** The emission fluorescence spectra of wild-type TbTIM and C14F TbTIM were recorded between 300 and 400 nm at an excitation wavelength of 280 nm with a Shimadzu RF-5000U spectrofluorometer. Their protein concentration was 50 µg/mL in 100 mM TEA and 10 mM EDTA (pH 7.4). The spectrum of the buffer was subtracted from the experimental. The spectral center of mass (SCM) of each spectrum was calculated according to the equation

$$SCM = \sum \lambda I(\lambda) / \sum I(\lambda) \quad (3)$$

where  $I(\lambda)$  is the fluorescence intensity at wavelength  $\lambda$ .

**Molecular-Sieve Chromatography.** The oligomeric state of C14F was studied by zone size exclusion chromatography using a Beckman HPLC system with a 7.5 mm × 300 mm UltraSpherogel-SEC 3000 column, with a pore size of 230 Å [relative molecular mass ( $M_r$ ) range of  $5 \times 10^3$  to  $7 \times 10^5$  Da]. The mobile phase contained 100 mM sodium phosphate (pH 7.0), 1 mM EDTA, and 150 mM NaCl. Before injection, samples were filtered through a 0.22 µm filter and eluted at a flow rate of 1 mL/min. The protein profile was monitored at 280 nm. Stokes radius ( $R_s$ ) determinations were performed using well-characterized globular protein standards with known  $R_s$  values as described by Ackers (28). For comparison, wild-type TbTIM was also analyzed.

**Sedimentation Analysis.** Experiments were performed using an analytical ultracentrifuge equipped with scanner optics (Optima model XL-A, Beckman, Fullerton, CA). The protein sample solution was exhaustively dialyzed at 4 °C against 0.1 M TEA-HCl buffer (pH 7.4) that contained 1 mM dithiothreitol and 10 mM EDTA. A portion of the dialysate was retained and used as the reference solution. The protein samples were placed in cells fitted with conventional aluminum-filled Epon double-sector centerpieces and quartz windows. Sedimentation velocity experiments at an enzyme concentration of 0.4 mg/mL were performed at 40 000 rpm. The sedimentation coefficient was corrected for temperature (20 °C) and water viscosity ( $\nu_p = 0.7468$  mL/g,  $\rho_w = 1.019$  g/mL). The scans were analyzed using the SVEDBERG data analysis software (Amgen, Inc.) developed by Philo (29). Sedimentation equilibrium experiments were carried out at 15 000 and 18 000 rpm at 20 °C. Scans were taken at 280 nm, with a spacing of 0.001 cm, in a step scan mode at intervals of 4 h. Sedimentation equilibrium was judged to have been reached when the difference in concentration distributions between consecutive scans was zero. Data sets were analyzed using the nonlinear regression program NONLIN (30). The program fits to a reduced apparent molecular mass, via the relation  $\omega = [M(1 - \nu\rho)\omega^2]/(RT)$ , where  $M$  is the molecular mass,  $\nu$  is the partial specific volume,  $\rho$  is the solvent density,  $\omega$  is the radial velocity,  $R$  is the gas constant, and  $T$  is the absolute temperature (kelvin).

**Other Assays.** Protein concentrations of the enzymes were determined with the BCA Protein Assay Kit (Pierce) and

Table 1: Specific Activities and Relative Abundance of Wild Type TbTIM and the 19 Cys14 Mutants\*

	specific activity (units/mg)	relative abundance (%)
wild type	2858	100
C14T	3680	105
C14A	3624	99
C14P	2575	99
C14V	2531	94
C14S	2583	85
C14N	556	85
C14R	537	83
C14G	157	86
C14F	23	69
C14K	22	32
C14D	18	54
C14H	6	35
C14E	6	44
C14I	6	46
C14W	6	17
C14Y	5	50
C14Q	4	50
C14L	2	26
C14M	1	23

\* Activity and protein were measured in the supernatant obtained after salt extraction of the particulate fraction (see Materials and Methods). The specific activities are shown. The relative abundance of the enzymes was calculated after scanning SDS-PAGE gels stained with Coomassie blue. The gels were loaded with 10  $\mu$ g of protein. The intensity of the band obtained with wild-type TbTIM was considered 100%. Note that the abundance of some enzymes, particularly those with low activity, was significantly lower than in the control. However, the lower abundance would not account for their very low levels of specific activity.

by their absorbance at 280 nm using a molecular extinction coefficient ( $\epsilon_{280}$ ) of 34 950 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (22).

## RESULTS

Cys14 of TbTIM was exhaustively substituted by site-directed mutagenesis. All 19 mutant enzymes were cloned and expressed in *Escherichia coli*. The initial steps of purification of wild-type TbTIM involve centrifugation of the cell lysate, and extraction of the enzyme from the particulate fraction with buffer that has a high salt concentration (24). We followed this procedure with all proteins. Their specific activities and relative abundance are shown in Table 1. The latter was inferred from Coomassie blue staining of SDS gels loaded with 10  $\mu$ g of protein. Five mutants (T, A, P, V, and S) had essentially wild-type activity; these will be termed "high-activity mutants". Three mutants (N, R, and G) exhibited between 10 and 20% of the specific activity of wild-type TbTIM. The remaining 11 mutants exhibited activities of less than 1% of the wild-type activity (Table 1). It is noted that, at this stage of purification, the activity traces of mutants C14N, C14R, and C14G were not linear; instead, there was a progressive decay of activity during the time of recording. The activities shown correspond to those observed in the first minute of the reaction (see below).

**Purification of the High-Activity Mutants, C14G TbTIM, and C14F TbTIM.** We purified to homogeneity and characterized all the high-activity mutants and one of the mutants (C14G) with intermediate activity. The yield of these enzymes was similar to that of the wild type (60–80 mg/L of culture). We also purified C14F TbTIM (one of the mutants with low activity) to homogeneity. After purification,

Table 2: Kinetic Constants of Wild-Type TbTIM and the Indicated Cys14 Mutants\*

	$K_m(\text{DHAP})$ (mM)	$k_{cat}(\text{DHAP})$ (min <sup>-1</sup> )	$K_m(\text{DHAP})$ (mM)	$k_{cat}(\text{DHAP})$ (min <sup>-1</sup> )
wild type	0.35 $\pm$ 0.05	(2.6 $\pm$ 0.13) $\times 10^3$	1.9	2.7 $\times 10^4$
C14A	0.43	3.1 $\times 10^3$	1.7	2.8 $\times 10^4$
C14P	0.33	2.2 $\times 10^3$	1.1	2.2 $\times 10^4$
C14S	0.5	3.0 $\times 10^3$	1.9	2.8 $\times 10^4$
C14T	0.32	2.3 $\times 10^3$	1.3	1.4 $\times 10^4$
C14V	0.42	2.4 $\times 10^3$	1.5	2.5 $\times 10^4$
C14F	3.6 $\pm$ 1.3	114 $\pm$ 23	5.2	9

\* The measurements were made with dihydroxyacetone phosphate (DHAP) in the range of 0.325–10 mM; for glyceraldehyde 3-phosphate (GAP), the substrate concentrations were between 0.06 and 2 mM. The reaction was started by addition of the enzyme. With all enzymes, except C14F, 100 ng/mL was used in the direction of DHAP to GAP and 5 ng/mL in the opposite direction; with C14F, the reactions were assayed with 100 and 200  $\mu$ g/mL enzyme, respectively.  $K_m$  and  $k_{cat}$  were calculated from nonlinear regression plots. The values for the C14A, C14P, C14S, C14T, and C14V mutants in the direction of GAP to DHAP are the average of two experiments, and the values of  $K_m$  and  $k_{cat}$  differed by less than 10%. With DHAP as the substrate, only one experiment was carried out. For the wild type, we took the average of five different preparations  $\pm$  standard error; the data for C14F are the average of four experiments  $\pm$  standard error.

all the previous enzymes exhibited a single protein band in SDS gels loaded with 10  $\mu$ g of protein and stained with Coomassie blue (data not shown). Due to the tendency of C14F TbTIM to aggregate, the purification required some modifications of the standard method (see Materials and Methods) and the yield was  $\sim$ 90% lower. One feature of this mutant is that it underwent aggregation at concentrations higher than 2 mg/mL. C14N TbTIM was purified up to the step in which it is precipitated with 65% saturation ammonium sulfate. We attempted to purify the C14M and C14L enzymes, but we were unsuccessful; the enzymes exhibited a strong tendency to undergo aggregation.

**Kinetic Properties of Mutant Enzymes.** The steady-state kinetics of the wild type and the high-activity mutants were determined in the forward (DHAP to GAP) and backward (GAP to DHAP) directions (Table 2). With the two substrates, the  $K_m$  and  $k_{cat}$  values of TbTIM and the high-activity mutants were strikingly similar. In the C14F mutant, the catalytic constants in the forward and backward directions were  $\sim$ 3000- and  $\sim$ 1000-fold lower than in wild-type TbTIM, respectively; the  $K_m$  values for GAP and DHAP were 6 and 3 times higher, respectively, than in the wild type. The  $K_i$  value for the competitive inhibitor 2-phosphoglycolate was nearly 3 times higher in C14F TbTIM ( $K_i = 0.076 \pm 0.008$  mM) than in wild-type TbTIM ( $K_i = 0.024$  mM).

With the wild type and the C14A, C14P, C14S, C14T, and C14V mutants, the activity traces with 5 ng of protein were linear. The same linearity was observed with C14F; it is noted that due to the low activity of this enzyme, microgram quantities were used for activity assays (Table 2). On the other hand, the C14G and C14N mutants exhibited a progressive decay of activity during the time of recording. The experiments shown in Figure 2 illustrate this behavior. Mutants C14G and C14N were incubated at concentrations of 1.3 and 0.05  $\mu$ g/mL, respectively. At different times, the coupling enzyme and substrate were added to initiate catalysis. With C14G,  $\sim$ 15% of the activity remained after incubation for 2 min. With C14N, an incubation of 1 min sufficed to induce almost total abolition of activity. This

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

077



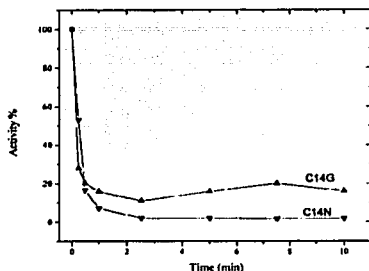


FIGURE 2: Inactivation of C14G and C14N TbTIMs. C14G and C14N had been stored at concentrations of 1.3 and 1.5 mg/mL, respectively. At the time of the experiments, 1.3  $\mu\text{g}$  of C14G TbTIM or 0.05  $\mu\text{g}$  of C14N TbTIM was introduced into spectrophotometer cells that contained 1 mL of 100 mM TEA and 10 mM EDTA (pH 7.4). At the indicated times, the reagents required for assay of activity (GAP, NADH, and  $\alpha$ -glycerolphosphate dehydrogenase) were added and activity was recorded. The data that are shown correspond to the first minute of reaction time. The results are expressed as a percentage of activity; 100% corresponds to the activity observed when the enzymes were introduced to the complete reaction mixtures. The 100% values were 27.2 and 670.5  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  for the C14G and C14N mutants, respectively. With wild-type TbTIM, no significant changes in activity were detected after its incubation for 10 min at a concentration of 5 ng/mL (4027  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). Note that the C14G mutant that was used had been purified to homogeneity and that C14N TbTIM had only been purified up to the step in which it was precipitated with 65% saturation ammonium sulfate.

behavior precluded the measurements of their kinetic constants under steady-state conditions, and most probably indicates that dimeric C14G and C14N TbTIMs have low association constants. A similar phenomenon has been reported for point mutation variants of TIM that have low dimer stability (24, 27, 31). In this context, it is pointed out that, because of the rapid decay of activity that occurs during the measurements, it is likely that the activities of the intact dimers are higher than those that were detected.

**Methylglyoxal Formation.** Relative to the isomerization reaction, the elimination reaction catalyzed by TIM (using [ $^{125}\text{I}$ ]DHAP) is slow. We could only observe it under conditions in which the enzyme concentration was higher than that of the substrate (26). The rate of P<sub>i</sub> elimination by the high-activity mutants was approximately the same as that of wild-type TbTIM, 1.24–3.5  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . For wild-type TbTIM and the high-activity mutants, the ratio of the rate constants of the isomerization and elimination reactions,  $k_i/k_{el}$  ( $k_{el}/K_m$ )<sub>DHAP</sub>, corresponds to less than one methylglyoxal per 10<sup>3</sup> turnovers. In the C14F mutant, the rate of P<sub>i</sub> elimination was 2.8 times higher than that of TbTIM; however, its rate constant for the isomerization reaction [( $k_{el}/K_m$ )<sub>DHAP</sub> = 29  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ] is much lower than in the wild type ( $2.4 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). This indicates that in the C14F mutant, the energy barrier for reprotonation is higher than in the wild type with only a modest increment of the elimination reaction.

**Secondary Structure and Thermal Stability of Wild-Type TbTIM, High-Activity Mutants, and C14F TbTIM.** The circular dichroism spectra of wild-type TbTIM, of the high activity mutants, and of C14F TbTIM were recorded between

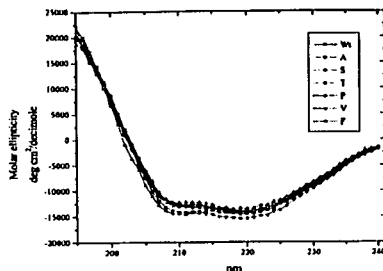


FIGURE 3: CD spectra of wild-type TbTIM, the high-activity mutants, and C14F TbTIM. The spectra of the indicated enzymes at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in phosphate buffer and 20 mM NaCl (pH 7.4) are shown.

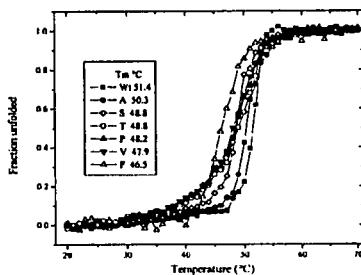


FIGURE 4: Melting curves of wild-type TbTIM, the high-activity mutants, and C14F TbTIM. The changes in molar ellipticity induced by the progressive increase in temperature were followed at 222 nm. The inset shows the  $T_m$  values of the indicated enzymes.

190 and 240 nm at 25  $^{\circ}\text{C}$  (Figure 3). Their spectra were almost identical to that of wild-type TbTIM. Hence, the different mutations did not cause gross modifications of secondary structure.

Thermal denaturation experiments of the enzymes were carried out at a concentration of 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in the temperature range of 20–70  $^{\circ}\text{C}$ . The process was monitored at 222 nm. The transition curves showed that the high-activity mutants exhibited  $\Delta T_m$  values 1–3  $^{\circ}\text{C}$  lower than the value of 51.4  $^{\circ}\text{C}$  exhibited by the wild-type enzyme (Figure 4). C14F TbTIM was less stable; its  $T_m$  was 46.5  $^{\circ}\text{C}$ . In the presence of phosphoglycolate, the  $\Delta T_m$  of C14F TbTIM increased to 50.6  $^{\circ}\text{C}$ , a value significantly lower than the value of 57  $^{\circ}\text{C}$  observed with TbTIM in the presence of phosphoglycolate (these latter spectra are not shown).

**Stability to Dilution.** As noted, TIMs that have an alteration in the dimer interface lose activity when they are incubated at relatively low protein concentrations. This has been ascribed to a decrease in the association constant of the dimer, which leads to loss of monomers during the process of dissociation and association (24, 27, 31). Therefore, to learn how the substitution of Cys14 for another amino acid affects the stability of the dimer, wild-type TbTIM and the

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

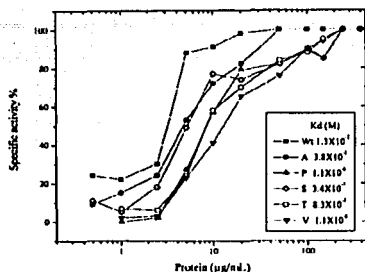


FIGURE 5: Stability of wild-type TbtIM and high-activity mutants at different protein concentrations. The enzymes were incubated at the indicated concentrations for 24 h at 25 °C in 100 mM TEA and 10 mM EDTA (pH 7.4). At that time, their activity was measured with 5 ng of protein. The respective dissociation constants (inset) were calculated as described in Materials and Methods.

high-activity mutants were incubated at different protein concentrations for 24 h. At that time, aliquots were withdrawn to measure the remaining activity with 5 ng of enzyme/mL. In the concentration range between 400 and 5 µg/mL, the activity of the wild-type remained constant. At lower protein concentrations, the activity diminished; with 0.5 µg/mL, only 20% of the original activity remained. The high-activity mutants exhibited similar inactivation patterns; however, the decay of activity occurred at higher protein concentrations (Figure 5). This was more evident with C14P, C14T, and C14V. The apparent dissociation constant ( $K_d$ ) of the enzymes was calculated from these data (inset of Figure 5). For TbtIM and the C14A and C14S mutants, the  $K_d$  values were in the range of  $1.3$ – $3.8 \times 10^{-7}$  M. The C14P, C14T, and C14V mutants had higher dissociation constants. Borchert et al. (24, 32) reported a  $K_d$  of 10 pM for TbtIM, which is significantly lower than the value we observed. However, there are marked differences in the experimental approaches used by those authors and us.

The inactivation that occurs during the incubation of dimeric TIMs at relatively low protein concentrations reflects the dissociation constant of the two monomers (27). Hence, it is relevant that the C14F mutant did not exhibit this behavior. In the concentration range from 0.5 µg/mL (the lowest concentration that could be assayed to have detectable activity) to 400 µg/mL, the activity of the enzyme did not change after its incubation for 2 h. These observations suggested that this mutant enzyme was a monomer with low, but important, catalytic activity.

**Characterization of C14F TbtIM.** The possibility that C14F TbtIM was a monomer was explored by size exclusion chromatography and sedimentation analysis. In the former system, the elution volumes of TbtIM (Figure 6A) corresponded to an  $R_s$  of 29.2 Å ( $M_r = 42$  000 Da). The C14F mutant exhibited a single chromatographic peak equivalent to an  $R_s$  of 19.2 Å with an  $M_r$  of 20 000 Da. These findings are also a strong indication that C14F is a monomer.

Sedimentation analysis of C14F TbtIM was also performed. The enzyme migrated as a single symmetrical band with a sedimentation coefficient  $S_{20,w}$  of 2.5044 S. This value corresponds to that of a monomeric enzyme and is in good

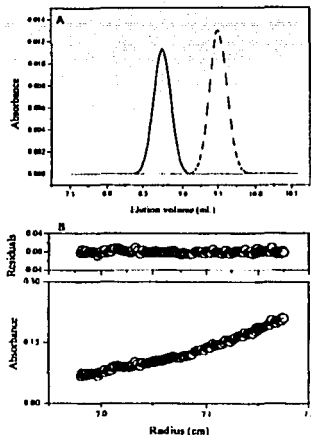


FIGURE 6: Size exclusion chromatography (A) and sedimentation equilibrium (B) of C14F TbtIM. In panel A, 100 µg of protein was injected into a UltraSpherogel-SEC 3000 column equilibrated with 100 mM TEA, 1 mM EDTA, and 150 mM NaCl (pH 7.4). The elution profile of C14F was monitored at 280 nm (dashed line). The Stokes radii were calculated from the elution volumes as described in Materials and Methods. For comparison, data for wild-type TbtIM are included (solid line). (B) Concentration distribution of C14F during sedimentation equilibrium. The empty circles are the measured values in the standard two sectors of the ultracentrifugation cell. The solid line is the result of fitting the data to a single-ideal species model using the regression analysis NONLIN program. The residual to the fit is shown at the top.

agreement with the values reported by Borchert et al. (32) and Schliebs et al. (33) for two different monomeric variants of TbtIM, 2.48 and 2.52 S, respectively. Definitive proof that C14F is a monomer was obtained from sedimentation equilibrium studies. Nonideality was not observed, and the residuals revealed no systematic deviations (Figure 6B). The NONLIN program produced a  $\sigma$  value of 0.95 cm<sup>2</sup>. By this method, the calculated molecular mass of C14F TbtIM was 27 200 Da, which agrees with the calculated molecular mass of the monomer of TbtIM (26 879 Da).

Taken together, the previous data indicate that C14F TbtIM is a true monomer that has a largely intact secondary structure. Thus, it was relevant to determine if this monomeric variant of TbtIM exhibits perturbations in the environment of its aromatic residues. Relative to that of TbtIM, the intrinsic fluorescence spectrum of C14F exhibited a red shift of 1.6 nm in its  $\lambda_{max}$  and a SCM that was ~1.8 nm higher (Figure 7A). The spectra also showed that its quantum yield was ~50% lower than in the wild-type enzyme. In accordance with these observations, the near-UV CD spectra of C14F TbtIM exhibited alterations in the environment of aromatic residues (Figure 7B). The spectral differences most likely indicate that in C14F TbtIM a buried Trp has a higher degree of solvent exposure. In this regard, a possible candidate is Trp12, since it is close to the interface Cys.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

079

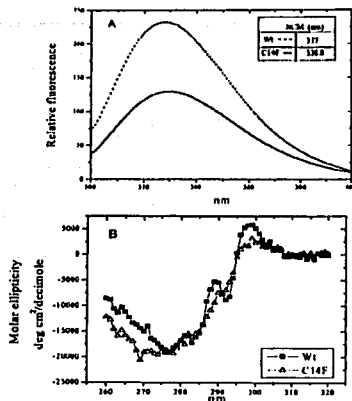


FIGURE 7: Intrinsic fluorescence emission (A) and near-UV CD (B) spectra of wild-type TbTIM and C14F. The fluorescence and CD spectra were obtained at concentrations of 0.05 and 0.4 mg/mL, respectively. The inset in panel A shows the SCM that was calculated as described in Materials and Methods.

## DISCUSSION

Cys14 is a nonconserved residue that is at the beginning of loop 1 and forms part of the intersubunit contacts between the two monomers of TbTIM. Its side chain is completely buried within loop 3 of the other subunit (Figure 1). In the crystallographic structure of TbTIM, using an interatomic cutoff distance of 4 Å, the atoms of Cys14 contact 26 atoms of the other subunit. These numerous interactions contribute to reduce the solvent accessibility of Lys13 (loop 1) and Glu97 (loop 4) and force the main chain of catalytic residue Lys13 to adopt the strained conformation that is required for optimal catalysis (34). The central role of Cys14 and that of other residues at position 14 for the stability of TIM dimers is highlighted by several independent lines of research. The substitution of Cys14 with a Leu residue in TbTIM (18) or of Met14 in human TIM with Gln (27) yielded enzymes with very low stability. Likewise, several reports show that derivatization of Cys14 with sulphydryl reagents brings about large structural changes and abolition of catalysis (17). In this work, we replaced Cys14 with each of the other 19 amino acids and examined how the different substitutions affect activity and stability.

From the data, it is clear that some substitutions (C14A, C14S, C14P, C14T, and C14V) do not significantly affect the catalytic activity of the enzyme. Thus, we explored if there are common features between these amino acids, and if their characteristics differ from those of the other residues that yield enzymes with low activity. Figure 8 is a plot of activity of the enzymes that have the indicated amino acid in position 14 versus their respective van der Waals volumes and polarities, the latter expressed as  $\Delta G$  of transfer from a nonpolar solvent to an aqueous solution (35). The results show that the amino acids that yield catalytically competent enzymes fall in a van der Waals volume range between 65

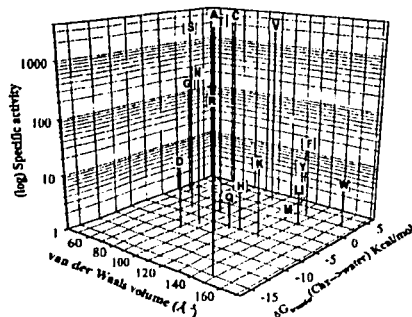


FIGURE 8: Dependence of activity of TbTIM on the van der Waals volume and polarity of the residue at position 14. The activities of wild-type TbTIM and all mutants were plotted against the van der Waals volume and polarity of the different residues. The latter is expressed as the  $\Delta G$  (kilocalories per mole) of transfer from cyclohexane to water. Proline that has a van der Waals volume of 90 Å<sup>3</sup> was not included because it is absent in the data reported by Radzicka et al. (35). The amino acids are designated by the one-letter code.

and 110 Å<sup>3</sup>, and that they have relatively low polarity. Variations of each of these two parameters give enzymes with very low activity. For example, Asn yields an enzyme with low activity; its volume is in the "allowed" range, but its polarity is high. By the same token, Gly has the right polarity, but its volume is small. Thus, these data define the physicochemical characteristics that a given residue must possess to yield a catalytically competent enzyme. It is noted that the same profile was observed when the accessible surface area was plotted instead of van der Waals volumes (not shown).

Another salient feature of the data obtained with the mutants of Cys14 is that only the high-activity mutants exhibited dissociation constants and thermal stabilities similar to those of wild-type TbTIM. This suggests that these enzymes have high activities because they conserve their dimeric structure. The relationship between dimer stability and catalysis is also illustrated by the behavior of the mutants that had "intermediate" activity (C14N, C14G, and C14R). These enzymes exhibited substantial catalytic activity in the initial seconds of reaction time. However, at the concentrations that could be used for activity measurements, their activity decreased dramatically. Hence, the overall data indicate that in TIM dimer stability is compulsorily linked to optimal catalytic activity.

In this context, the characteristics of C14F TbTIM are relevant to the question of how dimerization induces the expression of high catalytic rates. As evidenced by size exclusion chromatography and ultracentrifugation experiments, the introduction of a bulky residue in position 14 yields a monomer that exhibits catalytic activity, albeit at rates ~1000 lower than that of wild-type TbTIM. This monomeric enzyme exhibits some notable structural features. The mutant has a secondary structure that is nearly identical to that of the native dimer; however, the quantum yield of its aromatic residues is significantly lower (Figure 7A). This

indicates that the  $\alpha/\beta$  folds that characterize native TbTIM can be formed in the absence of interactions with the other subunit, and that the monomer, although with alterations in the environment of its aromatic residues (Figure 7B), has, nonetheless, a tertiary structure that supports the expression of catalysis.

The existence of monomeric TIMs with catalytic activity has been previously reported (31–34, 36). The monomeric variants of TbTIM generated either by point mutations of two conserved residues at the tip of loop 3, Thr75 and Gly76 (33), or by substitution of His 47 for Asn in loop 2 (31) exhibited catalytic constants similar to those of C14F TbTIM. The crystallographic studies of a catalytically active monomeric TIM, prepared by shortening of loop 3 (mono-TIM), showed that that the arrangements of loop 1 and 4 differed from those in wild-type TbTIM (37). In mono-TIM, the side chain of the catalytic Lys13 was mobile and the catalytic His95 had a different conformation. Thus, as proposed previously (33, 34, 37), it is very likely that dimerization induces the correct geometry of the catalytic residues. The lack of a correct geometry of the side chain of monomeric C14F could explain its low catalytic rates and alterations of  $K_m$ . There is also evidence that the region of the interface formed by residue 14 and loop 3 plays a dynamic role in catalysis. Gracy et al. (38) found that active catalysis or the occupancy of the catalytic site by a substrate analogue confers to rabbit and human TIMs a conformation prone to demidation of an interface Asn. Likewise, it was shown that the occupancy of the catalytic site by substrate or phosphoglycolate has a strong influence on the access of thiol reagents to the interface cysteine of the TIMs from trypanosomatids (22). Taken together, the existing information indicates that dimerization, and in particular the interactions of residue 14 with loop 3 of the other subunit, is central to the structure and function of the enzyme.

There is another characteristic of C14F TbTIM that deserves further comment. The most extensive and obvious conformational changes that occur in TIMs during catalysis occur in loop 6 (residues 168–178). The movements of this loop and the amino acid compositions of the hinges of loop 6 have been extensively studied (39–45), and it was recently reported that the motion of loop 6 is partially rate-limiting for the chemical reaction (46, 47). It is also documented that the closure of the catalytic site by loop 6 constrains the enediolate intermediate into a planar form and isolates the intermediate from bulk water (45). These two factors favor the isomerization reaction over the elimination reaction (formation of methylglyoxal and phosphate).

Along this line, it has been shown that a shortening of loop 6 yields an enzyme in which the partition between methylglyoxal and product formation is increased (48). Kinetically, it has been reported (45, 47) that if the opening of loop 6 is faster than the isomerization reaction, methylglyoxal will be formed. The measurements of the rate of elimination (with [ $^{13}\text{C}$ ]DHAP as the substrate) in the C14F monomers showed that the amount of  $^{13}\text{C}$ , formed was between 2 and 3 times higher than in wild-type TbTIM, although the yield of the isomerization reaction was ~1000 times lower than in the wild type. This suggests that in the monomers of C14F, the absence of intersubunit contacts influences the partition between methylglyoxal and product

through an increase in the energy barriers of the reprotonation step.

In sum, the central role of the amino acid at position 14 in maintaining the dimeric structure of TIM from *T. brucei* has been confirmed. The studies also show that the amino acids that have a certain volume and polarity can successfully replace the interface cysteine. When residue 14 is replaced with amino acids that are outside the volume and polarity limits, enzymes with low stabilities are obtained. Indeed, C14F TbTIM is a monomer at a concentration of at least 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The data also show that this monomeric variant of TbTIM exhibits catalytic activity. However, its kinetics of the isomerization reaction differ markedly from those of wild-type TbTIM. In addition, the monomeric enzyme exhibits alterations in the ratio between the isomerization and elimination reactions. Thus, the findings reported in the literature (27, 33, 34, 37, 49), together with those described here, indicate that dimerization induces the correct arrangement of the catalytic residues and that the dimer interface plays a dynamic role in the physiological function of the enzyme.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Nallely Cabrera for excellent technical assistance and Dr. P. A. M. Michels (Research Unit for Tropical Diseases, ICP-TROP, Brussels, Belgium) for the TbTIM gene.

#### REFERENCES

1. Knowles, J. R. (1991) *Nature* 350, 121–124.
2. Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Cornam, P. H., Furnh, A. J., Milmar, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., and Waley, S. G. (1975) *Nature* 255, 609–614.
3. Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C., and Petsko, G. (1990) *Biochemistry* 29, 6609–6618.
4. Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., and Ilot, W. G. J. (1991) *J. Mol. Biol.* 220, 995–1015.
5. Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A. C., and Martial, J. A. (1993) *Acta Crystallogr. D* 49, 403–417.
6. Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A., and Ilot, W. G. J. (1994) *Protein Sci.* 3, 810–821.
7. Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M. D., Martial, J. A., and Ilot, W. G. J. (1995) *Protein Sci.* 4, 2594–2604.
8. Velankar, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P., and Murthy, M. R. N. (1997) *Structure* 5, 751–761.
9. Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wymys, L., Wierenga, R. K., and Maes, D. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 2199–2206.
10. Maldonado, E., Soriano-Garcia, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez Puyou, A., and Pérez-Montfort, R. (1998) *J. Mol. Biol.* 283, 183–203.
11. Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vried, G., Backmann, J., Michels, P. A. M., Lamber, A. M., and Wierenga, R. K. (1999) *Protein Eng.* 12, 243–250.
12. Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaupain, N., Alvarez, M., Thi, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wymys, L., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1999) *Proteins* 37, 441–453.
13. Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J. M., Siebers, B., Hensel, R., and Taylor, G. L. (2001) *J. Mol. Biol.* 306, 745–757.
14. Waley, S. G. (1973) *Biochem. J.* 135, 165–172.
15. Zahori, S., Rudolph, F., and Jaenicke, R. (1980) *Z. Naturforsch.* 35, 999–1004.

16. Reyes-Vivas, H., Hernández-Alcántara, G., López-Velazquez, G., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (2001) *Biochemistry* 40, 3134–3140.
17. Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R., and Gómez-Puyou, A. (1998) *Eur. J. Biochem.* 253, 684–691.
18. Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R. A., Rojo-Domínguez, A., and Pérez-Montfort, R. (1995) *Chem. Biol.* 2, 847–855.
19. Landa, A., Rojo-Domínguez, A., Jiménez, L., Fernández-Velasco, D. A. (1997) *Eur. J. Biochem.* 247, 348–355.
20. Ranic, J., Kumar, V. P., and Balaram, H. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 159–170.
21. Mowatt, M. R., Weinbach, E. C., Howard, T. C., and Nash, T. E. (1994) *Exp. Parasitol.* 78, 85–92.
22. Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Gao, X. G., Maldonado, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1999) *Biochemistry* 38, 4114–4120.
23. Singh, K. S., Mathial, K., Balaram, H., and Balaram, P. (2001) *FEBS Lett.* 501, 19–23.
24. 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) *Eur. J. Biochem.* 211, 703–710.
25. Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Rojo-Domínguez, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1996) *Eur. J. Biochem.* 241, 114–120.
26. Richard, J. P. (1991) *Biochemistry* 30, 4581–4585.
27. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frère, J. M., Mande, S. C., Hol, W. G. J., Marial, J. A., and Goraj, K. (1996) *J. Mol. Biol.* 257, 441–456.
28. Ackers, G. K. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3227–3228.
29. Philo, J. S. (1997) *Biophys. J.* 72, 435–444.
30. Johnson, M. L., Correia, J. J., Yphantis, D. A., and Halvorson, H. R. (1981) *Biophys. J.* 36, 572–588.
31. Borchert, T. V., Zeelen, J. P., Schliebs, W., Callens, M., Minke, W., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1995) *FEBS Lett.* 367, 315–318.
32. Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 1515–1518.
33. Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1997) *Biochemistry* 36, 9655–9662.
34. Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R., and Wierenga, R. K. (1996) *Protein Sci.* 5, 229–239.
35. Radzicka, A., and Wolfenden, R. (1988) *Biochemistry* 27, 1664–1670.
36. Saab-Rimeón, G., Rivelino, J. V., Osuna, J., Sánchez, F., and Soberón, X. (2001) *Protein Eng.* 3, 149–155.
37. Borchert, T. V., Kishan, K. V., Zeelen, J. P., Schliebs, W., Thanki, N., Abagyan, R., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1995) *Structure* 3, 669–679.
38. Gracy, R. W., Yüksel, K. Ü., and Gómez-Puyou, A. (1995) in *Deamination and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins* (Aswad, D. W., Ed.) pp 133–155, CRC Press, Boca Raton, FL.
39. Albert, T., Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D., Rivers, P. S., and Wilson, I. A. (1981) *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 293, 159–171.
40. Joseph, D., Petsko, G. A., and Karplus, M. (1990) *Science* 249, 1425–1428.
41. Lolis, P. J., and Petsko, G. A. (1990) *Biochemistry* 29, 6609–6618.
42. Sampson, N. S., and Knowles, J. R. (1992) *Biochemistry* 31, 8482–8487.
43. Williams, J. C., and McDermott, A. E. (1995) *Biochemistry* 34, 8309–8319.
44. Sun, J., and Sampson, N. S. (1999) *Biochemistry* 38, 11474–11481.
45. Xiang, J., Sun, J., and Sampson, N. S. (2001) *J. Mol. Biol.* 307, 1103–1112.
46. Rozovsky, S., and McDermott, A. E. (2001) *J. Mol. Biol.* 310, 259–270.
47. Rozovsky, S., Jogl, G., Tong, L., and McDermott, A. E. (2001) *J. Mol. Biol.* 310, 271–280.
48. Pompliano, D. L., Peyman, A., and Knowles, J. R. (1990) *Biochemistry* 29, 3186–3194.
49. Borchert, T. V., Abagyan, R., Kishan, K. V., Zeelen, J. P., and Wierenga, R. K. (1993) *Structure* 1, 205.

BI011950F

Apéndice I Pérez-Montfort y col., 1999

En la interfase de TbTIM y TcTIM, una cisteína de cada monómero forma parte de los contactos intersubunidad. La derivatización de esta cisteína (Cys14) por agentes derivatizantes induce alteraciones estructurales progresivas y pérdida de la catálisis. En este trabajo se determinó la derivatización de la Cys14 por DTNB y MMTS para probar si los eventos que ocurren en el sitio catalítico se transmiten a la región de la interfase de la TIM. Se encontró que la enzima en estado catalítico activo es menos sensible a los agentes derivatizantes que en el estado relajado. La protección máxima se obtuvo a concentraciones de sustrato cercanas a la saturación. En TcTIM y TbTIM el análogo de sustrato 2-PG protege fuertemente contra la acción del DTNB, y en menor proporción contra el MMTS. La sensibilidad de estas enzimas a la inhibición por DTNB y MMTS depende considerablemente de la ocupación del sitio activo por su sustrato o análogo, mostrando que existe una interrelación entre el sitio catalítico y la interfase de la enzima. Estudios con la enzima mutante C14S de TbTIM confirman que los efectos descritos por los agentes derivatizantes de grupo sulfhidrilo son consecuencia de la derivatización de la Cys14, ya que una concentración de MMTS hasta de 5 mM no afecta la actividad de esta enzima mutante; en contraste en la enzima silvestre dicha concentración inhibe hasta un 50 % de la actividad en 10 minutos.

## Derivatization of the Interface Cysteine of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as Probe of the Interrelationship between the Catalytic Sites and the Dimer Interface<sup>†</sup>

Ruy Pérez-Montfort,<sup>‡</sup> Georgina Garza-Ramos,<sup>‡</sup> Gloria Hernández Alcántara,<sup>‡</sup> Horacio Reyes-Vivas,<sup>‡</sup> Xiu-gong Gao,<sup>‡</sup> Ernesto Maldonado,<sup>‡</sup> Marietta Tucna de Gómez-Puyou,<sup>‡</sup> and Armando Gómez-Puyou<sup>\*,‡</sup>

Departamento de Bioquímica and Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70243, 04510 México, D.F., México

Received October 12, 1998; Revised Manuscript Received January 25, 1999

**ABSTRACT:** In the interface of homodimeric triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* (TbTIM) and *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), one cysteine of each monomer forms part of the intersubunit contacts. The relatively slow derivatization of these cysteines by sulphydryl reagents induces progressive structural alterations and abolition of catalysis [Garza-Ramos et al. (1998) *Eur. J. Biochem.* 253, 684-691]. Derivatization of the interface cysteine by 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoate) (DTNB) and methylmethane thiosulfonate (MMS) was used to probe if events at the catalytic site are transmitted to the dimer interface. It was found that enzymes in the active catalytic state are significantly less sensitive to the thiol reagents than in the resting state. Maximal protection against derivatization of the interface cysteine by thiol reagents was obtained at near-saturating substrate concentrations. Continuous recording of derivatization by DTNB showed that catalysis hinders the reaction of sulphydryl reagents with the interface cysteine. Therefore, in addition to intrinsic structural barriers, catalysis imposes additional impediments to the action of thiol reagents on the interface cysteine. In TcTIM, the substrate analogue phosphoglycolate protected strongly against DTNB action, and to a lesser extent against MMS action; in TbTIM, phosphoglycolate protected against the effect of DTNB, but not against the action of MMS. This indicates that barriers of different magnitude to the reaction of thiol reagents with the interface cysteine are induced by the events at the catalytic site. Studies with a Cys14Ser mutant of TbTIM confirmed that all the described effects of sulphydryl reagents on the trypanosomal enzymes are a consequence of derivatization of the interface cysteine.

Triosephosphate isomerase (TIM)<sup>1</sup> has been the subject of numerous structural and mechanistic studies. The kinetics and the energetics of the TIM-catalyzed interconversion between glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate have been well established (1-4). The structures of TIMs from several species have also been unveiled by X-ray crystallography to a high level of resolution (5-13). The crystallographic data indicate that TIMs that range from thermophilic bacteria to human are dimers formed by two identical subunits. The monomers are formed by eight central  $\beta$ -strands and eight  $\alpha$ -helices (numbered 1-8) joined by the corresponding loops, making TIM a member of the family of proteins with  $\alpha$ - $\beta$ -barrel structures.

An intriguing characteristic of TIM is that the monomer is inactive; only the dimer is catalytically active (14-16). However, it has been shown that a dimer formed by an intact monomer and a monomer in which catalysis has been blocked by an inhibitor covalently bound to the catalytic site exhibits half of the activity of the intact dimer (17). It is also relevant that TIM monomers that have been engineered to have low association constants exhibit catalytic activities that are many times lower than those of the native dimers (18-21). These observations suggest either that monomer association induces the formation of monomers with high catalytic activity or that intersubunit contacts participate in catalysis. In principle, the latter alternative can be approached with a probe that monitors if during catalysis some of the intersubunit contacts exhibit conformational changes, or if one or more of the interface residues exhibits a property that differs from that in the resting state. We thought that the interface cysteine at position 14 of TIM from *Trypanosoma brucei* (TbTIM) and *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) might be particularly useful to examine this possibility. In this work, the residues are numbered according to the aligned amino acid sequence of TbTIM; it is noted, however, that TcTIM has one residue more, that at position 2 (22).

<sup>†</sup>This work was supported in part by Dirección de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México Grants IN206297 (to R.P.-M.) and IN208097 (to A.G.-P.).

\* Corresponding author: Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70243, 04510 México, D.F., México. Telephone (52 5) 6225629. Fax: (52 5) 6225630.

<sup>‡</sup> Departamento de Bioquímica.

<sup>‡</sup> Departamento de Genética Molecular.

Abbreviations: DTNB, 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoate); MMS, methylmethane thiosulfonate; P.C.R., polymerase chain reaction; TIM, triosephosphate isomerase; TbTIM and TcTIM, triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*, respectively.

The residue at position 14 in TbTIM is a nonconserved amino acid, but in all TIMs, it forms part of loop 1, which joins the first  $\beta$ -strand and first  $\alpha$ -helix. X-ray structures of the TIMs that have been studied show that the side chain of this residue is submerged into loop 3 of the other subunit. The latter is also known as the interdigitating loop, since it fits into a crevice formed by loops 1 and 4 of the other subunit. The importance of residue 14 and loop 3 in dimer stability is well evidenced by data that show that the substitution by site-directed mutagenesis of cysteine 14 of TbTIM for a leucine (23), or methionine 14 of human TIM for an asparagine (24), yields enzymes with low stability. Along the same line, alterations of loop 3 gave monomers with low association constants (18, 21, 25).

There are two main reasons for carrying out these studies in TIMs from *Trypanosoma brucei* (TbTIM) and *Trypanosoma cruzi* (TcTIM). One is that cysteine 14 of each of the two monomers is the only cysteine that forms part of the dimer interface. The other is that incubation of the trypanosomal enzymes with sulfhydryl reagents brings about large structural changes and abolition of catalysis, which result from the derivatization of cysteine 14 by the sulfhydryl reagents (26). Therefore, we studied if catalysis and other events that occur at the catalytic site modify the susceptibility of the interface cysteine of the trypanosomal TIMs to thiol reagents. Affirmative data would be indicative of a transmission of structural changes from the catalytic site to the portion of the interface formed by cysteine 14 of one monomer and loop 3 of the other subunit. The results indicate that catalysis or the occupancy of the catalytic site by a substrate analogue does affect the derivatization of the cysteine by two sulfhydryl reagents, 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoate) (DTNB) and methylmethane thiosulfonate (MMTS).

## MATERIALS AND METHODS

**Enzymes.** Recombinant TIMs from *T. brucei* and *T. cruzi* were prepared as described elsewhere (26, 27), and maintained as a suspension at 4 °C in 100 mM triethanolamine/10 mM EDTA/1 mM dithiothreitol/1 mM azide, pH 8.0, and 70% ammonium sulfate. For the experiments, the enzymes were dialyzed against 100 mM triethanolamine/10 mM EDTA, pH 7.4.

The Cys14Ser mutant of TbTIM was prepared by polymerase chain reaction (PCR) using the "Expand High Fidelity PCR System" (Boehringer). The mutagenic oligonucleotides were 5'-AACTGGAAAGNNAACGGCTCC-3' and 3'-TGTACCTTCNNNTTGCAGAGG-5' (where N = A/C/G/T). The PCR products were ligated to the pCR 2.1 vector (Invitrogen) and sequenced. Once the gene with the appropriate mutation was identified, it was sequenced completely, subcloned into pET3a, and introduced by transformation into BL21(DE3) pLys cells (Novagen). For expression of the Cys14Ser protein, cells were grown as described by Borchert et al. (27). The purification of the mutant enzyme was carried out following the methodology described for wild-type TbTIM (27).

**Substrates.** Glyceraldehyde 3-phosphate was prepared by adding 100 mg of glyceraldehyde 3-phosphate diethylacetal and 5 mL of water to 1.5 g of Dowex 50WX2-100 that had been washed with water. The mixture was placed in boiling water and stirred constantly with a spatula for 3 min. The

mixture was cooled and filtered through a Millipore filter. The filtrate was lyophilized and the residue dissolved in 5 mL of 100 mM triethanolamine/10 mM EDTA, pH 7.4. The concentration of glyceraldehyde 3-phosphate was around 20 mM. Dihydroxyacetone phosphate was prepared from 25 mg of dihydroxyacetone phosphate dimethylketal dissolved in 2 mL of water. To this solution was added Dowex 50WX2-100 (0.5 g), and after stirring for about 1 min, the mixture was filtered through Millipore filters. The filtrate was incubated at 37 °C for 4 h and then lyophilized. The residue was dissolved in 2 mL of 100 mM triethanolamine/2 mM EDTA, pH 7.4. Before the experiments, the pHs of the two substrates were adjusted with NaOH to the pH of the buffer used in the experiments (100 mM triethanolamine/10 mM EDTA, pH 7.4). Through this procedure, acidification of incubation of mixtures that contained high concentrations of substrates (> 1 mM) was prevented.

**Effect of Sulfhydryl Reagents and Assay of Activity.** The standard conditions for measuring the effect of sulfhydryl reagents on TbTIM and TcTIM were as follows. The enzymes were incubated at a concentration of 5  $\mu$ g/mL in 0.5 or 0.25 mL of 100 mM triethanolamine/10 mM EDTA, pH 7.4, with the indicated concentrations of thiol reagents, substrate, or phosphoglycolate for 2 h (unless otherwise indicated) at 25 °C. At this time an aliquot was withdrawn and diluted with buffer in order to measure activity. Rate constants were evaluated by fitting the pseudo-first-order kinetic equation to the inactivation of TIMs by thiol reagents. In the absence of sulfhydryl reagents, the activity of the enzymes incubated with or without substrate or phosphoglycolate did not change. The experiments have been carried out at least 3 times.

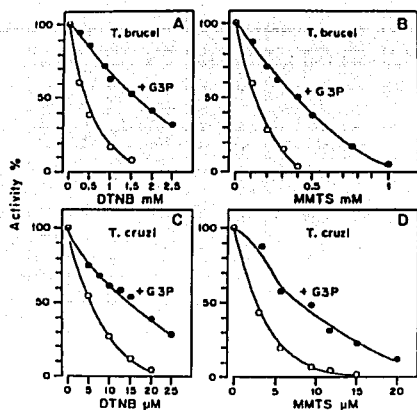
Activity in the direction of glyceraldehyde 3-phosphate to dihydroxyacetone phosphate was measured at 25 °C as described elsewhere (28) with 1 mM substrate,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase, and NADH to trap dihydroxyacetone formed, and 5 or 7.5 ng of enzyme/mL of reaction mixture. In the direction of dihydroxyacetone phosphate to glyceraldehyde 3-phosphate, the  $K_m$  and  $V_{max}$  were determined at 25 °C in a mixture of 1 mL that contained 100 mM triethanolamine/10 mM EDTA, pH 7.4, 1 mM NAD, 4 mM arsenate, 120  $\mu$ M dithiothreitol, 1 unit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, various concentrations of dihydroxyacetone phosphate, and 50 ng of TbTIM or TcTIM. Activity was calculated from the increase in absorbance at 340 nm as a function of time. It is pointed out that the enzymes for trapping the products of the reactions were in large excess, doubling the concentration of the trapping enzymes did not modify the activities observed.

Protein concentration of the enzymes was determined from their absorbance at 280 nm using the molecular extinction coefficients ( $\epsilon_{280}$ ) of 34 950 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> for TbTIM and Cys14Ser TbTIM and 33 460 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> for TcTIM (22).

## RESULTS

Increasing concentrations of sulfhydryl reagents, such as DTNB and MMTS, induce a time- and concentration-dependent irreversible inhibition of the activities of TbTIM and TcTIM that results from derivatization of their interface cysteines (26). The inhibiting effect of DTNB and MMTS on TbTIM is shown in Figure 1 (A and B, respectively); the





**FIGURE 1:** Effect of DTNB and MMTS on the activity of TbTIM and TcTIM incubated with and without glyceraldehyde 3-phosphate. TbTIM (A and B) and TcTIM (C and D) were incubated at a concentration of 5  $\mu\text{g/ml}$  in a mixture of 100 mM trichloroamine and 10 mM EDTA, pH 7.4; the mixtures also included the indicated concentrations of DTNB (A and C) or MMTS (B and D), and 5 mM glyceraldehyde 3-phosphate where shown. After 2 h of incubation, an aliquot was withdrawn and diluted in order to measure activity; the latter was measured at a concentration of 7.5 ng/mL (see Materials and Methods). The results are expressed as percent of the activity in which 100% was 2900 and 3200  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  for TbTIM and TcTIM, respectively.

data also show that the inclusion of glyceraldehyde 3-phosphate in the reaction mixture induced partial protection against the inhibiting action of the two sulphydryl reagents.

The activity of TcTIM is also inhibited by sulphydryl reagents, but this enzyme is nearly 100 times more sensitive than TbTIM; previous data indicated that this is due to a higher accessibility of the interface cysteine of TcTIM to sulphydryl reagents (26). Therefore, we explored if these two enzymes exhibit differences in the protective effect of substrate against thiol reagents. In the experiments with TcTIM, much lower concentrations of DTNB and MMTS (Figure 1C,D, respectively) were used in order to obtain an inhibition comparable to that observed in TbTIM. Notwithstanding the relatively high susceptibility of TcTIM to the thiol reagents, substrate also protected against their detrimental effect. It is noted that the extent of protection was similar to that observed in TbTIM.

**Effect of Substrate on the Sensitivity of TbTIM and TcTIM to Sulphydryl Reagents.** The effect of different concentrations of added glyceraldehyde 3-phosphate on the inhibiting effect of MMTS and DTNB was determined in TbTIM and TcTIM (Table 1). As the concentration of added glyceraldehyde 3-phosphate was increased, the inhibition by the sulphydryl reagents diminished. However, it is noted that in the presence of TIM, glyceraldehyde 3-phosphate rapidly reaches an equilibrium with dihydroxyacetone phosphate, the ratio of the two species in the media being about 1:20 in favor of the latter (1, 3). In our experimental conditions, the equi-

**Table 1:** Effect of Different Concentrations of Added Glyceraldehyde 3-Phosphate on the Inhibition Produced by DTNB on TbTIM and TcTIM\*

added G3P (mM)	% activity			
	<i>T. brucei</i>		<i>T. cruzi</i>	
	DTNB	MMTS	DTNB	MMTS
—	4	10	3	4
0.5	12	14	5	7
1	18	20	8	8
3	33	37	18	17
5	67	59	32	28
10	89	85	36	53

\* The enzymes were incubated in the conditions of Figure 1. TbTIM was incubated with 1.5 mM DTNB or 0.4 mM MMTS, and TcTIM with 15  $\mu\text{M}$  DTNB or 12  $\mu\text{M}$  MMTS; these mixtures were supplemented with the indicated concentrations of glyceraldehyde 3-phosphate. At the end of 2 h, activity was determined. The results are expressed as percent of the activity of the controls in which 100% was the activity of TIMs incubated without the sulphydryl reagents. Note that under the conditions of the experiment, glyceraldehyde 3-phosphate rapidly reached an equilibrium with dihydroxyacetone phosphate at a ratio of 20 dihydroxyacetone phosphates per 1 glyceraldehyde 3-phosphate (1, 3). Therefore, the incubation media contained a mixture of the two substrates.

librium between glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate in the media was reached in seconds. Accordingly, the results reflect the effect of the two substrates at a ratio of 20 dihydroxyacetone phosphate per 1 glyceraldehyde 3-phosphate. In TbTIM and TcTIM, the respective  $K_m$ s for glyceraldehyde 3-phosphate are 0.6 and 0.8 mM, whereas the  $K_m$  for dihydroxyacetone phosphate in the two enzymes is 2 mM. Thus, the data of Table 1 suggest that maximal protection is induced when the enzymes are close to saturation with dihydroxyacetone phosphate.

**Studies with a Cys14Ser Mutant of TbTIM.** Substrate protects against the action of sulphydryl reagents in the trypanosomal enzymes (Figure 1). Thus, it may be asked if sulphydryl reagents affect catalysis independently of their effect on cysteine 14. Previous studies on the inhibition of TbTIM and TcTIM by thiol reagents had been carried out in the resting enzymes (26); thus, there was the possibility that in the presence of substrate, thiol reagents derivatized other cysteines that exist in the trypanosomal enzymes (for amino acid sequence and cysteine composition of the two enzymes, see ref 22). Therefore, we carried out studies with a mutant enzyme of TbTIM in which its cysteine 14 was changed to a serine by site-directed mutagenesis.

Cys14Ser TbTIM exhibited catalytic properties that were almost identical to those of the wild type; the  $K_m$  and  $V_{max}$  of the Cys14Ser TbTIM for glyceraldehyde 3-phosphate were 0.6 mM and 3780  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , respectively, whereas in wild-type TbTIM, these values were 0.6 mM and 4170  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . In the standard reaction mixture for measuring TIM activity with 1 mM glyceraldehyde 3-phosphate, 5 mM MMTS did not affect the activity of the mutant enzyme, albeit under the same conditions, wild-type TbTIM was inhibited by about 50% in 10 min. This indicates that (i) that the effect observed with MMTS in wild-type TbTIM in the presence of glyceraldehyde 3-phosphate is indeed due to its effect on its cysteine 14, and (ii) that MMTS does not compete with substrate for the catalytic site, although substrate does protect against the action of MMTS.

TF SIS CON  
FALLA DE ORIGEN

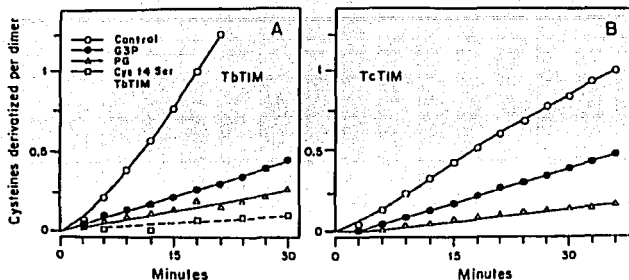


FIGURE 2: Effect of substrate and phosphoglycolate on nitrobenzoate formation during the incubation of DTNB with TbTIM (A), Cys14Ser TbTIM (A, open squares), and TcTIM (B). The enzymes (300  $\mu$ g) were incubated at 25  $^{\circ}$ C in 1 mL of a mixture that contained 100 mM triethanolamine and 10 mM EDTA, pH 7.4. The mixtures also contained 1.5 mM DTNB for the experiments with TbTIM and Cys14Ser TbTIM, and 12  $\mu$ M DTNB for those with TcTIM. In addition, 5 mM glyceraldehyde 3-phosphate or 5 mM phosphoglycolate was included as shown. Recording of the absorbance of the mixture at 412 nm was started immediately after the enzymes were added. The blank (no enzyme) that contained 1.5 mM DTNB exhibited a slight increase in absorbance at 412 nm; this was subtracted from the experimental values.

The effect of DTNB on Cys14Ser TbTIM was studied by incubating the enzyme in the conditions of Figure 1 with a concentration of DTNB (2 mM) that produced almost complete inhibition of the activity of wild-type TbTIM. DTNB diminished the activity of the mutant enzyme by 25%, thus confirming that the deleterious effect of sulfhydryl reagents in the trypanosomal enzymes is a consequence of derivatization of Cys 14. Further evidence for this conclusion is provided below (Figure 2).

**Mechanism of Protection by Substrate against Thiol Reagents.** The preceding data indicated that substrate protects against the action of sulfhydryl reagents on the interface cysteine of TbTIM and TcTIM. Since derivatization of the interface cysteine of TcTIM and TbTIM triggers irreversible structural alterations that lead to abolition of catalysis (26), the protective effect of substrate on the action of the thiol reagents could be consequence of hindrances in the reaction of sulfhydryl reagents with the interface cysteine, or to prevention of the structural alterations that are produced by derivatization.

Derivatization of cysteines with DTNB yields nitrobenzoate which has an absorption maximum at 412 nm (29). Therefore, the possibility that substrate hinders the reaction of sulfhydryl reagents with the interface cysteine was explored by recording the formation of nitrobenzoate during the incubation of TcTIM and TbTIM with DTNB with and without glyceraldehyde 3-phosphate. Recording was carried out for 30 min, since at longer times of incubation the derivatized enzymes undergo aggregation (more evident in TbTIM), and thus the increase in absorbance does not necessarily reflect formation of nitrobenzoate. In consonance with previous data (26), incubation of TbTIM and TcTIM with DTNB brought about a progressive increase in absorbance at 412 nm (Figure 2, panels A and B, respectively). However, the recordings also showed that with substrate, the rate of formation of nitrobenzoate was significantly diminished. Note that with TcTIM, a 100 times lower concentration of DTNB was used, and, thus, the rates of reduction of DTNB by the two enzymes cannot be compared.

That the reduction of DTNB is indeed due to derivatization of the interface cysteine is illustrated by data that show that in Cys14Ser TbTIM hardly any reduction of DTNB took place (Figure 2A, open squares).

The results with DTNB are mechanistically relevant since they illustrate that the effect of substrate is to decrease the reaction between sulfhydryl reagents and the interface cysteine. This could result from a diminution in the influx of the thiol reagents to the interface cysteine, or from a conformational change that leads to a slowing of the reaction between the sulfhydryl reagents and the interface cysteine.

**Effect of Phosphoglycolate and Other Compounds on the Action of DTNB and MMTS on TbTIM and TcTIM.** Phosphoglycolate is a powerful competitive inhibitor in TbTIM;  $K_i = 0.026$  mM (20). The crystal structure of TbTIM in complex with 2-phosphoglycolate (19, 30) shows that it occupies the catalytic center of TIM in a form analogous to that of substrate. In confirmation of other reports, we observed that phosphoglycolate inhibited the activity of TbTIM; it also inhibited the activity of TcTIM. With 1 mM glyceraldehyde 3-phosphate as substrate, the inhibition curves in TbTIM and TcTIM by different concentrations of phosphoglycolate were markedly similar (Figure 3A). This is in agreement with the very similar crystallographic structure of the catalytic sites of the two trypanosomal TIMs (13). It was also observed that dilution of incubation mixtures that contained phosphoglycolate yielded enzymes that exhibited the activity of enzymes not treated with the inhibitor (not shown). Hence, in the two enzymes the action of phosphoglycolate is fully reversible.

Since TbTIM and TcTIM have similar catalytic properties, an identity of nearly 70% (22), and very similar X-ray structures (13), it may not be surprising that in the two enzymes substrate protects against thiol reagents by the same mechanism. However, since cysteine 14 is buried in the interface, and DTNB and MMTS have different dimensions and markedly different structure, it seems rather peculiar that the extent of protection by substrate against the two thiol reagents is also in the same range. In this regard, the results

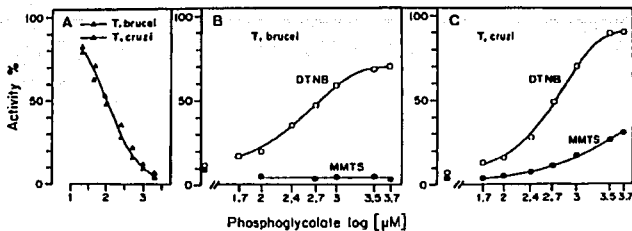


FIGURE 3: Effect of different concentrations of phosphoglycolate on the activity of TbTIM and TcTIM (A) and on the action of DTNB and MMTS on TbTIM (B) and TcTIM (C). In (A), the activities of TbTIM and TcTIM were measured with 1 mM glyceraldehyde 3-phosphate and the indicated concentrations of phosphoglycolate. In (B) and (C), the incubating conditions were as in Figure 1; with TbTIM, the incubation mixture contained 1.5 mM DTNB or 0.4 mM MMTS; with TcTIM, 15  $\mu$ M DTNB or 12  $\mu$ M MMTS. The mixtures also contained the indicated concentrations of phosphoglycolate. After 2 h, the activity of the enzymes was determined.

Table 2: Apparent Rate Constants ( $M^{-1} s^{-1}$ ) for the Reaction of DTNB and MMTS with Cysteine 14 of TbTIM and TcTIM\*

additions	<i>T. cruzi</i>	<i>T. brucei</i>
DTNB	24 $\pm$ 0.6	0.15 $\pm$ 0.01
DTNB + G3P	7.6 $\pm$ 0.7	0.03 $\pm$ 0.003
DTNB + PG	3.3 $\pm$ 0.3	0.03 $\pm$ 0.002
MMTS	40 $\pm$ 2.3	0.58 $\pm$ 0.03
MMTS + G3P	14.3 $\pm$ 1	0.15 $\pm$ 0.01
MMTS + PG	12.1 $\pm$ 1	0.85 $\pm$ 0.08

\* The enzymes were incubated in the conditions of Figure 1 with DTNB or MMTS and 5 mM added glyceraldehyde 3-phosphate or 5 mM phosphoglycolate as indicated. TbTIM was incubated with 0.75, 1.5, and 3 mM DTNB, or 0.2, 0.4, and 0.8 mM MMTS. TcTIM was incubated with 7.5, 10, 15, 20, and 40  $\mu$ M DTNB, or 5, 7.5, 10, and 15  $\mu$ M MMTS. At various times, aliquots were withdrawn for measurements of activity. Plots of ln activity versus time were linear. The slopes were then plotted against DTNB or MMTS concentrations, and the apparent rate constants ( $k$ , standard error) for the reaction were calculated from these slopes.

of experiments on the effect of phosphoglycolate on the action of DTNB and MMTS on the two enzymes are relevant (Figure 3).

In TbTIM and TcTIM, phosphoglycolate protected against the action of DTNB (Figure 3, panels B and C, respectively). Protection by phosphoglycolate was higher in TcTIM, but in the two enzymes, the protection curves as a function of phosphoglycolate concentration were very similar, reaching a maximum at a concentration of about 1 mM phosphoglycolate. Phosphoglycolate also decreased the rate at which the interface cysteines of TbTIM and TcTIM were derivatized by DTNB (Figure 2A,B, triangles). Thus, phosphoglycolate, similarly to substrate, protected against the action of DTNB by slowing its reaction with the interface cysteine.

The results on the effect of phosphoglycolate on DTNB action differ drastically from those obtained with MMTS. Phosphoglycolate up to a concentration of 5 mM did not protect TbTIM against MMTS action (Figure 3B). In TcTIM, phosphoglycolate protected against MMTS action, but not to the extent observed with DTNB (Figure 3C).

The rate constants for the inactivation of the trypanosomal TIMs by DTNB and MMTS in the presence and absence of phosphoglycolate were determined and compared to those obtained with glyceraldehyde 3-phosphate (Table 2). In all cases, the plots of ln activity of TbTIM and TcTIM versus

time with various concentrations of DTNB and MMTS were linear, obeying a pseudo-first-order reaction. The plots of the pseudo-first-order rate constants depended linearly on reagent concentration, indicating second-order kinetics. From the latter data, the apparent second-order rate constants ( $M^{-1} s^{-1}$ ) were calculated (Table 2). In the two TIMs, substrate and phosphoglycolate decreased the rate constant of the reaction with DTNB. In TcTIM, phosphoglycolate also protected against MMTS action, but in TbTIM, no such effect was observed; in fact, phosphoglycolate induced a slight, but reproducible increase in the rate of reaction of MMTS. These results, together with those in Figure 3, are strongly suggestive that the species that occupies the catalytic site hinders the action of sulphydryl reagents to different extents, and that these become apparent with thiol reagents of different size or chemical characteristics.

In the conditions of Figure 3, phosphoglycerate, phosphoenol pyruvate, and glucose 6-phosphate at a concentration of 5 mM did not protect against the action of DTNB and MMTS in TbTIM and TcTIM.

## DISCUSSION

Many of the studies on the conformational changes that occur in TIM during catalysis have focused on the extensive movement of loop 6. Kinetic (31–34), crystallographic (6, 7, 19, 35–37), and site-directed mutagenesis experiments (38) have shown that loop 6, which is far from the dimer interface, closes over the catalytic site in order to prevent formation of methylglyoxal from the enediol intermediate of the isomerization reaction. Here, we explored if events at the catalytic site and/or loop 6 are transmitted to the dimer interface by determining the susceptibility of the interface cysteine of TbTIM and TcTIM to thiol reagents.

TcTIM is far more susceptible to thiol reagents than TbTIM (26). The crystal structure of TcTIM shows that the separation of the dimer interface in the region between loop 1 of one monomer and helix 3 of the other monomer is larger in TcTIM than in TbTIM (13 and see Figure 4). Hence, it is probable that the pathway for the influx of thiol reagents to cysteine 14 is through this region of the enzymes. There are, however, unexplained questions regarding the entrance of thiol reagents to the interface cysteine. Loop 3 of one subunit projects between loops 1 and 4 of the other subunit; in this

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



FIGURE 4: Stereoview of TbTIM (gray) and TcTIM (black) in the region of cysteine 14. The side chain of cysteine 14 of one monomer, displayed in CPK format, is enclosed by loop 3 of the other monomer; in this region no significant difference has been observed in the two TIMs. Also shown is the portion of the interface between loop 1 of one monomer (left side) and helix 3 of the other monomer (right side). The side chains of glutamine 19 of TbTIM and glutamic acid 19 of TcTIM after the end of loop 1 and at the beginning of helix 1 are depicted as sticks. Aspartic acids 86 of TbTIM and TcTIM, at the end of helix 3 and in front of residue 19, are also depicted as sticks. Note that in TbTIM the residues of the two monomers face each other, whereas in TcTIM the side chains point in opposite directions. Also note that the separation between monomers is significantly larger in TcTIM than in TbTIM.

Table 3: Atoms within 4 Å from the Sulfur of the Interface Cysteine of *T. Cruzi*

monomer A			monomer B		
atom	residue	distance	atom	residue	distance
Cp	14(A)	3.3	Cp	14(B)	3.3
Op	14(A)	3.1	Op	14(B)	3.2
CD	68(B)	4.0	CD	68(A)	3.9
CA	71(B)	4.0			
Cp	77(B)	3.9	Cp	77(A)	3.7
Op	77(B)	3.4	Op	77(A)	3.4
			Np	78(A)	3.9
CA	78(B)	3.9	CA	78(A)	3.8
C	78(B)	3.9	C	78(A)	3.8
Np	79(B)	3.4	Np	79(A)	3.3
CB	79(B)	3.7	CB	79(A)	3.7
			OG	79(A)	3.9
CD	82(B)	3.9	CD	82(A)	4.0

arrangement, the side chain of cysteine 14 (Figure 4), which is part of loop 1 (residues 14–19), becomes closely packed within the core of loop 3 (residues 66–79). Indeed, in the two monomers of TcTIM, there are 12 and 13 atoms at a distance of less than 4 Å from the sulfur of the interface cysteine 14 (Table 3). Given the structural arrangement of cysteine 14, the question that arises is how thiol reagents get across loop 3 and react with the sulfur of the interface cysteine. Furthermore, this work shows that catalysis and phosphoglycolate impose an additional barrier to the influx of thiol reagents to the interface cysteine. Thus, there is also the question of how catalysis or the occupancy of the catalytic center by phosphoglycolate affects its derivatization.

In this context, the work of Gracy and co-workers (39) on the deamidation of asparagines 15 and 71 of human and rabbit TIM is particularly relevant. It is known that asparagines adjacent to glycines may undergo a spontaneous reaction that leads to deamidation of asparagines (40). In human and rabbit TIM, asparagines 15 and 71 are followed by glycines, and Gracy and co-workers (41–43) showed that repeated catalytic cycles, or the occupancy of the catalytic site by a substrate analogue, confer to the enzyme a conformation prone for asparagine deamidation. In the resting state, the enzyme hardly undergoes deamidation. Other works showed that deamidation of the two asparagines does not

occur at random; substrate-induced deamidation of asparagine 71 appears before deamidation of asparagine 15 (41, 43).

Asparagine 71 forms part of loop 3; thus, the data of the latter investigators indicate that the occupancy of the catalytic site induces changes in the conformation of loop 3 making asparagine 71 prone to deamidation; indeed, one of their conclusions was that there are connections between the catalytic site and the dimer interface (44). Our data show that the occupancy of the catalytic site by substrate or an analogue has a strong influence on the access of thiol reagents to the cysteine that is entrapped in loop 3. Therefore, it is likely that both substrate-induced deamidation of asparagine 71 of loop 3 and resistance to agents that derivatize the interface cysteine, which is enclosed within loop 3, involve structural changes in the region of loop 3 and the enclosed cysteine.

As noted, loop 3 of one subunit docks between loops 1 and 4 of the other subunit. X-ray studies of TIM in which the association constants between monomers have been largely decreased through alteration of interface residues show that in monomeric TIM the orientations of the side chains of the active site lysine 13 and histidine 96 differ from those in wild-type TIM (21); the disposition of loop 4 is also different, and loop 1 is very mobile. In monomeric TIM, the binding of phosphoglycolate to the catalytic site induces the catalytic site residues to adopt the conformation of the wild type (20) and a tighter packing of loops 1 and 4. As a consequence, it is possible that in dimeric TIM the occupancy of the catalytic site enhances the packing of loops 1 and 4 with the interdigitating loop 3 of the other subunit, thus diminishing the interaction of cysteine 14 with sulfhydryl reagents.

Alternatively, it could be that events at the catalytic center change the geometry of cysteine 14 in relation to the residues in loop 3, and thereby confer a relatively high resistance to thiol reagents. Indeed, there are van der Waals contacts between loop 3 of one subunit and the catalytic lysine 13 of the other subunit. However, we examined the crystal structure of TIM with empty and filled catalytic sites, and failed to detect apparently important differences of intersubunit contacts in the region of loop 3 and the side chain of residue

14. This is in consonance with the data of Lolis and Petsko (30) in yeast TIM, who failed to detect significant differences between empty monomers and monomers filled with phosphoglycolate. This may imply that the entrance of thiol reagents to the interface cysteine depends on fluctuations that occur in this region of the enzyme, and that these are modulated by the state of the catalytic site. In fact, it has been reported that phosphoglycolate increases the thermostability of TIM (20).

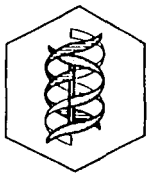
Although at the moment it is not possible to define the precise mechanism through which catalysis or the occupancy of the catalytic site confers resistance to thiol reagents, the present data illustrate that the structural arrangements between loop 3 and the interface cysteine differ in enzymes with empty and filled catalytic sites. Moreover, it is also important that the experiments with phosphoglycolate indicated that there are gradations in the barrier to thiol reagents to the interface cysteine. For example, in TbTIM, phosphoglycolate effectively diminished derivatization by the relatively large and negatively charged DTNB, but it failed to protect against the action of the smaller and neutral MMTS (Figure 3B). Studies with thiol reagents of different chemical characteristics could perhaps yield more information on the structure and properties of the barrier, and also provide data for the design of agents that specifically perturb the interface cysteine of the trypanosomal enzymes.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. P. A. M. Michels (Research Unit for Tropical Diseases, ICP-TROP, Brussels, Belgium) for the TbTIM gene, and Dr. Juan P. Pardo for helpful discussions.

#### REFERENCES

- Albery, W. J., and Knowles, J. R. (1976) *Biochemistry* 15, 5631–5640.
- Alber, T., Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, C., Rivers, P. S., and Wilson, I. A. (1981) *Philos. Trans. R. Soc. London B293*, 159–171.
- Nickbarg, E. B., and Knowles, J. R. (1988) *Biochemistry* 27, 5939–5947.
- Knowles, J. R. (1991) *Nature* 350, 121–124.
- Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. L., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., and Waley, S. G. (1975) *Nature* 255, 609–614.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C., and Petsko, G. A. (1990) *Biochemistry* 29, 6609–6618.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Naeche, S., and Hol, W. G. J. (1991) *J. Mol. Biol.* 220, 995–1015.
- Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Grohmann, A. C., and Martial, J. A. (1993) *Acta Crystallogr. D49*, 403–417.
- Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A., and Hol, W. G. J. (1994) *Protein Sci.* 3, 810–821.
- Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M. D., Martial, J. A., and Hol, W. G. J. (1995) *Protein Sci.* 4, 2594–2604.
- Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P., and Murthy, M. R. N. (1997) *Structure* 5, 751–761.
- Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K., and Maes, D. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 2199–2206.
- Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Pérez-Montfort, R. (1998) *J. Mol. Biol.* 283, 193–203.
- Waley, S. G. (1973) *Biochem. J.* 135, 165–172.
- Zabori, S., Rudolph, R., and Jaenicke, R. (1980) *Z. Naturforsch.* 35, 999–1004.
- Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Gracy, R. W. (1992) *Eur. J. Biochem.* 208, 389–395.
- Schnackerz, K. D., and Gracy, R. W. (1991) *Eur. J. Biochem.* 199, 231–238.
- Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 1515–1518.
- Borchert, T. V., Zeelen, J. P., Schliebs, W., Callens, M., Minke, W., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1995) *FEBS Lett.* 367, 315–318.
- Schliebs, W., Thanki, N., Eritija, R., and Wierenga, R. K. (1996) *Protein Sci.* 5, 229–239.
- Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1997) *Biochemistry* 36, 9655–9662.
- Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramirez, J., Becker, I., Berzanza, M., Landá, A., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Pérez-Montfort, R. (1997) *Eur. J. Biochem.* 244, 700–705.
- Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R., Rojo-Dominguez, A., and Pérez-Montfort, R. (1995) *Chem. Biol.* 2, 847–855.
- Mainfroid, V., Temstra, P., Bècauregard, M., Frere, J.-M., Mande, S. C., Hol, W. G. J., Martial, J. A., and Goraj, K. (1996) *J. Mol. Biol.* 257, 441–456.
- Casal, J. I., Ahern, T. J., Davenport, R. C., Petsko, G. A., and Klibanov, A. M. (1987) *Biochemistry* 26, 1258–1264.
- Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R., and Gómez-Puyou, A. (1998) *Eur. J. Biochem.* 253, 684–691.
- Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J. P., Callens, M., Noble, M. E. M., Oppendorfs, F. R., Michels, P. A. M., and Wierenga, R. K. (1993) *Eur. J. Biochem.* 211, 703–710.
- Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Rojo-Dominguez, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1996) *Eur. J. Biochem.* 241, 114–120.
- Ellman, G. L. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 443–450.
- Lolis, E., and Petsko, G. A. (1990) *Biochemistry* 29, 6619–6625.
- Richard, J. P. (1991) *Biochemistry* 30, 4581–4585.
- Sampson, N. S., and Knowles, J. R. (1992) *Biochemistry* 31, 8482–8487.
- Sampson, N. S., and Knowles, J. R. (1992) *Biochemistry* 31, 8488–8494.
- Williams, J. C., and McDermott, A. E. (1995) *Biochemistry* 34, 8309–8319.
- Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A., and Ringe, D. (1991) *Biochemistry* 30, 5821–5826.
- Noble, M. E. M., Verlinde, C. L. M. J., Groendijk, H., Kalk, K. H., Wierenga, R. K., and Hol, W. G. J. (1991) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 10, 50–69.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., and Davenport, R. C. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 1115–1126.
- Pompliano, D. L., Peyman, A., and Knowles, J. R. (1990) *Biochemistry* 29, 3186–3194.
- Gracy, R. W., Yüksel, K. Ü., and Gómez-Puyou, A. (1995) in *Decamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins* (Aswad, D. W., Ed.) pp 133–155, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Wright, H. T. (1995) in *Decamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins* (Aswad, D. W., Ed.) pp 229–251, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Yuan, P. M., Talent, J. M., and Gracy, R. W. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 671, 211–218.
- Yüksel, K. Ü., and Gracy, R. W. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 248, 452–459.
- Sun, A. Q., Yüksel, K. Ü., and Gracy, R. W. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 382–390.
- Sun, A. Q., Yüksel, K. Ü., and Gracy, R. W. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 20168–20174.



ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.  
AMP-90092BQ62

**REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA**

Facultad de Medicina  
Departamento de Bioquímica  
Apartado Postal: 70-281  
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de enero de 2003

**AUTOR: Gloria Hernández-Alcántara**

Por este medio les notificamos que su artículo titulado: "EN BUSCA DE NUEVOS FÁRMACOS CONTRA ALGUNOS TRIPANOSOMÁTIDOS", será publicado en la Revista de Educación Bioquímica REB correspondiente al Vol. 22 No. 1 marzo 2003.

Esperando tener nuevamente noticias tuyas, reciban un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

**Dr. José Víctor Calderón Salinas**  
Editor en Jefe

Para cualquier comunicación contactar a Marivel Rojas García  
Asistente Editorial REB, Tel. 5623-2170; Fax: 5616-2419  
Correo electrónico: reb@laguna.fmedic.unam.mx

JVCS-mrg

# EN BUSCA DE NUEVOS FÁRMACOS CONTRA ALGUNOS

## TRIPANOSOMÁTIDOS

Gloria Hernández-Alcántara

Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apartado Postal 70-242, C.P. 04510. México D.F. Tel. 5622-5657, Fax 5622-5630. Correo E: ghernan@ifisiol.unam.mx

Titulo breve: Diseño de fármacos contra tripanosomátidos

### RESUMEN

La enfermedad del sueño, la enfermedad de chagas y la leishmaniasis son enfermedades causadas por diferentes tripanosomátidos, principalmente en países en vías de desarrollo. El diseño de inhibidores que se puedan utilizar como guías para nuevos fármacos contra estas enfermedades es actualmente de interés, tanto para grupos de investigación básica como para entidades del servicio público. Modelos matemáticos del control de flujo del metabolismo glicolítico y estudios de varias enzimas de esta vía con diversos inhibidores sugieren a la glicólisis como blanco para el diseño de un nuevo fármaco, ya que representa la fuente principal de energía para estos parásitos.

**PALABRAS CLAVE:** Tripanosomátido, diseño racional de fármacos, inhibidores especie-específicos, knockout de genes.

### ABSTRACT

Sleeping sickness, chagas' disease and leishmaniasis are diseases caused by different trypanosomatids in developing countries. The design of new inhibitor drugs for these diseases is nowadays of particular interest for basic research groups or government agencies. A mathematical model of glycolytic flux and studies with inhibitors of different glycolytic enzymes strongly suggest that enzymes involved in glycolysis can be used as a good targets

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**



# EN BUSCA DE NUEVOS FÁRMACOS CONTRA ALGUNOS

## TRIPANOSOMÁTIDOS

Gloria Hernández-Alcántara

Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apartado Postal 70-242, C.P. 04510. México D.F. Tel. 5622-5657, Fax 5622-5630. Correo E: gherman@ifisiol.unam.mx

Titulo breve: Diseño de fármacos contra tripanosomátidos

### RESUMEN

La enfermedad del sueño, la enfermedad de chagas y la leishmaniasis son enfermedades causadas por diferentes tripanosomátidos, principalmente en países en vías de desarrollo. El diseño de inhibidores que se puedan utilizar como guías para nuevos fármacos contra estas enfermedades es actualmente de interés, tanto para grupos de investigación básica como para entidades del servicio público. Modelos matemáticos del control de flujo del metabolismo glicolítico y estudios de varias enzimas de esta vía con diversos inhibidores sugieren a la glicólisis como blanco para el diseño de un nuevo fármaco, ya que representa la fuente principal de energía para estos parásitos.

**PALABRAS CLAVE:** Tripanosomátido, diseño racional de fármacos, inhibidores específico-específicos, knockout de genes.

### ABSTRACT

Sleeping sickness, chagas' disease and leishmaniasis are diseases caused by different trypanosomatids in developing countries. The design of new inhibitor drugs for these diseases is nowadays of particular interest for basic research groups or government agencies. A mathematical model of glycolytic flux and studies with inhibitors of different glycolytic enzymes strongly suggest that enzymes involved in glycolysis can be used as a good targets

for the design of a new drug, since this metabolic pathway represents the main source of energy for these parasites.

**KEY WORDS:** Trypanosomatid, rational drug design, species-specific inhibitor, gene knockout.

## INTRODUCCIÓN

Los tripanosomátidos son un grupo de parásitos protozoarios de importancia médica y veterinaria e incluyen a *Leishmania* spp y *Trypanosoma* spp. Sus ciclos de vida son bastante complejos y consisten de cambios morfológicos dramáticos entre los estadios dentro del insecto vector y en el hospedero vertebrado. Algunos miembros del grupo son: *Trypanosoma brucei*, agente causante de la enfermedad del sueño en los humanos y nagana en el ganado dentro del continente africano, *Trypanosoma cruzi*, que causa la enfermedad de chagas en América central y del sur, y *Leishmania* spp, que causa la leishmaniasis de tipo visceral, cutánea y mucocutánea en países tropicales (1).

## CARACTERÍSTICAS DE LAS ENFERMEDADES

La enfermedad del sueño, puede producirse por 2 especies de tripanosomas: *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *T. b. gambiense*, y se transmite al humano por el piquete de la mosca tsetse (género *Glossina* spp). Cuando los tripanosomas se introducen en el torrente sanguíneo del hospedero, proliferan hasta invadir el sistema nervioso central y, finalmente, el estado terminal de la tripanosomiasis se manifiesta por una meningoencefalitis crónica. Existen dos categorías clínicas de la enfermedad del sueño dependiendo de que sub-especie es la causante. El intervalo entre el inicio de la infección por *T. b. gambiense* y el estado encefalítico puede ser desde 2 hasta 8 años. En contraste, el intervalo en la infección por *T. b. rhodesiense* es más corto; el promedio es alrededor de 8 meses a un año, pero, finalmente las manifestaciones

son las mismas para ambas especies (1). Se calcula aproximadamente que 35 millones de personas en 36 ciudades de Africa están expuestas a contraer la enfermedad.

La enfermedad de chagas o tripanosomiasis americana se produce por *Trypanosoma cruzi*, el cual se transmite a los humanos por diferentes vías: transfusión sanguínea, leche materna, trasplante de órganos, transmisión congénita o por el piquete de triatomas, conocidos vulgarmente como "chinchas besuconas" (subfamilia Triatominae) (1). La enfermedad se presenta en dos etapas: la aguda y la crónica. La fase aguda se observa después de un breve periodo de incubación. Entre el 2 y el 8 % de los casos presentan síntomas graves que llevan a la muerte. No obstante, en la mayoría de los casos no se presenta ningún síntoma característico, por lo que frecuentemente no se detecta y el paciente puede llegar a la fase crónica. En la fase crónica la mortalidad es cercana al 40 %. La organización mundial de la salud estima que aproximadamente 16 a 18 millones de personas están infectados con *T. cruzi*.

La leishmaniasis es causada por 20 especies diferentes del género *Leishmania* y se transmite por los insectos de los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomyia*. La enfermedad puede ser cutánea, visceral o mucocutánea (1). Durante los últimos 10 años se ha incrementado la enfermedad en su forma visceral, ya que surge como una infección oportunista importante en pacientes inmunosuprimidos, especialmente en aquellos infectados con HIV (2). Se reportan aproximadamente cerca de 2 millones de nuevos casos de leishmaniasis cada año en 88 países, que comprenden las zonas tropicales con 367 millones de personas potencialmente expuestas.

## **DISEÑO DE VACUNAS Y LA VARIACIÓN ANTIGÉNICA**

Se ha intentado controlar estas enfermedades utilizando vacunas, pero no se ha tenido mucho éxito, debido a que algunos de estos organismos son intracelulares y, los que no lo son, han

desarrollado uno de los mecanismos más elaborados de variación antigénica para evadir la respuesta inmunológica del hospedero.

Cuando el tripanosoma está en la sangre del mamífero, está cubierto por una capa densa de glicoproteínas de superficie variable (VSG), que protegen a las proteínas de membrana y previenen la lisis del parásito por los componentes del suero. La variación antigénica del parásito en la sangre, y su consecuente evasión de la respuesta inmunológica del hospedero, se debe a que contiene cerca de 1000 genes VSG. Sólo se expresa un gen VSG a la vez y, el cambio de VSG, se da en una baja frecuencia. La glicoproteína está ligada a través de su grupo carboxilo terminal a una forma glicosilada del fosfatidilinositol. De esta forma se confiere un anclaje, unión de la proteína a la membrana, y un lugar de ruptura cuando el organismo sustituye una glicoproteína de superficie por otra. Este mecanismo evoca una fuerte respuesta inmunológica, que resulta en la destrucción cíclica de la mayor parte de la población de tripanosomas (3). Sin embargo, poblaciones menores, que han cambiado su VSG, sobreviven y se reproducen, repitiéndose el ciclo.

## FÁRMACOS

Existen muy pocos fármacos contra los tripanosomátidos de los cuales la mayoría producen graves efectos colaterales. Además para algunos de estos fármacos ya se han encontrado cepas resistentes (4). Uno de los fármacos más usados contra *T. brucei* es la pentamidina. Se utiliza en las fases tempranas de la infección, con resultados satisfactorios en la mayoría de los casos; sin embargo, el pronóstico no es bueno cuando el parásito ya ha invadido el sistema nervioso central. El melarsoprol se utiliza en las fases tardías de la enfermedad, pero presenta efectos secundarios que pueden ser fatales. La eflornitina, el fármaco más reciente, tiene efectos graves. Generalmente el tratamiento consiste en administrarlo intravenosamente en grandes cantidades a pacientes hospitalizados (5). El suramin se ha utilizado como medicamento para la enfermedad del sueño en las fases iniciales durante los últimos 70 años y

los efectos secundarios que produce generalmente son graves. Para la enfermedad de chagas se utilizan como fármacos el nifurtimox y el benznidazole. Con ellos se puede curar hasta el 90 % de los casos durante la fase aguda, pero no tienen ningún efecto en pacientes que desarrollaron la fase crónica. Lamentablemente ambos fármacos también producen graves efectos colaterales y se ha sugerido que pueden causar neoplasias (6). Para la leishmaniasis se utilizan con poco éxito la pentamidina y la paramomicina. El medicamento principal es la anfotericina B, el cual aunque es altamente activo, también es muy tóxico y sumamente caro (2). Considerando este panorama, existe la necesidad de diseñar fármacos más efectivos y menos tóxicos contra este tipo de enfermedades.

## DISEÑO DE FÁRMACOS BASADO EN LA ESTRUCTURA

Algunas investigaciones consideran que el diseño de fármacos basado en la estructura de proteínas, para el tratamiento de estas enfermedades tiene grandes probabilidades de éxito (7). Este método se basa en diseñar fármacos utilizando la estructura tridimensional de proteínas blanco. La estrategia consiste en buscar sistemáticamente moléculas capaces de unirse con alta selectividad a las proteínas blanco mediante simulaciones virtuales. Después de encontrar uno o varios compuestos que se unen a la proteína blanco, se proponen variaciones estructurales de los mismos tratando de encontrar nuevos compuestos que, de acuerdo al modelado computacional, podrían presentar una afinidad más selectiva por la proteína. El siguiente paso es sintetizarlos o adquirirlos comercialmente y probarlos *in vitro*. En un ejemplo reciente, por medio de estudios comparativos entre las estructuras cristalográficas de las enzimas gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de humano y de tripanosomas, fue posible diseñar un inhibidor de alta afinidad: la N<sup>6</sup>-(1-naftalenemetil)-2'-(3-clorobenzamido) adenosina, contra la GAPDH tripanosomal. El sitio de unión para el grupo adenosina del NAD<sup>+</sup>, muestra grandes diferencias entre las enzimas del parásito y de humano. Notablemente, en la GAPDH del parásito existe una hendidura hidrofóbica adyacente al

hidroxilo-2' de la ribosa de la adenosina. Esta hendidura no existe en la enzima del humano, lo que permitió diseñar dicho inhibidor, mismo que tuvo una  $IC_{50}$  de 0.3  $\mu$ M. Dicho compuesto es capaz de inhibir el crecimiento de cultivos de *T. brucei*, promastigotes de *Leishmania* y amastigotes de *T. cruzi* a concentraciones micromolares, sin afectar el crecimiento de fibroblastos humanos (8).

## INHIBICIÓN DE LA VÍA GLICOLÍTICA EN TRIPANOSOMAS

Se ha demostrado que la interrupción de la vía glicolítica en tripanosomas permite la eliminación del parásito (9). En el torrente sanguíneo de los mamíferos las mitocondrias de *T. brucei* no son funcionales y su única fuente de energía proviene del catabolismo de la glucosa. En ese caso *T. brucei* depende exclusivamente de la glicólisis para generar el ATP requerido para su proliferación y maduración celular (10). *T. cruzi* se multiplica en el interior de las células que invade, y sus mitocondrias se encuentran funcionales durante todo su ciclo de vida. A pesar de que *T. cruzi* consume 10 veces menos glucosa en comparación con *T. brucei*, se ha determinado que la utilización de la glucosa es la vía metabólica preferida de este parásito. Es por ello que se piensa que una estrategia adecuada para resolver una infección por estos parásitos es bloquear una o más de las enzimas de la glicólisis, para impedir la generación de energía que los tripanosomas necesitan para su sobrevivencia (1,11) (Fig. 1).

En 1997 Bakker y colaboradores (12) propusieron un modelo matemático del control de flujo del metabolismo glicolítico en *T. brucei*. Utilizaron los datos experimentales de las constantes cinéticas y de equilibrio de las enzimas de la vía glicolítica para alimentar el modelo. Con él pudieron predecir la contribución de las enzimas del metabolismo glicolítico al control de flujo, aún cuando en él las condiciones aerobias y anaerobias sean diferentes. Basándose en este mismo modelo, Eissenthal y Cornish-Bowden en 1998 (13) modelaron la inhibición de las enzimas de la glicólisis. Su estudio llegó a la conclusión de que para lograr dicha inhibición usando un inhibidor competitivo, sólo se puede emplear al transportador de piruvato como

blanco. Esto se debe a que el piruvato producido por *T. brucei* en su forma sanguínea se excreta al torrente sanguíneo del hospedero junto con un protón, mediante un acarreador de difusión facilitada tipo simporte. Este acarreador es necesario para la regulación del pH intracelular. La inhibición del transporte produciría acumulación de piruvato dentro del tripanosoma y por lo tanto, acidificación del citosol. Esto como consecuencia produciría la muerte del tripanosoma por desestabilización osmótica. En cambio con un inhibidor no-competitivo e irreversible, es decir, con una inhibición del 100 % de la glicólisis, cualquier enzima de la vía glicolítica se puede utilizar como blanco potencial para el diseño de fármacos.

### **INHIBIDORES ESPECIE-ESPECÍFICOS**

Se han planteado otras estrategias en el diseño racional de fármacos. Algunas investigaciones se enfocan sobre enzimas que solo existen en el parásito (9), mientras que otros trabajos intentan producir inhibidores dirigidos contra el sitio activo de enzimas que existen tanto en el parásito como en el hospedero (14). Esta última estrategia es difícil porque el sitio activo de una enzima generalmente está altamente conservado, aún en especies muy separadas por la evolución. El problema también se ha abordado tratando de diseñar inhibidores especie-específicos de enzimas. La hipótesis de esta estrategia plantea que es necesario identificar un aminoácido no conservado que sea importante para la función y estabilidad de la enzima de una especie en particular. Un agente que modifique a tal residuo podría inhibir la función de la enzima de esta especie, teniendo poco o ningún efecto sobre la actividad de la enzima homóloga de otras especies que posean un residuo diferente en esta posición (11). La enzima glicolítica con la que se está probando dicha hipótesis es la triosafosfato isomerasa (TIM) (en la fig. 1 ver la reacción que cataliza). La TIM es una enzima dimérica, con una estructura de barril  $\alpha/\alpha$ . Se cuenta con la estructura cristalográfica de la TIM de por lo menos 12 especies (entre ellas las de 5 parásitos) y se conoce con gran detalle su mecanismo de reacción. Una

parte de la enzima lo constituye la región de la interfase entre ambos monómeros, formada por 32 residuos (del asa 1 al asa 4). Dicha región es importante para la estabilidad del dímero. Se ha propuesto un aminoácido no conservado, el residuo 14 de la región de la interfase, que se encuentra en el asa 1, como blanco para el diseño de inhibidores especie-específicos. Del análisis de secuencias de aminoácidos de diferentes TIMs se ha postulado a la cisteína 14 (residuo que poseen principalmente tripanosomátidos) como un sitio estratégico de inhibición. Mediante el uso de derivatizantes de grupos sulfhidrilo Gómez-Puyou y col (11) lograron inhibir la actividad de las TIMs de diferentes tripanosomátidos. Sin embargo, bajo las mismas condiciones la actividad de la TIM de humano, cuyo residuo en la posición 14 esta ocupado por una metionina, no se inhibió. Otra diferencia entre las enzimas de ambas especies es la región del asa 3 que rodea al residuo en la posición 14. Dicha diferencia consiste en que el asa 3 es un aminoácido más larga para la TIM de humano (treonina 72) que la de los tripanosomátidos (Fig. 2). Por otra parte, la importancia del asa 3 y el residuo 14 para la estabilidad del dímero se han estudiado en gran detalle. En estudios de la estructura cristalográfica de la TIM de *T. cruzi* en solventes orgánicos (método que permite identificar sitios de unión de moléculas orgánicas hidrofóbicas, mismos que pueden representar regiones a donde pueden llegar a interactuar fármacos) se encontraron dos moléculas de hexano localizadas a menos de 4 Å de los residuos isoleucina 69 y fenilalanina 75 la región de la interfase del dímero de un monómero, estos dos residuos rodean a la cisteína 15 del otro monómero (Fig. 3, marcada como Cys315). La cercanía de los dos hexanos a la región de la interfase confirma aún más el interés de esa cisteína como blanco potencial para el diseño de fármacos (15).

### **“KNOCKOUT” DE GENES**

El “knockout” de genes es un método utilizado para investigar directamente la importancia y función de un gen. Se puede utilizar para averiguar si un gen es esencial para la supervivencia



de una célula y posteriormente utilizar su producto como blanco para el diseño de fármacos. En años recientes se ha estudiado la posibilidad de usar el "knockout" de genes en tripanosomátidos; algunos de estos estudios se han realizado principalmente durante el crecimiento de parásitos en condiciones de cultivo. Un ejemplo de un gen que no es requerido en un estado del ciclo de vida, pero que es esencial en otro, es el de una MAP cinasa de *Leishmania mexicana* que participa en la señalización celular. Los promastigotes mutantes y carentes de Map quinasa son viables y fenotípicamente similares al silvestre. Sin embargo, son incapaces de infectar macrófagos, lo que implica que el gen es esencial para la sobrevivencia del parásito en el hospedero. Esta Map quinasa es un blanco prometedor para el diseño de fármacos específicos contra el parásito, siempre y cuando no se afecte la enzima del hospedero mamífero.

La enzima ornitín descarboxilasa (ODC) de *T. brucei* es inhibida por el inhibidor D, L- $\alpha$ -difluoro metil ornitina. Este fármaco se usa clínicamente en la enfermedad del sueño causada por *T. b. gambiense*. La ODC esta involucrada en los primeros pasos de la biosíntesis de poliaminas, pero su inhibición en este paso puede ser eludida por la presencia de altas concentraciones de poliamina exógena. Con respecto a esto ya se tienen mutantes nulas de ODC en *T. brucei*. En estas mutantes, carentes de poliaminas, se produce citostasis y, finalmente, los parásitos mueren. Así se ha demostrado que la falta de ODC es letal *in vitro* bajo las condiciones estudiadas (16).

## LIMITACIONES PARA LA INTRODUCCIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS

Los criterios para permitir la introducción de un nuevo compuesto al mercado farmacéutico son sumamente estrictos y difíciles de llenar y esta es la principal razón por la cual la mayoría de los compuestos con actividad farmacológica nunca llegan a convertirse en fármacos útiles. La identificación y las pruebas clínicas de un nuevo fármaco llevan, un promedio de 12 años o más (17). Es por eso que un acercamiento "racional" hacia el descubrimiento de fármacos es

atractivo para las compañías farmacéuticas debido a que promete acelerar este proceso. Un hecho desafortunado, es la falta de interés de las compañías farmacéuticas por las enfermedades parasitarias más predominantes en el tercer mundo. La razón económica de esta situación es evidente, ya que la economía de los países en vías de desarrollo, donde estas enfermedades predominan, no puede proveer las ganancias deseadas. Es por ello que los esfuerzos por avanzar la investigación en el campo ha quedado en manos de grupos de científicos académicos y del sector público (17).

## CONCLUSIÓN

La posibilidad de identificar inhibidores selectivos de enzimas de la glicólisis de tripanosomas se considera muy prometedor. Dichos inhibidores pueden ser utilizados como guías para nuevos fármacos. A pesar de que la glicólisis es una vía altamente conservada, se pueden identificar diferencias estructurales y cinéticas en la mayoría de las enzimas tripanosomales comparadas con su equivalente en los humanos. En una gran variedad de casos estas diferencias han permitido el diseño y síntesis de inhibidores selectivos. Algunos de estos inhibidores han bloqueado la glicólisis en los parásitos y retardado su crecimiento en cultivos sin tener efecto sobre células de mamífero. En futuras investigaciones se podrá optimizar su afinidad y evaluar *in vivo* su actividad, toxicidad, dosificación, efectos carcinogénicos, mutagenicidad y farmacocinética para lograr obtener fármacos con altísima especificidad y efectos colaterales mínimos.

## REFERENCIAS

1. Verlinde C L M J, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Périé J J, Fothergill-Gilmore L A, Operdoes F R, Gelb M H, Hol W G J y Michels P A M (2001) Glycololysis as a target for the design of new anti-trypansome drugs. *Drug Resist Updat* 4: 50-65.
2. Croft S L y Yardley V (2002) Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 8:319-342.

3. Boothroyd J C (1985) Antigenic variation in African trypanosomes. *Ann Rev Microbiol* 39: 475-502.
4. Murta S M F y Romanha A J (1998) Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Parasitology* 116: 165-171.
5. Barrett M P y Fairlamb A H (1999) The biochemical Basis of arsenical-Diamide crossresistance in african trypanosomes. *Parasitol Today* 15: 136-140.
6. Bocchi E A, Higuchi M D, Viera L C, Stolf N, Belloti G, Fiorelli A, Janete A y Pileggi F (1998) Higher incidence of malignant neoplasms after heart transplantation for treatment of chronic Chagas' heart disease. *J Heart and Lung Transp* 17: 399-405.
7. Verlinde C L M J y Hol W G J (1994) Structure-based drug design: progress, results and challenges. *Structure* 2: 577-587.
8. Arnov A M, Suresh S, Buckner F S, Van Voorhis W C, Verlinde C L M J, Opperdoes F R Hol W G J y Gelb M H (1999) Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4273-4278.
9. Fairlamb A H y Cerami A (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* 46: 695-729.
10. Sommer J M y Wang C C (1994) Targeting proteins to the glycosomes of African trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 48: 105-138.
11. Gómez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga R A, Rojo-Domínguez A, y Pérez-Montfort R (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action-studies with triosephosphate isomerase. *Chem Biol* 2: 847-855.
12. Bakker B M, Michels P A M, Opperdoes F R y Westerhoff H V (1997) Glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei* can be understood in terms of the kinetics of the glycolytic enzymes. *J Biol. Chem* 272: 3207-3215.

13. Eissenthal R y Conish-Bowden A (1998) Prospects for antiparasitic drugs. The case of *Trypanosoma brucei*, the causative agent of african sleeping sickness. *J Biol Chem* 273: 5500-5505.
14. Verlinde C L M J, Merritt E A, Akker V A F, Kim H, Feil I, Delboni L F, Mande S C, Sartaty S, Petra P H y Hol W G J (1994) Protein crystallography and infectious diseases. *Protein Sci* 3: 1670-1686.
15. Gao X G, Maldonado E, Pérez-Montfort R, Garza-Ramos G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. y Rodríguez-Romero A (1999) Cristal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10062-10067.
16. Barrett M P, Mottram J C y Coombs G H (1999) Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. *Trends Microbiol* 7: 82-88.
17. Hunter W H (1997) A structure-based approach to drug discovery; crystallography and implications for the development of antiparasite drugs. *Parasitology* 114: 17-29.

### Pies de figura

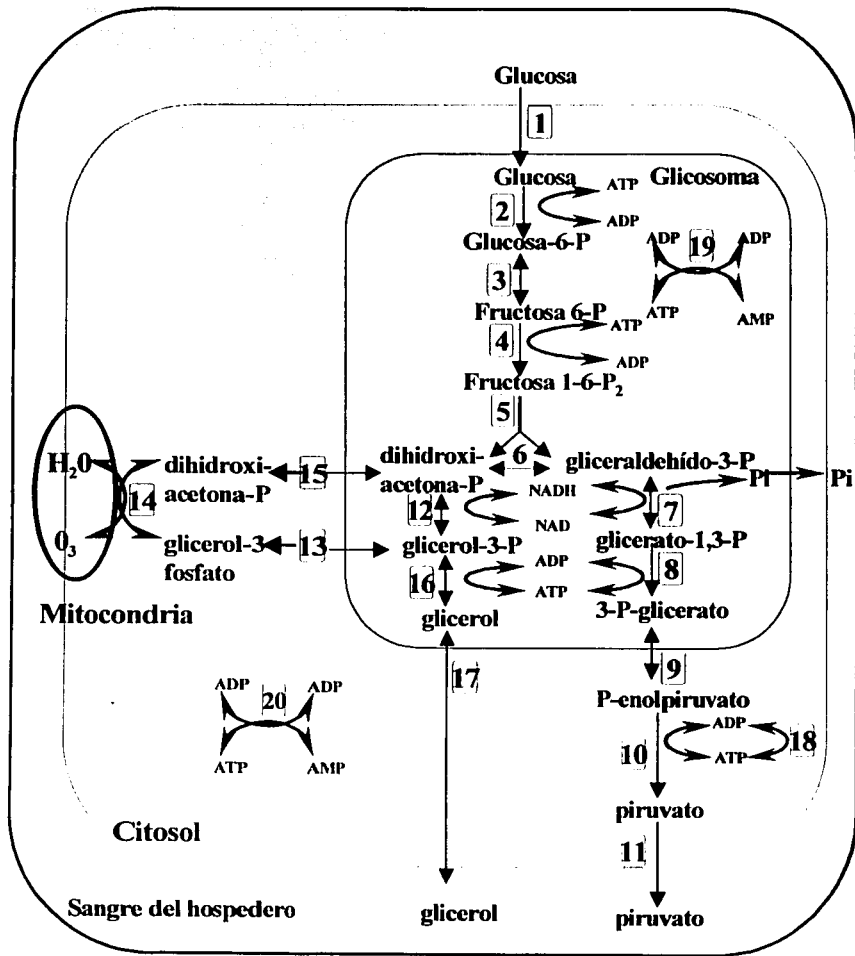
Figura 1. La figura muestra la vía metabólica de la glicólisis de *Trypanosoma brucei* en su forma sanguínea. Los números indican las enzimas como sigue: 1. transporte de glucosa, 2. hexocinasa, 3. hexosa-fosfato isomerasa, 4. fosfofructocinasa, 5. aldolasa, 6. triosafosfato isomerasa, 7. gliceraldehído-3-fosfato isomerasa, 8. 3-fosfoglicerato quinasa, 9. fosfoglicerato mutasa, 10. piruvato quinasa, 11. transporte de piruvato, 12. glicerol-3 fosfato deshidrogenasa, 13. transporte del glicerol 3-fosfato, 14. oxidación mitocondrial del glicerol-3 fosfato, 15. transporte de la dihidroxiacetona fosfato, 16. glicerol quinasa, 17. transporte del glicerol, 18. procesos que convierten ATP en ADP, 19. miocinasa glicosomal, 20. miocinasa citosólica (tomado de la referencia 1).

Figura 2. Se muestra una sobreposición del asa 3 de la TIM de humano (en gris) y de *T. cruzi* (en negro) alrededor de la metionina 15 del otro monómero de la TIM de humano. Se puede observar la mayor amplitud del asa 3 de la enzima de humano con respecto a la del tripanosoma, lo que concuerda con el mayor espacio ocupado por la cadena lateral de la metionina con respecto al ocupado por la cadena lateral de la cisteína. Las coordenadas cristalográficas se obtuvieron de los archivos del PDB 1HTI (para la TIM de humano) y 1TCD (para la TIM de *T. cruzi*).

Figura 3. Posición de dos hexanos (Hex2 y Hex3) en la estructura de cristal de *T. cruzi* en la región cercana a la cisteína 15 de la interfase (Cys 315) (tomado de la referencia 15).

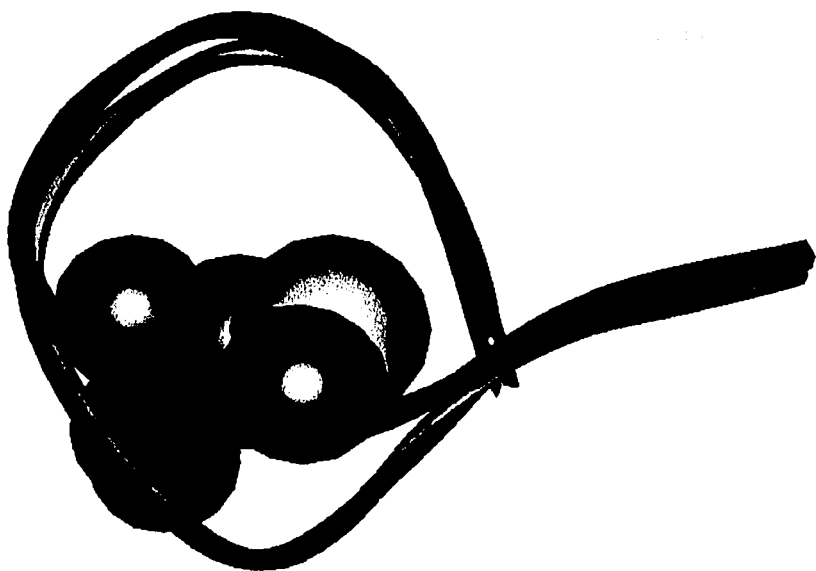
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 1.



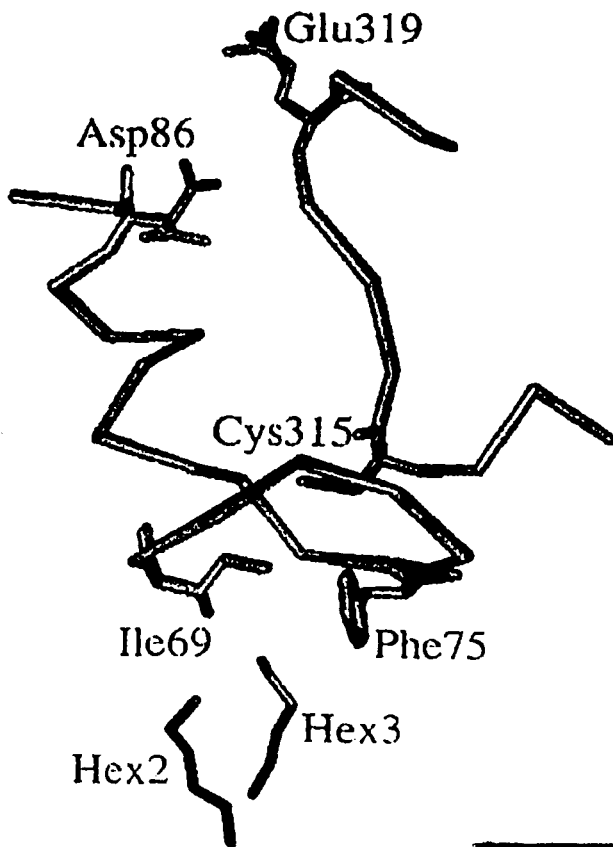
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 2.



FESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 3.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN