



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Caracterización de mutantes en las tirosinas
102 y 103 de la Triosafosfato Isomerasa de
Trypanosoma cruzi.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

Marilu Torres Martínez

Tutor: Dr. Ruy Pérez Montfort



MÉXICO, D. F.

2008



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.

"Caracterización de mutantes en las tirosinas 102 y 103 de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*"

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dr. Ruy Pérez Montfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Georgina Garza Ramos	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

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

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto 49872-M y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN200507.

El jurado de examen de grado estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Alfredo Torres Larios	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Suplente	Dr. José de Jesús García Trejo	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM

“Quién pretenda felicidad y sabiduría constante deberá acomodarse a frecuentes cambios”

Confucio

A mí esposo, por su infinito amor, cariño, apoyo y comprensión

Con todo mi amor:

♥ *A mi papá y mi mamá por ser los mejores del mundo, porque sin ellos y sus enseñanzas no estaría aquí ni sería quien soy ahora.*

♥ *Mi hermana, a ti, por tu ayuda, apoyo, comprensión, por ser parte de mí.*

♥ *A mis sobrinos Osmelito y Melanie, que son la alegría de mi vida, por su futuro.*

Agradecimientos:

Dr. Ruy Pérez Montfort, gracias por aceptarme realizar la tesis de maestría bajo su dirección, por todo el apoyo académico y económico que me brindó, por su paciencia, ayuda y buenos consejos. Gracias !!!.

A la Universidad Autónoma de México, por hacerme crecer académicamente y como persona, por las experiencias tan bonita y enriquecedora que me permitió vivir.

Nallely Cabrera, no tengo palabras como agradecerte, por tu paciencia, disponibilidad y generosidad, por compartir tu experiencia y conocimientos siempre, por tu dedicación y profesionalidad. Te admiro mucho. **¡Muchas gracias!**

Itzhel García Torres, gracias por todo tu apoyo, tus consejos tan certeros, por los momentos de diversión y tristeza que compartimos y hasta por tus bromas, jajaja.

Alejandro Flores, muchas gracias por toda tu ayuda, tus pláticas, por tu excelente trabajo y todo el empeño que pones en él. Por esos detallazos que nos hacen sentir consentidos.

Dr. Armando Gómez Puyou y la Dra. Georgina Garza Ramos por su asesoría y ayuda en mi formación académica.

Un agradecimiento especial al Dr. Rodrigo Arreola Alemón, por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de la tesis, por su disposición y ayuda en todo momento.

Dr. Alfredo Torres Larios, muchas gracias por sus muy buenos consejos, su apoyo y asistencia durante la realización de este proyecto.

A todos mi compañeros del laboratorio 201-Ote, con quién he compartido momentos estupendos.

Nallely, Itzhel, Enriquito, ha sido muy importante para mi haberlos conocido. Gracias por toda la ayuda que me brindaron, por esas pláticas en las que tanta veces arreglamos el mundo y nuestros problemas, en que ajustamos nuestros defectos y me hicieron mejor persona. De cada uno de ustedes he aprendido. Gracias!!. Los quiero.

Angeliquita y Maru, gracias por los buenos momentos y por dar tanta alegría, haciendo la convivencia más agradable.

Alma Escalona, muchas gracias por tus consejos, lecciones, recomendaciones, y por todo esos momentos buenos que compartimos.

A mis tios: Angelin y Marisol, por sus porras y buenos consejos.

Kendra, Yami, Yara e Iva, muchas gracias amigas!!. Quiero compartir esta alegría con ustedes que siempre han estado a mi lado. Las quiero mucho.

Luis, Marilyn, Marilincita, Brenda y Karen, por todo su cariño y amor; tía, gracias por tu apoyo.

Tengo que agradecer también a Beatriz Aguirre, por su asistencia y orientación técnica y a María del Rocío Romualdo por toda la disposición y ayuda brindada.

Quiero dar un agradecimiento muy especial a Leticia García y Adelina González del posgrado de Ciencias Bioquímicas, por su magnífico trabajo y disposición en todo momento.

INDICE

INDICE.....	I
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Enfermedad de Chagas	2
1.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.1.2 Patogenia de la enfermedad de Chagas.....	4
1.1.3 Prevención y control de la enfermedad de Chagas.....	5
1.2 Enzimas oligoméricas como blanco para el diseño de fármacos	6
1.3 Triosafofato isomerasa	9
1.3.1 Aspectos generales.....	9
1.3.2 Propiedades catalíticas de la Triosafofato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.3.3 Propiedades estructurales de la TcTIM	12
1.3.4 Interfase de la Triosafofato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
2. ANTECEDENTES	15
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo general	23
3.2 Objetivos particulares.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1 Diseño de oligonucleótidos mutagénicos.....	24
4.2 Mutación puntual dirigida en la TcTIM por PCR	24
4.3 Clonación en un vector de expresión.....	26
4.4 Expresión de las mutantes.....	28
4.5 Purificación de las mutantes	29
4.6 Determinación de la actividad catalítica.....	31
4.7 Determinación de parámetros cinéticos.....	31
4.8 Estabilidad a la dilución.....	32
4.9 Ensayos de inhibición con el compuesto 8.....	32
4.10 Cristalización y colecta de datos.....	33
4.11 Determinación del área accesible al solvente.....	34
4.12 Análisis de interacciones Cation – pi	34
4.13 Efecto de Cloruro de Sodio y Cloruro de Amonio en la actividad.....	35
4.14 Ensayos de inactivación por Metilmetanotiosulfonato	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
5.1 Mutación de los genes que codifican para las enzimas mutantes.....	36
5.2 Ligaciones y digestiones	37
5.3 Ensayos de sobreexpresión de las enzimas mutantes a diferentes temperaturas	39
5.4 Purificación de las proteínas recombinantes	40
5.5 Caracterización cinética	44

5.6 Efecto de la estabilidad a la dilución	45
5.7 Ensayos de inhibición con el compuesto 8	49
5.8 Obtención y análisis de la estructura cristalina	52
5.9 Análisis de las interacciones Cation-pi	55
5.10 Análisis de área accesible al solvente	56
6. CONCLUSIONES	59
7. PERSPECTIVAS	60
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
APÉNDICE	67
A1. Efecto de Cloruro de Sodio y Cloruro de Amonio en la actividad	67
A2. Ensayos de inactivación por Metilmetanotiosulfonato	68

ABREVIATURAS

ASA	Area accesible al solvente
ChTIM	Triosafosfato isomerasa de pollo
Compuesto 10	Ácido 2-(2-(4-aminofenil) benzotiazol)-6-metil benzotiazol-7-sulfónico
Compuesto 8	Ácido 3-(2 benzotiazolil-tio)-1 propanosulfónico
Compuesto 9	Ácido 2-(p-aminofenil)-6-metil benzotiazol-7-sulfónico
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTT	Ditiotreitol
E	Energía
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido 1-(4-aminobenzil)etilendiamino -N, N, N', N'-tetraacético
EhTIM	Triosafosfato isomerasa de Entamoeba histolytica
FPLC	"Fast protein liquid chromatography"
G3P	D-Gliceraldehido 3 fosfato
α -GDH	α -Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
H ₁ , H ₂ , H ₃	Moléculas de hexano
HTIM	Triosafosfato isomerasa de humano
I ₅₀	Concentración del compuesto que induce el 50% de la inactivación
IPTG	Isopropil - β -D tiogalactopiranosido
K _{cat}	Constante catalítica
K _d	Constante de disociación
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria-Bertani
LmTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Leishmania</i>
MES	Ácido 2-N-morfolino etanosulfónico
MMTS	Metili metano tiosulfonato
n	número de Hill
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Dinucleótido de nicotamida y adenina reducido
NaN ₃	Azida de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fenil metano sulfonil fluoruro
RMS	"Root Mean Square" - Raíz de la media cuadrática
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
Tc, <i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

TcTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA	Trietanolamina
TIM	Triosafosfato isomerasa
V _{máx}	Velocidad máxima
V _o	Velocidad inicial
Y102V	Mutante de TcTIM con Val en la posición 102
Y103V	Mutante de TcTIM con Val en la posición 103
Y102V/Y103F	Mutante de TcTIM con Val en la posición 102 y Phe en la posición 103
Y103F	Mutante de TcTIM con Phe en la posición 103
Y102F/Y103F	Mutante de TcTIM con Phe en la posición 102 y 103

RESUMEN

Según la OMS actualmente hay 15 millones de personas infectadas con el parásito *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad de Chagas, también conocida como Mal de Chagas o Tripanosomiasis americana, lo que provoca 12,500 muertos al año. Muchos grupos de investigación se han enfocado a las enzimas de la vía glucolítica como diana para el diseño de nuevos fármacos contra esta enfermedad. La Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), es una enzima de la vía glicolítica que cataliza la interconversión de gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato y requiere estar en forma homodimérica para ser activa. El sitio catalítico de la enzima se ha mantenido altamente conservado en las diferentes especies a través de la evolución, así que la interfase entre los dos monómeros, que es una zona menos conservada, constituye una mejor opción como diana para el diseño de inhibidores especie específicos dirigidos contra esta región de la proteína.

Buscando sitios de unión de moléculas orgánicas a la proteína, en previos trabajos, nuestro grupo cristalizó la TcTIM en presencia de hexano. El cristal mostró la presencia de tres moléculas de este compuesto asociadas a la TcTIM, de las cuales dos se encuentran a menos de 4 Å de algunos aminoácidos de la interfase de ambas subunidades. En un segundo estudio cristalográfico, se resolvió la estructura de un cristal de la TcTIM en presencia de un inhibidor selectivo de esta proteína: el ácido (3-(2-benzotiazolil)-1-propanosulfónico ó compuesto 8. El sitio de unión del compuesto 8 con la TcTIM es muy cercano al sitio en que los dos hexanos fueron identificados, a una distancia menor de 4 Å de algunos residuos de la interfase, dentro de ellos la Phe 75 y las tirosinas 102 y 103, residuos que pertenecen a un grupo de aminoácidos aromáticos que forman parte de una región altamente hidrofóbica en la interfase de la TcTIM.

Para determinar la importancia de estos residuos como parte del conjunto hidrofóbico e integridad de la proteína, decidimos mutar la Tyr 102 y 103 en la TcTIM por aquellos residuos que presenta el humano en estas posiciones y generar las mutantes Y102V, Y103V, Y102V/Y103F, Y103F y Y102F/Y103F. Al determinar las constantes cinéticas en estas proteínas se encontró que no hubo diferencias significativas con la enzima silvestre. Sin embargo, las mutantes Y102V y Y103V fueron menos estables a la dilución que las enzimas Y102V/Y103F, Y103F y Y102F/Y103F que presentaron valores de K_d muy similares a la TcTIM. La sustitución por Phe en la posición 103 genera mutantes más resistentes al compuesto 8, contrariamente, la mutante Y103V es más sensible al compuesto 8.

La estructura cristalina de las mutantes Y103V, Y103F y Y102F/Y103F fueron obtenidas a una resolución de 2.35, 2.1 y 2.1 Å respectivamente. Al superponer los carbonos alfa del dímero con respecto a la TcTIM silvestre, se obtuvieron desviaciones con valores de RMS ("Root Mean Square", Raíz de la media cuadrática) de 0.60, 0.64 y 0.49 Å, respectivamente.

Después de un análisis de la estructura de la mutante Y103V, se observó la pérdida de una interacción catión-pi entre la Arg 99 y la Tyr 103. Esta mutación también generó un aumento en el área superficial de la cavidad hidrofóbica que además provoca pérdidas en las interacciones entre los residuos que forman parte del agrupamiento aromático, generando una enzima más inestable y posiblemente una zona más accesible para la entrada y acción del compuesto 8.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis americana, fue descrita por primera vez en 1909 por el brasileño Dr. Carlos Chagas, cuando realizaba una campaña contra el paludismo en el pueblo de Lassance, en el estado de Minas Gerais. Durante su estancia le llamaron la atención unos insectos que habitaban en el vagón que había tomado como laboratorio provisional; era el insecto vector (triatoma) transmisor del parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*). Después de realizar estudios del ciclo de desarrollo del *Trypanosoma* en animales de laboratorio y en el insecto transmisor, buscó el parásito en humanos, descubriendo más tarde el cuadro clínico que se conocería poco después como la enfermedad de Chagas.

1.1.1 *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito estercolario de la clase *Zoomastigophorea*, del orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae* género *Trypanosoma*, especie *cruzi*, que causa la Tripanosomiasis americana o Mal de Chagas, la cual es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes en Centro y Sur América, abarcando desde México hasta el Sur de Argentina.

Según la Organización Mundial de Salud, se estima que en América Latina actualmente hay 15 millones de personas infectadas, lo que provoca 12,500 muertos cada año y cerca de 28 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad, reportándose 41,200 nuevos casos cada año (www.who.org).

En la república Mexicana las áreas consideradas posibles endémicas son todo el territorio que se encuentra por debajo de los 2,200 metros sobre el nivel del mar, ya que en estas altitudes es donde se han localizado los triatómidos infectados con *T. cruzi* en las habitaciones del hábitat humano. Los estados en que predomina el mayor número de pacientes con un diagnóstico positivo a la enfermedad han sido, Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Yucatán, Veracruz, Estado de México, Sonora, Nayarit y Tabasco.

El ciclo de transmisión de los triatomas puede ser selvático o domiciliario. Originalmente el *T. cruzi* fue transmitido sólo a animales salvajes; los humanos se transformaron en hospederos cuando se introdujeron en el hábitat de los triatómidos, provocando un desequilibrio ecológico.

La vía de transmisión del parásito al humano puede ser a través de transfusiones de sangre infectada; congénitamente de la madre al feto a través de la placenta; por la leche materna; por manipulación de animales infectados; en laboratorios, al manipular sangre infectada de animales para mantener la cepa de *T. cruzi* o manipulación de cultivos y, de forma más generalizada, mediante las heces de un insecto vector, perteneciente a la subfamilia *triatoma* en la familia *Reduviidae*, orden *Hemiptera*. Dentro de los insectos más importantes en el grupo se encuentran el *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus*, conocidos popularmente como “chinche besucona”, “vinchuca”, “barbero” y “chipo” (Barret, *et al.*, 2003).

Las personas más propensas a adquirir la infección son aquellas que habitan con animales domésticos y viven en zonas rurales; en casas hechas de planchas corrugadas, con hendiduras y grietas, techos de palma y pisos de tierra, ya que proveen las condiciones y el hábitat adecuado para el insecto transmisor (Barret, *et al.*, 2003).

La inoculación ocurre cuando las heces infectadas son depositadas en la piel mientras el insecto intenta alimentarse de la sangre del hospedero. La picadura producida por la mordedura del vector provoca que el individuo se frote o rasque produciendo una micro abrasión permitiendo que los tripomastigotes metacíclicos no replicativos e infecciosos penetren a la piel e invadan las células, donde se transforman en amastigotes y se replican. Al romperse las células, el parásito se transforma rápidamente en tripomastigote y se libera al torrente sanguíneo donde se disemina. Posteriormente vuelve a invadir otras células de diversos órganos, multiplicándose nuevamente como amastigote y repitiendo el ciclo. (Figura 1).

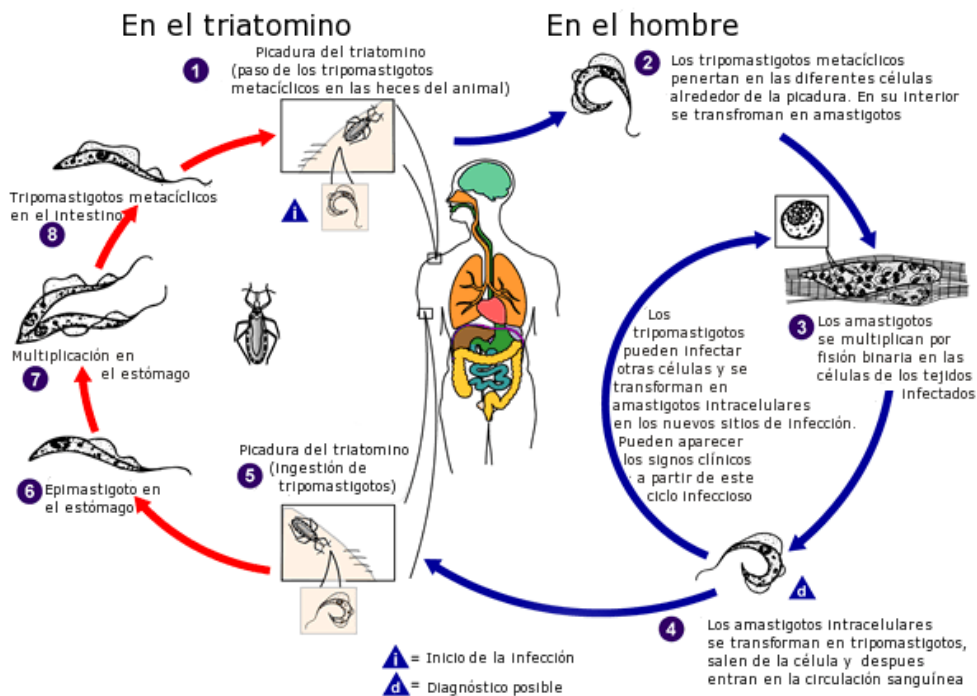


Figura 1. Ciclo de vida del parásito *T. cruzi*. Imagen tomada de www.cardioaragon.com/doc.php?op=revista3&id=104&id2=11.

1.1.2 Patogenia de la enfermedad de Chagas

La morbilidad y mortalidad con que se reporta la enfermedad en los diferentes países de América es variable e imprecisa, ya que depende de factores como los métodos epidemiológicos que se utilizan para la recopilación de los datos, la falta de programas estructurados para la detección y control de la enfermedad, el desconocimiento del problema, además de la prevalencia de esta infección en zonas rurales o suburbanas, lugares donde muchas veces los servicios médicos son muy escasos, lo que hace que mucha población infectada no sea detectada. (Tay Z.J., 2003).

La enfermedad de Chagas tiene una patogenia compleja con 2 etapas sintomáticas, la aguda y la crónica. En la etapa aguda de la enfermedad las manifestaciones clínicas pueden comenzar desde los 6 días hasta 2 meses después de la infección. Frecuentemente se identifica con el característico chagoma de inoculación, así como la

aparición de un signo de romaña y un chancro tripanosomal. Esto facilita el diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad; clínicamente, en esta etapa, los parásitos también pueden ser detectados en sangre periférica.

Después de la fase aguda, viene una fase asintomática donde se ha reducido el número de tripomastigotes en circulación, haciendo difícil un diagnóstico parasitológico directo. La fase crónica se detecta después de un período prolongado (el cual puede ocurrir hasta 20 años después) en el que los daños provocados en los órganos se manifiestan, siendo el corazón, el sistema nervioso y el aparato digestivo los más afectados.

1.1.3 Prevención y control de la enfermedad de Chagas

La estrategia para el control y prevención de la enfermedad está basada en:

- Control del vector: Fomentando el cambio de los materiales de construcción de las casas para crear un hábitat adverso al insecto vector, así como el uso de insecticidas (lindano, gamexano, etc).
- Control serológico en los bancos de sangre para prevenir la transmisión a través de transfusiones.
- Tratamiento de individuos infectados.

El tratamiento para la tripanosomiasis está basado principalmente en los medicamentos nitroheterocíclicos: Nifurtimox, Benzimidazol y Megazol. El inconveniente de estos fármacos es que sólo son eficaces en la fase aguda de la enfermedad, especialmente en la infección congénita y en individuos infectados accidentalmente en el laboratorio. Además provocan importantes efectos adversos como: depresión de la médula ósea, debilidad, efectos tóxicos neurológicos, anorexia, pérdida de peso y vómitos. (Lowman J.W., *et al.*, 2005). (Figura 2).

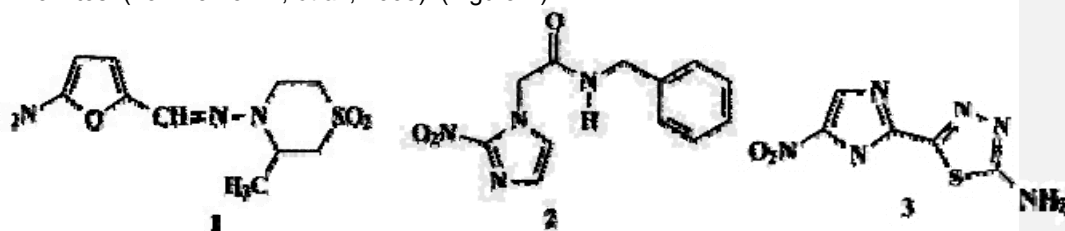


Figura 2. Estructura química de los nitro heterocíclicos: 1. Nifurtimox; 2. Benzimidazol; 3. Megazol

El mecanismo por el cual actúan estos compuestos no está bien establecido, sin embargo existen evidencias que se lleva a cabo a través de la reducción del grupo nitro. En el caso del Nifurtimox, la nitro reducción es seguida por una auto-oxidación que genera metabolitos de oxígeno altamente tóxicos, como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. En el Benznidazol se genera un radical nitroaniónico que produce modificaciones covalentes de las macromoléculas, provocando daño celular y muerte del parásito (Brunton, *et al.*, 2006).

Dadas las implicaciones clínicas de esta enfermedad, la reducida eficacia y las limitadas opciones farmacológicas disponibles en el mercado, es clara la necesidad del diseño y desarrollo de nuevos fármacos en contra de parásitos tripanosomátidos.

1.2 Enzimas oligoméricas como blanco para el diseño de fármacos

Muchos estudios dirigidos al diseño de nuevos fármacos antiparasitarios están basados en la búsqueda e identificación de sitios diana que actúen específicamente contra el parásito sin afectar al hospedero. Una línea importante de investigación estudia a las vías metabólicas del parásito, donde se buscan enzimas, reguladores, transportadores, receptores o intermediarios que difieran de los del huésped.

El desarrollo de fármacos que tenga como blanco una enzima que exista tanto en el hospedero como en el parásito requiere que los fármacos tengan una mayor selectividad y afinidad por la enzima del parásito. Esto se logra aprovechando las diferencias en la secuencia de aminoácidos y la estructura que presenten la enzima del parásito y del hospedero. Es decir, se necesita obtener una molécula inhibidora de la enzima del parásito con alta afinidad de unión especie específica. (Gómez-Puyou, *et al.*, 1995).

Cuando se compara la estructura tridimensional de las enzimas homólogas de diferentes especies, frecuentemente muestran la misma estructura básica. Aparentemente la evolución ha mantenido el plegamiento que le confiere su función particular, pero al examinar un alineamiento de estas proteínas se observan diferencias en muchos de sus residuos, sobre todo aquellos que no pertenecen al sitio activo, ya que los sitios catalíticos se han mantenido altamente conservados.

Un gran porcentaje de las proteínas que existen en los organismos son proteínas oligoméricas, y dentro de ellas, las más abundantes son las proteínas diméricas (Goodsell & Olson, 2000; Pérez Montfort, *et al.*, 2002). Muchas de estas enzimas son activas sólo en su forma oligomérica y este estado se estabiliza en mayor proporción por medio de los contactos de los residuos que se encuentran en la interfase de ambas subunidades.

En la célula existe un sinnúmero de factores y mecanismos intracelulares y físico-químicos, como son el pH, temperatura, que contribuyen a la variación de estas interacciones y, por tanto, a la integridad y estabilidad de las proteínas (Veselovsky, *et al.*, 2002).

Estas características, y la gran proporción de residuos no conservados en la interfase, sugiere que esta región pudiera ser explotada para el diseño de agentes que perturban específicamente la interfase de una enzima oligomérica. (Pérez Montfort, *et al.*, 2002).

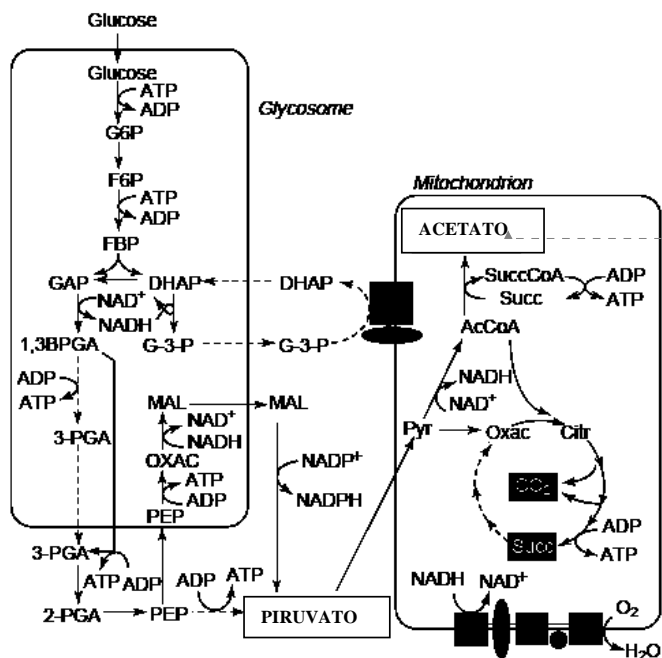
Algunos de los residuos en esta región pudieran ser irrelevantes para la función de la enzima en el parásito, por lo tanto es necesario determinar su importancia; esto se puede lograr realizando mutaciones dirigidas.

Unos de los grandes retos en el desarrollo de estos fármacos es la identificación de moléculas inhibitoras que intervengan en la interacción entre las dos subunidades que forman la interfase. Algunas de las estrategias son el diseño de pequeñas moléculas orgánicas (Arkin M.R., *et al.*, 2004; Gadek T.R., *et al.*, 2003), el desarrollo de péptidos inhibidores (Prasanna, V., *et al.*, 1998; Singh, K.S., *et al.*, 2001; Zhao, L., *et al.*, 2005) y de moléculas péptido-miméticas (Che, Y., *et al.*, 2006; Sillerud L.O., *et al.*, 2005), así como la identificación de residuos "hot spot" que permitan a estos agentes tener una mayor afinidad y eficacia (Bogan A.A., *et al.*, 1998; Moreira I.S., *et al.*, 2007).

El aumento de la información disponible en las bases de datos existente en la red, los avances en la bioquímica, biología molecular, microbiología y bioinformática han facilitado la búsqueda e identificación de sitios dentro de las proteínas que pueden servir como blancos.

En el metabolismo de carbohidratos de los tripanosomátidos, las 7 primeras enzimas de la ruta se encuentran en mayor medida localizadas en unos organelos llamados glicosomas, a diferencia de otras células eucariotas en que las enzimas glicolíticas se

encuentran principalmente en el citosol (Oppendoes, 1987). En estudios realizados en la fase sanguínea de *Trypanosoma brucei*, un protozooario perteneciente también al género *Trypanosoma*, se ha reportado que los glicosomas representan el 4.3% del volumen celular y que concentra al 90% de las enzimas glicolíticas, lo que hace que el flujo glicolítico sea más eficiente a través de la vía (Michels, *et al.*, 1988). En esta fase del parásito, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos no es funcional, por lo que dependen de la glucólisis para la producción de energía. Aunque estas características han sido menos estudiadas en *Trypanosoma cruzi*, se plantea que su metabolismo energético es similar a *Leishmania*, donde sólo una pequeña parte de los carbohidratos es oxidado a dióxido de carbono vía el ciclo de Krebs y se obtiene como productos finales acetato, piruvato y succinato (Tielens, *et al.*, 1998). (Figura 3).



Con formato: Fuente: 8 pto, Negrita

Figura 3. Vía principal de degradación de carbohidratos en *Leishmania*. Tomado de Tielens, *et al.* 1998. El metabolismo de carbohidratos de *Trypanosoma cruzi* es similar a *Leishmania*, con ciclo de Krebs en todas las fases del ciclo de vida del parásito y cadena respiratoria semejante a la encontrada en mamíferos.

Debido a la importancia que juega la glicólisis en la producción de energía del parásito y dada las peculiaridades que le confiere la compartimentalización en el glicosoma, la vía glicolítica ha sido considerada atractiva para investigaciones

quimioterapéuticas (Lowman, *et al.*, 2005; Lakhdar-Ghazal, *et al.*, 2002; Opperdoes, *et al.*, 2001; Michels, 1988).

Varios investigadores (Cortés-Figueroa, *et al.*, 2007; Olivares-Illana, *et al.*, 2007; Olivares-Illana, *et al.*, 2006; Espinosa-Fonseca, *et al.*, 2004; Tellez-Valencia, *et al.*, 2004; Tellez-Valencia, *et al.*, 2002; Gao, *et al.*, 1998; Zubillaga, *et al.*, 1994; Garza-Ramos, *et al.*, 1996) han propuesto a la triosafosfato isomerasa (TIM o TPI) como blanco para el diseño de fármacos contra los tripanosomátidos y otras especies parasitarias como *Giardia lamblia* (Enriquez-Flores, *et al.*, 2008) *Entamoeba histolytica* (Rodríguez-Romero, *et al.*, 2002) y *Plasmodium falciparum* (Singh, *et al.*, 2001; Velanker, *et al.*, 1997) debido a su importancia en la glicólisis del parásito (Opperdoes, *et al.*, 2001), por ser una proteína dimérica (Ostoa-Saloma, *et al.*, 1997), y por la posibilidad de su inhibición especie específica (Gomez-Puyou, *et al.*, 1995). La TIM es precisamente la molécula de interés de este proyecto.

1.3 Triosafosfato isomerasa

1.3.1 Aspectos generales

La triosafosfato isomerasa, es una enzima de la vía glucolítica de aproximadamente 250 aminoácidos, que cataliza la interconversión de gliceraldehido-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), en una reacción que está presente en todos los organismos analizados hasta la fecha. Esta enzima también participa en la gluconeogénesis, en la vía de las pentosas y en la síntesis de ácidos grasos.

En *T. cruzi*, la proteína está compuesta por 251 residuos de aminoácidos, con una masa molecular de 27,244 Da. (Figura 4).

La mayoría de las TIMs conocidas son homodiméricas, a excepción de las encontradas en algunas arqueobacterias termofílicas, donde las enzimas son tetrámeros, como las de *Piroccocus woesi* y *Methanothermus fervidus* que son homotetrámeros (Kohlhoff, *et al.*, 1996) y la de *Thermotoga marítima*, que se encuentra fusionada con la enzima fosfoglicerato cinasa (Maes, *et al.*, 1999). Las TIMs de *Thermoproteus tenax* (Walden, *et al.*, 2004) y de *Giardia Lamblia* (López-Velázquez, *et al.*, 2004; Reyes-Vivas, *et al.* 2007) pueden existir tanto en dímeros como tetrámeros.

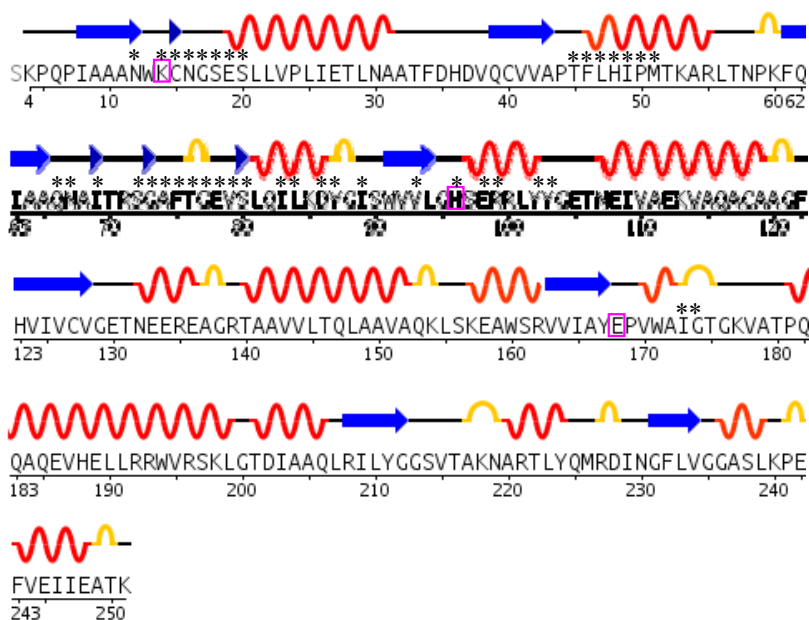


Figura 4. Detalles de la secuencia de TcTIM (PDB, Clave 1TCD) mostrando en rojo- α hélices, azul- hebras β , amarillo- puente de hidrógenos y en negro-asas. En cuadros rosados se enmarcan los residuos que pertenecen al sitio catalítico, Lys 14, His 96 y Glu 168. Los asteriscos (*) muestran los residuos que pertenecen a la interfase (Maldonado, *et al.*, 1998).

1.3.2 Propiedades catalíticas de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM)

Se ha observado que la enzima sólo es catalíticamente activa como dímero, independientemente de que cada monómero tiene su propio sitio catalítico. Esto sugiere que los residuos de una subunidad son cruciales para mantener el sitio activo funcional de la otra subunidad (Mainfroid, *et al.*, 1996).

La TIM es una proteína que ha sido muy bien caracterizada, hasta el momento se han reportado la secuencia de aminoácidos de aproximadamente 1000 especies y la estructura de 17 de ellas. Se ha estudiado sus propiedades cinéticas (Albery, *et al.*, 1976), mecanismos de degradación (Gracy, *et al.*, 1995) y mecanismos de reactivación (Zomosa-Signoret, *et al.*, 2003; Chanéz-Cárdenas, *et al.*, 2005; Fernández-Velasco *et al.*, 1995; Waley, 1973). Se le ha considerado como un “catalizador perfecto” ya que su velocidad catalítica sólo está limitada por la difusión de los sustratos, aumentando la velocidad de la reacción hasta 10^9 veces con respecto a un catalizador inorgánico.

Siendo un valor comparable al calculado para las reacciones bimoleculares en solución controladas por difusión (10^8 - 10^{10}). Así mismo, en estudio de los parámetros catalíticos de la TPI variando la viscosidad del solvente, se ha reportado que los cambios en la viscosidad del solvente influyen de manera inversamente proporcional sobre la velocidad de transformación de sustrato a producto (Knowles, 1991; Blacklow, *et al.*, 1988; Albery *et al.*, 1976).

La proteína actúa disminuyendo la barrera energética que limita la velocidad de protonación y desprotonación del G3P y la DHAP, catalizando la isomerización a través de un intermediario cis-enediol. En el sitio activo de la enzima se han identificado tres residuos que participan en la catálisis, la His 96, donde el anillo imidazol es un catalizador electrofílico que polariza el grupo carbonilo del sustrato, permitiendo la protonación y desprotonación y formación del enediol; el Glu 168, cuyo carboxilo actúa como base tomando un protón y catalizando la transferencia entre el carbono 1 y carbono 2, este residuo forma parte del asa 6. La Lys 14, que es la responsable de la especificidad de la enzima por su sustrato, permite la unión del fosfato del sustrato y actúa modificando el pH de la His96. (Figura 5).

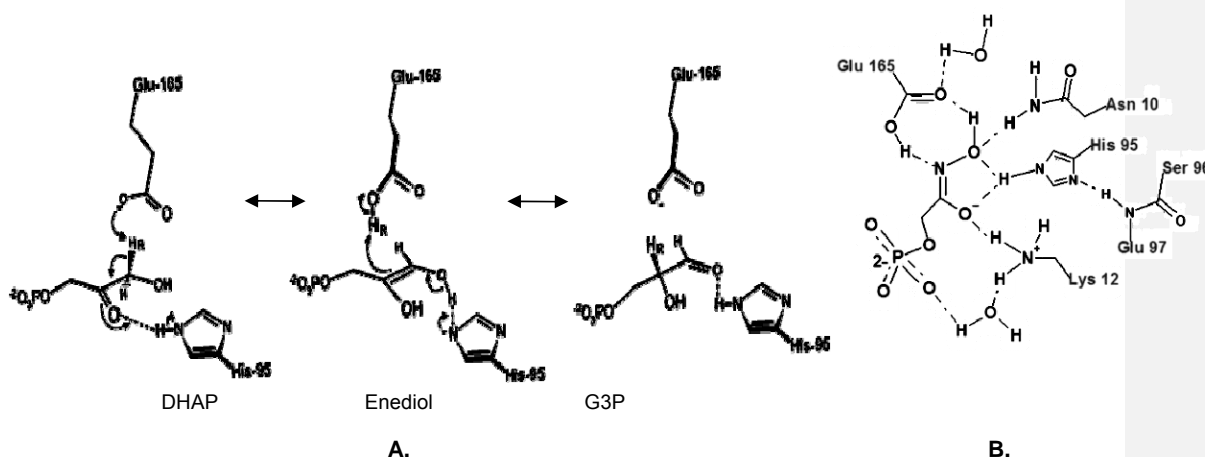


Figura 5. A. Mecanismo de reacción de la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato (G3P) catalizada por la TIM de humano. (Imagen tomada de Harris, *et al.*, 1998). La TcTIM presenta el ácido glutámico en la posición 168 y la histidina en la posición 96 y la lisina en la posición 14 B. Interacciones que se forman en el sitio activo durante la catálisis (<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/triosafosfato%20isomerasa.html>).

La enzima también puede formar fosfato inorgánico y metilglioxal, el cual es tóxico. Ambos son subproductos de la descomposición del intermediario enediol que se forma por una reacción de isomerización no enzimática utilizando bases orgánicas como catalizadores, esta reacción de eliminación es lenta comparada con la reacción de isomerización que lleva a cabo la TIM (Lolis & Petsko, 1990; Knowles, 1991).

1.3.3 Propiedades estructurales de la TcTIM

La TIM es el prototipo de la familia de proteínas con dominio barril α/β , cada monómero está compuesto de 8 hebras β -plegadas y 8 α -hélices, intercaladas y unidas mediante 8 asas (loops). Las hebras β se disponen en el interior de la proteína, rodeadas por las α -hélices. La interfase del dímero en la TcTIM está constituida por 40 residuos y se compone principalmente de las asas 1 a la 4 ocupando una superficie de aproximadamente 1476 Å^2 y 1491 Å^2 para los monómeros A y B que representa el 13.4% y 13.5 % de la superficie total, respectivamente. (Maldonado E., *et al*, 1998) (Figura 4 y 6).

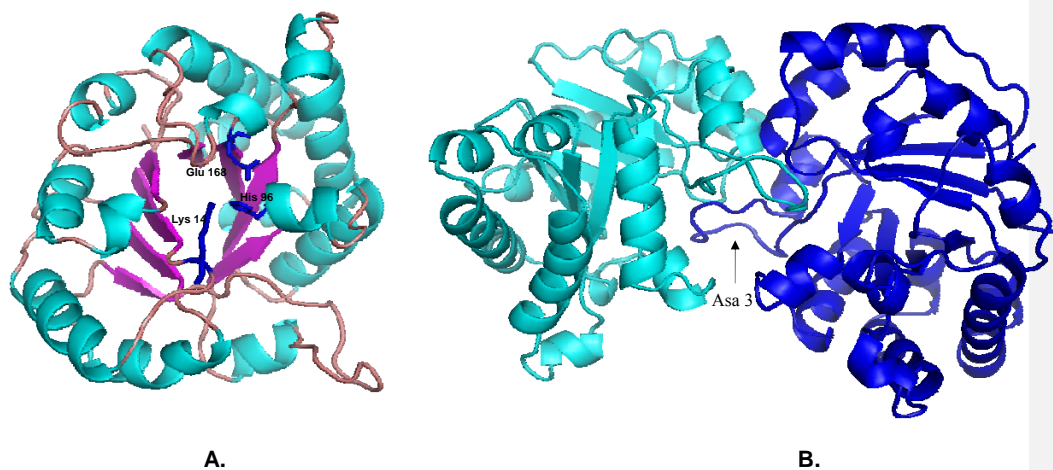


Figura 6. **A.** Esquema del monómero de la TIM de *Trypanosoma cruzi* señalando residuos del sitio catalítico. Se observa la estructura característica de barril α/β . En el interior se representan las hebras β -plegadas en forma de flechas rodeadas por las α -hélices en forma de listón unidas por asas. **B.** Estructura dimerica de la TIM señalando el asa 3. (Coordenadas tomadas de PDB, clave 1TCD).

El asa 6 se denomina asa flexible, y se ubica muy cerca del sitio activo. Al unirse el sustrato sufre un cambio conformacional notable, llegando a moverse hasta 7 Å para

formar una especie de tapa sobre el ligando (Mande *et al.*, 1994). Este movimiento aísla al sitio activo del solvente, estableciendo un puente de hidrógeno entre residuos del asa y uno de los átomos de oxígeno del grupo fosfato del sustrato. Esto estabiliza al intermediario enediol y aumenta la eficiencia catalítica de la reacción de isomerización, disminuyendo la reacción de eliminación del fosfato y previniendo la formación de metilgloxal. El movimiento del asa hace que presente una posición “abierta”, que predomina en ausencia del sustrato, pareciendo ser termodinámicamente más estable, y una posición cerrada, que predomina en presencia del sustrato.

Se ha observado que las asas 5 y 7 también muestran cierta flexibilidad conformacional.

Dentro de la interfase se encuentra el asa 3, conocida como asa de la interfase o asa catalítica, pues ella se acopla a una cavidad cerca del sitio activo del otro monómero (Lolis *et al.*, 1990), lo que contribuye a la asociación entre las subunidades. (Figura. 6) .

El acercamiento entre los dos monómeros permite las interacciones entre las cadenas principales y laterales de los residuos de cada subunidad, como son puentes de hidrógeno, interacciones de Van de Waals e interacciones hidrofóbicas, por lo que se piensa que esta región contribuye en gran medida en la estabilidad de la enzima. (Álvarez *et al.*, 1998; Gómez –Puyou *et al.*, 1995; Mainfroid *et al.*, 1996; Garza Ramos *et al.*, 1998; Pérez Montfort *et al.*, 1999).

1.3.4 Interfase de la Triosafofosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*

Varios reportes han demostrado la importancia que tienen la interfase en la estabilidad y actividad catalítica de la enzima. La Cys 15, un aminoácido de la interfase de la TcTIM que se encuentra próximo a la Lys 14, es rodeada por el asa 3 de la otra subunidad, y que se ha reportado es importante en las interacciones entre las subunidades y estabilidad del dímero (Schliebs, *et al.*, 1997; Wierenga, *et al.*, 1991; Knowles, 1991). En estudios en el que se ha sustituido este residuo por mutagénesis, se observaron cambios estructurales importantes, pérdida de la actividad catalítica y enzimas con constantes de asociación bajas. (Gómez-Puyou, *et al.*, 1995; Garza-Ramos *et al.*, 1996, Hernández-Alcantara, *et al.*, 2002). De igual forma, su derivatización con agentes de grupo sulfhidrilo como DTNB y MMTS, inducen pérdida de la actividad

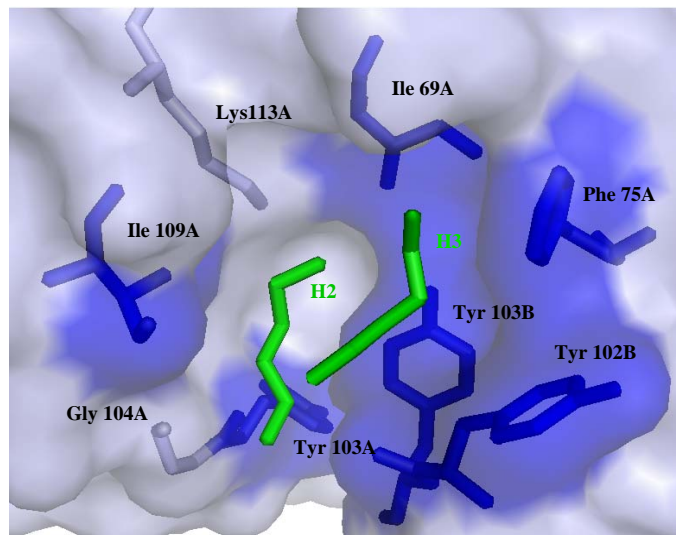
catalítica, siendo hasta 100 veces más susceptibles que *Trypanosoma brucei*. (Garza-Ramos, *et al.*, 1998)

Dentro de la región interfacial de la TcTIM también existe un agrupamiento (“cluster”) de aminoácidos aromático, constituido por los residuos Phe 75, Tyr 102 y Tyr 103 y forma un núcleo estructural altamente hidrofóbico (Figura 11 y 12). En diversas publicaciones se ha observado que las interacciones intermoleculares que involucran anillos aromáticos son importantes en los reconocimientos químicos y biológicos, y que, frecuentemente, estos agrupamientos aromáticos han estado implicados en la estabilización del plegamiento de la estructura de las proteínas. Por otro lado, las mutaciones realizadas en residuos pertenecientes al “cluster” han provocado una reducción considerable en la estabilidad de la enzima. Maithal, K., *et al.*, (2002), realizaron una mutación puntual de Tyr por Gly en la posición 74, residuo que pertenece al “cluster” de la TIM de *Plasmodium falciparum*, lo que provocó una reducción considerable de la estabilidad de la mutante comparada con la enzima silvestre, al efectuar ensayos de estabilidad a la dilución y estudios de desnaturalización con urea.

2. ANTECEDENTES

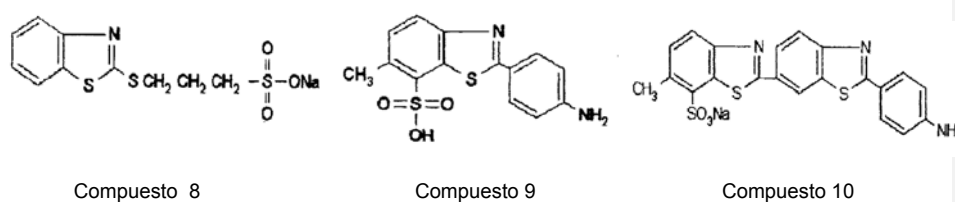
En la base de datos Protein Data Bank (PDB) se encuentran varias estructuras de la TIM que han sido resueltas en presencia de posibles inhibidores. Gao X. *et al.*, (1999), difractaron la TcTIM en presencia del solvente orgánico hexano con el objetivo de establecer las bases estructurales del comportamiento de la enzima en presencia de solvente orgánico y compararla con aquellas propiedades observadas en medio acuoso; además de identificar sitios en la TIM que tengan la habilidad de unir moléculas hidrofóbicas, pues, técnicamente, estas regiones pueden representar sitios de unión potenciales de moléculas que afectan la función de la enzima. De forma general, no se observó perturbación de la estructura básica de la TcTIM, sólo cambios en la orientación de cadenas laterales de algunos residuos, principalmente el Glu 168 del monómero A. Sin embargo, en el cristal se identificaron tres moléculas de hexano a la cuales se denominó H1, H2 y H3; estas moléculas se ubicaron en la periferia de la enzima. H1 se encontró a menos de 4 Å de los residuos de Arg-135, Thr-140 y Glu-186, estos residuos forman parte de las asas 5 y hélice 6. Las otras dos moléculas se encontraron a una distancia de menos de 3.8 Å una de otra, cerca de una zona hidrofóbica en la periferia de la interfase. En la tabla 2 y figura 7 se muestran los 8 residuos que se localizaron a menos de 4 Å de las moléculas H2 y H3 de hexano, 6 de ellos presentan propiedades hidrofóbicas (resaltados en azul oscuro). Lo que sugiere que la TcTIM tiene sitios de unión a moléculas hidrofóbicas en la interfase, dentro de ellos, la Tyr-103 de la subunidad A y las Tyr-102 y Tyr-103 de la subunidad B, residuos que forman parte del cluster aromático, que es el objetivo de nuestro estudio.

Figura 7. Localización de los 8 residuos que se encontraron a menos de 4 Å de las moléculas H2 y H3 de hexano. Seis de los ocho residuos presentan características hidrofóbicas (resaltados en azul oscuro). Coordenadas del archivo PDB clave 1C11.



Buscando moléculas que inactivaran selectivamente a la TIM, Téllez-Valencia A., *et al.*, (2002), siguieron la cinética de inactivación de 10 moléculas derivadas de benzotiazoles en presencia de la TcTIM donde 3 de los 10 compuestos provocaron inactivación de la proteína a concentraciones micromolares (compuestos 8, 9 y 10) (tabla 1, figura 8A). Ellos observaron que el efecto de inactivación era dependiente de la concentración de los derivados del benzotiazol. Las curvas de inactivación de la TcTIM a diferentes concentraciones de los compuestos 8 y 9 fueron ligeramente sigmoides mientras que la curva de inactivación con el compuesto 10 fue hiperbólica. (Figura 8B).

A.



B.

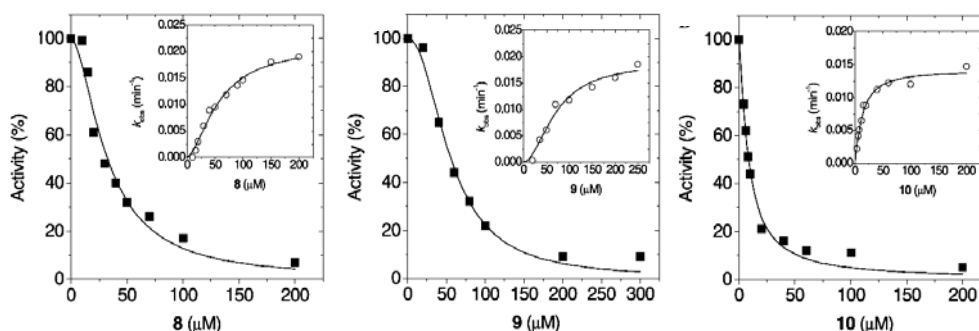


Figura 8. Efectos de algunos benzotiazoles sobre la TcTIM A. Derivados de benzotiazoles, (8) ácido 3-(2-benzotiazolil-tio)-1-propanosulfónico (compuesto 8), (9) ácido 2-(p-aminofenil)-6-metil-benzotiazol-7-sulfónico (compuesto 9) y (10) ácido 2-(2-(4-aminofenil)benzotiazol)-6-metil-benzotiazol-7-sulfónico (compuesto 10) B. Efecto de la inhibición de la actividad de TcTIM por el compuesto 8, 9 y 10, respectivamente. Las enzimas fueron incubadas a concentraciones de 5 $\mu\text{g/ml}$ en buffer de trietanolamina 100mM, EDTA 10mM a pH 7.4 a 36 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas (Téllez-Valencia, *et al.*, 2002).

Al comparar el efecto de los compuestos 8, 9 y 10 a través de la concentración a la cual ocurre la mitad de la inactivación máxima (I_{50}) en las TIMs de humano (HTIM), *Trypanosoma brucei* (TbTIM), levadura (YTIM) y TcTIM, se observó que la TcTIM fue mucho más sensible a la acción de estos derivados de benzotiazoles, y que la selectividad de estos compuestos varía significativamente entre las diferentes especies estudiadas, indicando que el efecto de estas moléculas podría depender de las

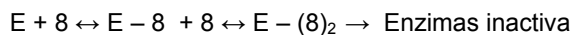
diferencias estructurales entre las enzimas (Tabla1); Así que, estos compuestos podrían ser usados como base para el diseño de moléculas altamente selectivas y con potencial farmacológico contra la TcTIM (Téllez-Valencia, *et al.*, 2002).

El mecanismo por el cual estos compuestos actúan sobre la TcTIM no está bien establecido, sin embargo se ha propuesto que intervienen en el proceso de asociación y disociación de los monómeros. Observándose que el efecto de inhibición fue dependiente de la concentración de proteínas y que la inactivación de estas moléculas incrementó con el tiempo de incubación. Los valores de n (constante de Hill), que es una medida de cooperatividad, obtenidos para los compuestos 8 y 9 fueron cercanos a 2, lo que sugiere que en el mecanismo de inhibición al menos 2 moléculas están involucradas, mientras que el compuesto 10, con valores de n cercanos a uno, sólo una molécula inhibe.

Compuestos	TcTIM	HTIM	TbTIM	YTIM	b/a
8	33 µM	422 µM	4 mM	> 4 mM	13
9	56 µM	3.3 mM	4 mM	> 4 mM	59
10	8 µM	1.6 mM	100 µM	> 900 µM	200

Tabla 1. Comparación de la I_{50} s de los compuestos 8, 9 y 10 con las TIMs de humano (HTIM), *T. brucei* (TbTIM) y levadura (YTIM). Se observan las I_{50} s para los compuestos 8, 9 y 10 incubados con las TIMs de diferentes especies. b/a muestra la relación I_{50} de la TIM de humano I_{50} de la TcTIM. Tabla modificada de Téllez-Valencia, *et al.*, 2002.

Apoyados por estudios de calorimetría de titulación isotérmica y analizando las curvas de actividad contra concentración de compuesto 8, Tellez-Valencia, *et al.* 2004, propuso la siguiente reacción de inhibición del compuesto 8:



De los benzotiazoles que se ensayaron, los que contenían un grupo sulfonato fueron los más potentes. Considerando que los benzotiazoles son relativamente insolubles en agua, el papel del grupo sulfonato por otra parte pudiera favorecer la interacción con algunos residuos de la enzima.

En este mismo trabajo, Téllez-Valencia, *et al.* (2004) obtuvieron el cristal de la TcTIM en presencia de una solución de ácido 3-(2 benzotiazolil-tio)-1 propanosulfónico (compuesto 8). Al igual que el cristal difractado en solución de hexano, la estructura general del dímero no se vio afectada; sin embargo, en el cristal se identificó sólo una molécula del compuesto 8, ubicado cerca de la región donde se encontraron las moléculas H2 y H3 de hexano (4.5 Å de la molécula H3). (Figura 9).

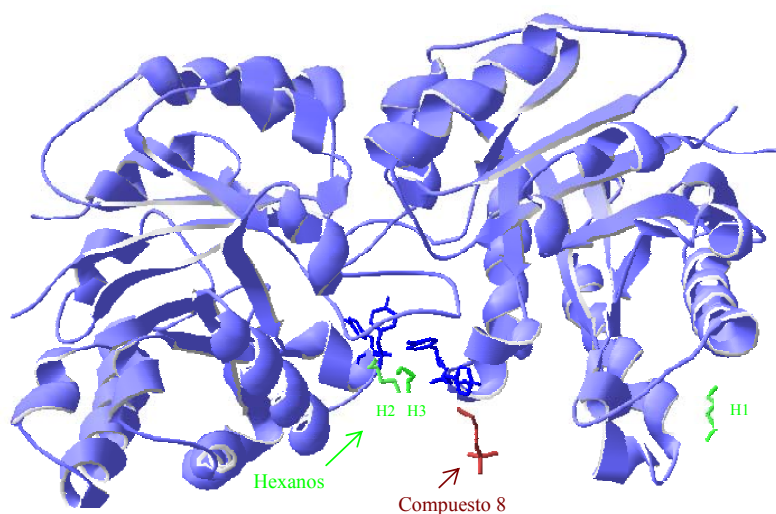


Figura 9. Posición de las 3 moléculas de hexano y compuesto 8 observadas por difracción de los cristales de TcTIM. Las coordenadas de las estructuras se obtuvieron de la base de datos PDB claves 1SUX y 1CI1.

En un análisis de las coordenadas cristalográficas, se determinó que el C5 del compuesto 8 se encuentra a 3.3 Å del N ϵ de la Arg 71 de la subunidad A, sugiriendo que la carga positiva de la Arg pudiera estar interactuando con la carga parcial negativa de los anillos benzotiazoles. Además, el OH de la Tyr 102 de la subunidad B está localizado a 3.4 Å del S2 del inhibidor (quizás estableciendo contacto de tipo Van der Waals). Así mismo, el C ζ del Phe 75 del monómero A se localiza en un promedio de 4.7 Å de los 2 anillos del compuesto 8, ubicados de forma casi perpendicular, de manera que puede formar interacciones tipo cuadrupolo entre anillos aromáticos tipo “edge to face” y estabilizar la interacción TcTIM-compuesto 8. (Téllez-Valencia, *et al.* (2004); figura 10).

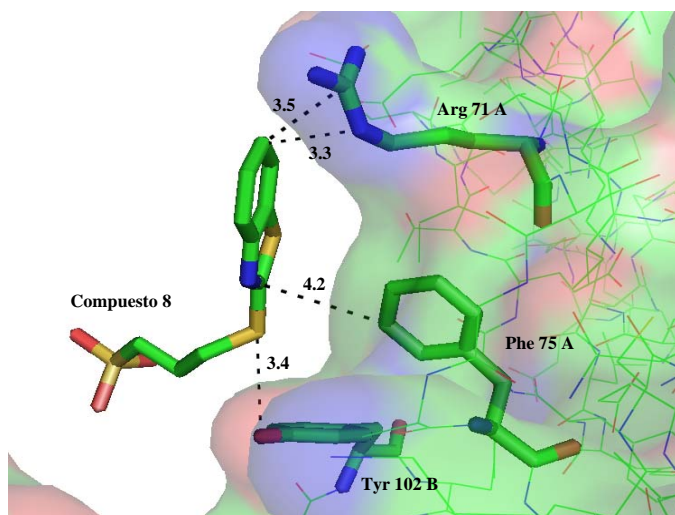


Figura 10. Residuos identificados a menos de a menos de 4 Å de la moléculas compuesto 8, Arg 71 y Phe75 de la subunidad A y Tyr 102 de la subunidad B. Coordenadas tomadas de PDB clave 1SUX.

En la tabla 2 podemos ver que los 3 residuos pertenecientes al “cluster” aromático estaban a menos de 4 Å de las moléculas de hexano y del compuesto 8 en los cristales de TcTIM.

A pesar de la conservación en la estructura terciaria que la TIM de diferentes especies ha mantenido durante la evolución, su estructura primaria ha sufrido cambios, y estos han sido más drásticos conforme las especies están evolutivamente más alejadas.

Monómero	H1	H2	H3	Compuesto 8
A	Ile-69, Tyr103 , Gly 104, Ile109, Lys-113	Phe-75	Arg-71, Phe-75
B	Arg-153, Thr-140, Glu-186	Tyr-102 , Tyr-103	Tyr-102 , Tyr-103	Tyr-102

Tabla 2. Residuos de aminoácidos en el monómero A y B que se encontraron a menos de 4 Å de las moléculas de hexano y compuesto 8 en los cristales de TcTIM.

Cuando se examina los residuos que se encontraban a menos de 4 Å en los cristales tanto en presencia de hexano y compuesto 8 en las TIMs de diferentes especies como

T. cruzi, *T. brucei*, *Leishmania mexicana* (LmTIM), levadura, pollo (ChTIM), *Plasmodium falciparum* (PfTIM), *Entamoeba histolytica* (EhTIM) y HTIM se observa que la estructura en esta región de la interfase es muy similar en las especies de tripanosomátidos, a diferencia de las otras especies más alejadas evolutivamente. (Ollivares–Illana, *et al.*, 2006). Si nos limitamos a los aminoácidos ubicados en la posición 102 y 103 podemos observar que en TcTIM, TbTIM y LmTIM hay un 100% de identidad con residuos de Tyr en ambas posiciones, a diferencia de la TIM de humano que presenta Val y Phe en las posiciones 102 y 103, respectivamente. (Ollivares–Illana, *et al.*, 2006; Gómez Puyou, *et al.*, 1995). (Tabla 3).

TcTIM	TbTIM	LmTIM	HTIM	YTIM	ChTIM	EhTIM	PfTIM
Ile 69 A	Ile	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Trp	Ser
Arg 71 A	Lys	Lys	Val	Lys	Val	Lys	Phe
Phe 75 A	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Tyr	Tyr
Tyr 102 B	Tyr	Tyr	Val	Tyr	Val	Ile	Tyr
Tyr 103 A,B	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
Gly 104 A	Gly	Gly	Gly	His	Gly	His	His
Ile 109 A	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Gln	Asp
Lys 113 A	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
% de identidad en la región	88	88	50	37	50	12	25
% de identidad total	72	68	52	51	47	46	44

Tabla 3. Residuos en TcTIM que se encuentran a menos de 4 Å de las moléculas del hexano y compuesto 8. Los residuos de TcTIM se muestran en la primera columna y se toma como 100%. Tabla modificada de (Ollivares–Illana, *et al.*, 2006).

La porción de la interfase de TcTIM donde se encontraron los hexanos y el compuesto 8 difiere en composición de aminoácidos y grupos hidrofóbicos a la región equivalente en la TIM de humano (HTIM). Al realizar una superposición entre las estructuras HTIM y TcTIM observamos que las diferencias son notables, la cavidad hidrofóbica de la HTIM está más ocupada que la de TcTIM ya que la disposición de los residuos que pertenecen a su cluster aromático son diferentes. (Figura 11).

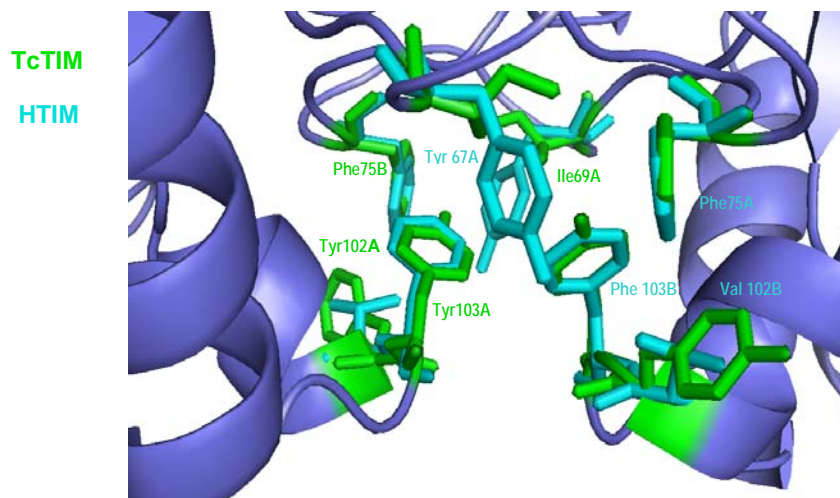


Figura 11 Superposición de la estructura cristalina de la TcTIM (PDB: 1TCD) y HTIM (PDB: 1WYI). Acercamiento del cluster aromático. La TcTIM tiene Ile en la posición 69, 75Phe, 102Tyr y 103Tyr a diferencia de HTIM que presenta en estas posiciones: 67Tyr, 74Phe, 101Val y 102Phe. Se respetó la numeración de los residuos para cada especie.

Auxiliándose de herramientas computacionales, haciendo una simulación a través de “docking” se hizo un análisis energético y estructural de la TcTIM con los benzotiazoles, mostrando que los compuestos 8, 9 y 10 podían ubicarse en la región de la interfase y muy cerca del asa 3, con sitios de unión en el cluster aromático e interacciones con la Phe75 de un monómero y los residuos Tyr 102 y Tyr103 del otro monómero (Espinoza-Fonseca, *et al.*, 2004).

En vista de la inhibición selectiva que presentan algunos benzotiazoles sobre la TcTIM, estos compuestos se han propuesto como base para el diseño de moléculas con mayor afinidad y selectividad. (Ollivares–Illana, *et al.*, 2006, Ollivares–Illana, *et al.*, 2007).

La identificación de residuos importantes para la estabilidad y función en la proteína, puede proporcionar información importante sobre las modificaciones que son necesarias para llevar a cabo sobre en dichos compuestos, con la finalidad de incrementar su potencial farmacológico.

Tomando en cuenta estas diferencias y de acuerdo con lo planteado por Mattos y Ringe (Mattos, *et al.*, 1996; Ringe, 1995) que un sitio con capacidad de unir moléculas hidrofóbicas, es un sitio potencial para el diseño de fármacos, entonces pensamos que

el “cluster” aromático pudiera ser una región atractiva de explorar. De este modo, el interés de nuestro proyecto fue investigar la importancia de las Tyr en las posiciones 102 y 103 de la TcTIM y su papel en la estabilidad de la enzima, realizando mutaciones puntuales dirigidas sobre estos dos residuos. (Figura 12).

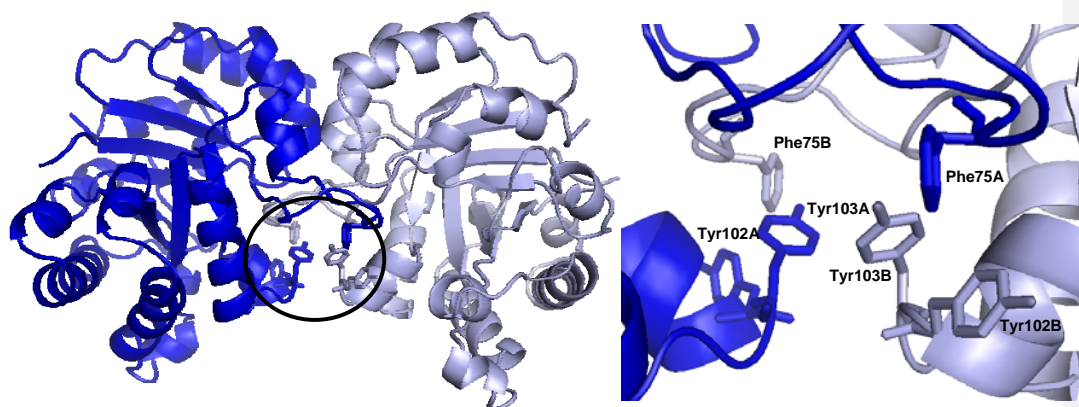


Figura 12. Estructura de la TcTIM. Residuos pertenecientes al cluster aromático, Phe 75, Tyr 102 y 103 en ambos monómeros. Coordenadas cristalográficas tomadas de PDB clave 1TCD.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la importancia de las Tyr 102 y 103 de la TcTIM como parte del “cluster” aromático a través de mutaciones puntuales mediante mutagénesis dirigida para ver su efecto en la estabilidad del dímero y su efecto en la interacción con compuestos inhibidores.

3.2 Objetivos particulares

- Realizar mutaciones puntuales en las Tyr de las posiciones 102 y 103 de la TcTIM, para construir las enzimas mutantes: Y102V, Y103V, Y103F, Y102V/Y103F y Y102F/Y103F.
- Sobreexpresar y purificar las TIMs mutantes.
- Caracterizar y comparar las constantes cinéticas con la TcTIM silvestre.
- Estudiar la interacción de las proteínas mutantes con el compuesto 8.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño de oligonucleótidos mutagénicos

Para caracterizar las posiciones 102 y 103, hemos decidido realizar las mutantes Y102V, Y103V, Y103F, Y102V/Y103F, Y102F/Y103F. El cambio del residuo Tyr por Val, se ha hecho con la intención de cambiar el grupo aromático por un residuo que mantuviera las características hidrofóbicas del "cluster", y también por Phe porque ambos son los residuos que se encuentran en las posiciones 102 y 103 de la HTIM.

Para la mutagénesis de los residuos 102 y 103 fue necesario el diseño y síntesis de oligonucleótidos mutagénicos. Para esto se tomó como base la secuencia del gen de la TcTIM obtenida por Ostoa-Saloma, *et al.*, 1997. Tomando en cuenta el plásmido en el que se encontraba clonada la TcTIM, se diseñaron los oligonucleótidos mutagénicos directos y reversos externos correspondientes. Estos oligonucleótidos sintetizados contienen aproximadamente entre 22 y 25 nucleótidos y se muestran en la Tabla 4.

Y102V	5' GTTTG GTG TACGGCGAAACGAAC 3'	5' GTTCGTTTCGCCGT CAC CAAAC 3'
Y103V	5' TTTGTAC GTG GGCGAAACGAAC 3'	5' GTTCGTTTCGCC CAC GTACAAA 3'
Y102V/Y103F	5' GCGTTT GTGTTT GGCGAAACG 3'	5' CGTTTCGCC AAACAC AAACGC 3'
Y103F	5' GCGTTTGTAC TTT GGCGAAACG 3'	5' CGTTTCGCC AAA GTACAAACGC 3'
Y102F/Y103F	5' AACGGCGTTT TTCTTT GGCGAAAC 3'	5' GTTTCGCC AAAGAA CAAACGCCGTT 3'

Tabla 4. Oligonucleótidos mutagénicos diseñados. Las letras marcadas en negritas corresponden a las posiciones donde se incorporó la mutación.

4.2 Mutación puntual dirigida en la TcTIM por PCR

Las mutaciones se realizaron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante un procedimiento estandarizado en el laboratorio. La introducción de la mutación puntual en un gen TcTIM que se encuentra clonado en el vector pET3a (figura 14) por medio de PCR se logró utilizando dos oligonucleótidos que funcionan como cebadores (primers), el T7 promotor y el T7 terminador y los oligonucleótidos mutagénicos sintetizados.

Para la amplificación completa del gen se requirieron tres reacciones. La primera reacción (PCR₁) donde se amplifica la parte del gen de la TcTIM que está flanqueada por el oligonucleótido externo directo (T7 promotor) y el oligonucleótido mutagénico reverso. En la PCR₂ se amplifica la parte del gen de la TcTIM que esta flanqueada por el oligonucleótido externo reverso (T7 terminador) y el oligonucleótido mutagénico directo. En la PCR₃ se obtiene el gen completo combinando los productos de las PCR₁ y PCR₂ que se hibridizan en sus partes complementarias. (Figura 13).

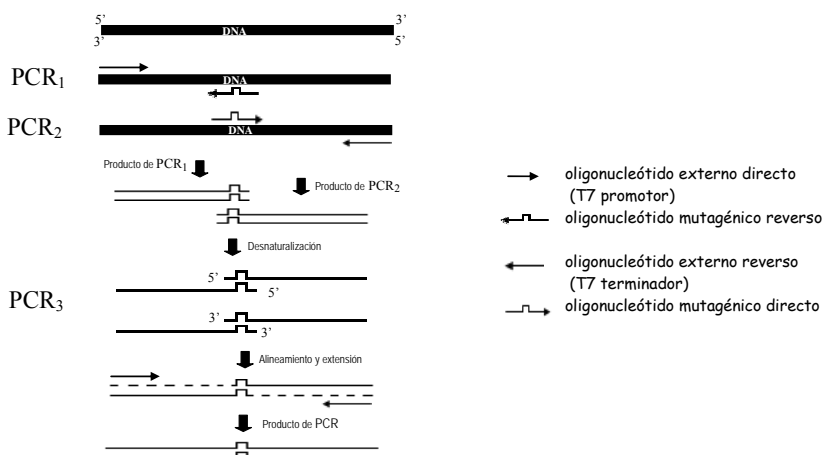


Figura 13. Amplificación por la técnica de PCR de un gen para insertar una mutación puntual.

Para la reacción de PCR, se utilizó la enzima “Platinum Taq DNA Polymerase”. Las condiciones para la amplificación de cada PCR se muestran en la tabla 5.

	PCR1	PCR2	PCR3
Mezcla dNTPs (10 mM c/u)	1 µl	1 µl	1 µl
T7 promotor (200 ng/µl)	1 µl	...	1 µl
T7 Terminator (200 ng/µl)	...	1 µl	1 µl
Oligo Mutagenico Fw (200 ng/µl)	...	1 µl	...
Oligo Mutagenico Rv (200 ng/µl)	1 µl
DNA TcTIM (100 ng/µl)	3 µl	1 µl	1 µl
Amortiguador de MgCl2 (50mM)	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Buffer sin Mg 2+ (10X)	5 µl	5 µl	5 µl
Taq. DNA polimerasa (3.5U/µl)	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
H2O c.s.p.	37 µl	37 µl	z µl
PCR1 (200 ng/µl)	x µl
PCR2 (200 ng/µl)	y µl

Pasos	Tiempo (min.)	Temperatura (oC)	Número de ciclos
Desnaturalización	5	94	1
Desnaturalización	1	94	30
Alineamiento	1	56	30
Extensión	1.3	72	30

Tabla 5. Condiciones para la amplificación de PCR. Nota: x,y son los volúmenes de PCR1 y PCR2 para 200 ng/µl, z es el volumen de agua para completar 50 µl.

Los productos de la reacción de PCR₁, PCR₂ y PCR₃ fueron purificados con el Kit de extracción en gel (Qiagen) y analizados en geles de agarosa al 1%.

4.3. Clonación en un vector de expresión

Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR₃ y el plásmido de expresión pET-3a (Novagen), (figura 14), fueron digeridos por separado con las enzimas de restricción Nde-I y BamHI (New England Biolabs), mediante 3 ciclos de 15 seg en el horno de microondas (Samsung, 2250 Mhz) con intervalos de 3 minutos. Las digestiones se analizaron en geles de agarosa al 1% y las bandas que correspondían tanto al DNA digerido, como al pET-3a, se cortaron y purificaron utilizando el Kit de extracción en gel (Qiagen). Adicionalmente, el plásmido fue tratado con la enzima fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase Shrimp, ROCHE), para defosforilar los extremos generados, y así evitar su religación y aumentar la eficiencia de clonación.

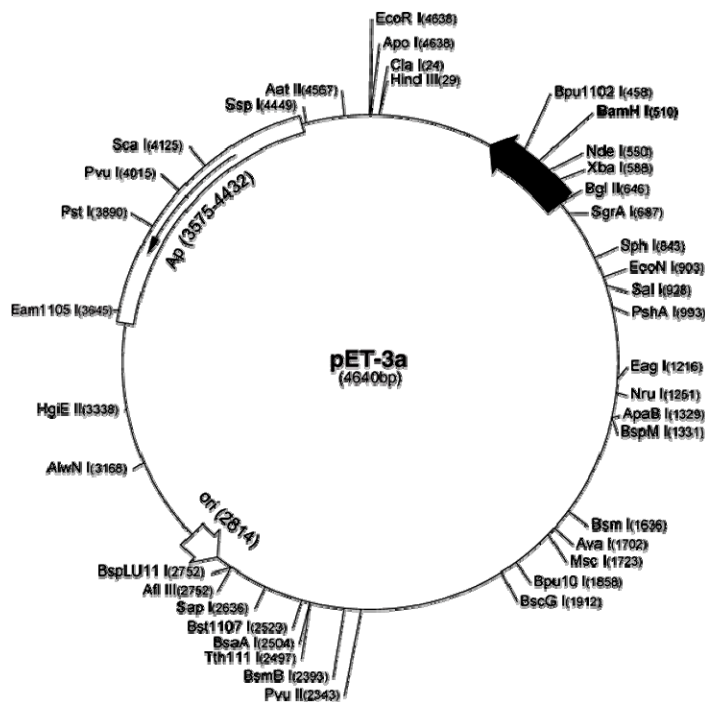


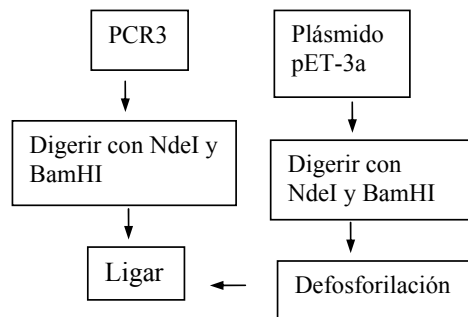
Figura 14. Mapa del vector de expresión pET-3a de Novagen®. La región de clonación para el gene de interés está flanqueada por lo sitios de restricción NdeI y BamHI.

Una vez que se obtuvo el DNA del PCR₃ digerido y el plásmido digerido y defosforilado, se lleva a cabo la reacción de ligación incubando ambos toda la noche a 16 °C en la siguiente proporción (esquema 1).

pET3a - Producto PCR 3 (en relación 1:3)
T4 DNA Ligasa (4 U/ μ l)
Buffer de ligación 10x
H₂O c.s.p. 20 μ l.

Después se transformaron los productos de la reacción de ligación en células competentes de alta replicación de *E. coli* Top 10 y se plaquearon en medio Luria-Bertani (LB)-agar ampicilina 100 μ g/ml .

Las colonias obtenidas se hicieron crecer en nuevo medio de LB con ampicilina, para extraer y purificar posteriormente el DNA utilizando el kit y protocolo de QIAprep Spin, Miniprep Kit, Qiagen.



Esquema 1. Diagrama de flujo de la metodología para la clonación.

Para monitorear cual clona contiene el inserto, el DNA purificado se digirió con las enzimas BamHI y NdeI, ya que el gen insertado está flanqueado por los sitios de reconocimiento para estas enzimas de restricción. Las digestiones se corrieron en gel de agarosa al 1% y se escogieron las clonas positivas.

A las clonas con inserto se les extrajo y purificó el DNA con el objetivo de enviarlas a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, para secuenciarlas y comprobar que se hubiera introducido correctamente la mutación deseada y que no existieran mutaciones o errores en otras partes de la secuencia.

cultivo se observó en geles de SDS-PAGE al 16%, después de determinar su densidad óptica a $A_{600\text{ nm}}$.

4.5 Purificación de las mutantes

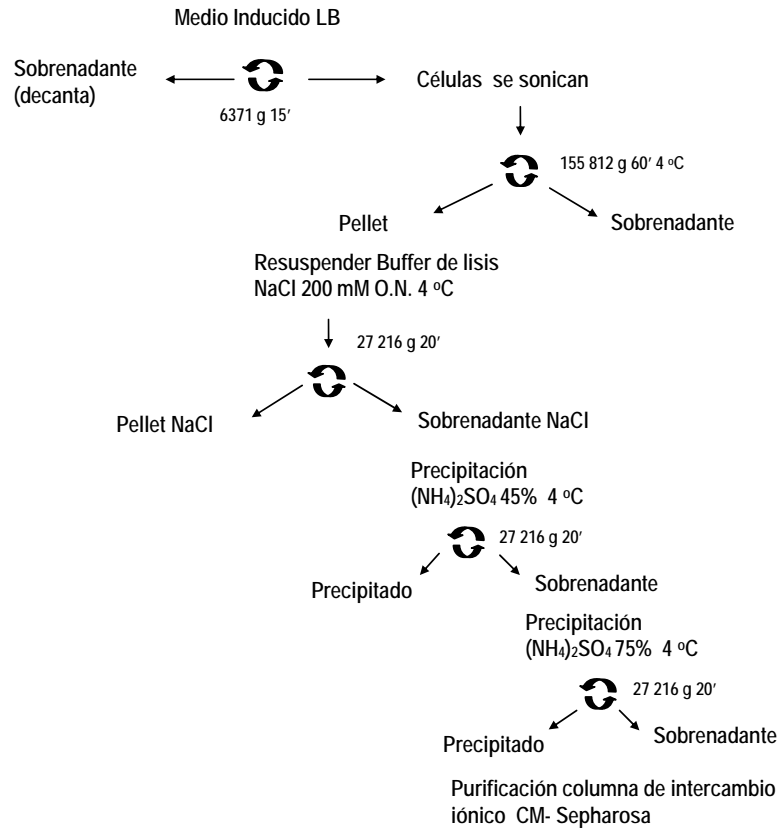
Para la purificación de las proteínas se hizo crecer las células de la cepa *E. coli* BL21DE3pLysS transformada hasta que alcanzaran la fase exponencial, luego se inocularon en 1 litro de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$). El crecimiento inició con una densidad óptica con $A_{600\text{ nm}}$ de aproximadamente 0.1 y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una $A_{600\text{ nm}}$ de aproximadamente de 0.8 a 1.0. Al llegar a esta densidad óptica se agregó el inductor (IPTG) a una concentración de 0.4 mM. El cultivo se incubó aproximadamente 12 horas a 30 °C. Una vez inducido, y sobreexpresada la proteína de interés, se cosecharon por centrifugación a 6371 g 20 min. El botón de células se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis (MES/NaOH 25 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y PMSF 0.2 mM, pH 6.5). Las células se lisaron por sonicación mediante 8 ciclos de 40 seg con descansos de 1 min entre cada uno. La suspensión se ultracentrifugó a 4 °C y 155 812 g durante 1 hora. El sedimento obtenido se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis con NaCl 200 mM a 4 °C en agitación continua durante aproximadamente 12 horas y luego se centrifugó a 27 216 g durante 20 min.

El sobrenadante obtenido se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45% de saturación durante 12 hrs y se centrifugó a 27 216 g durante 15 min. El sobrenadante se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 75 % de saturación durante 12 hrs y posteriormente se centrifugó a 27 216 g durante 15 min.

El botón obtenido se disolvió en 10 mL del amortiguador A con pH 8.0 compuesto por: trietanolamina (TEA) 25 mM, ditioneitol (DTT) 0.5 mM, ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) 2 mM y azida de Sodio (NaN_3) 1 mM.

La mezcla se dializó después contra el mismo amortiguador durante 12-17 hrs. La muestra se pasó por una columna de Carboximetil-Sepharosa (Pharmacia, Biotech), resina de intercambio iónico, equilibrada previamente con amortiguador A, y se eluyó con un gradiente de 0-125 mM de NaCl. Para la elución de la mutante Y103F se utilizó un HPLC con la misma columna de Carboximetil-Sepharosa. Durante la elución se colectaron fracciones de 1 ml. Las proteínas puras se almacenaron a 4 °C precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70%. (Esquema 3).

Durante el proceso de purificación se tomaron muestras que se monitorearon en geles SDS-PAGE al 16%, tiñendo con azul de Coomassie. La concentración de proteínas se cuantificó por el método del ácido bicinconínico (BCA, Protein Assay Reagent Kit) a 562 nm.



Esquema 3. Diagrama de purificación de las mutantes.

La TIM de humano (HTIM) fue purificada según el protocolo descrito por Rodríguez-Almazán, *et al.*, 2008. El gen se encuentra clonado en el vector de expresión pET3b (Novagen) el cual fue modificado para adicionar una secuencia de histidinas y facilitar su purificación. El vector se encuentra transformado en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. La enzima se almacenó a 4 °C en una solución de trietanolamina 100mM, EDTA 10 mM (pH 7.4).

4.6 Determinación de la actividad catalítica.

La actividad enzimática de la TcTIM y mutantes se midió espectrofotométricamente en dirección del gliceraldehído-3-fosfato 3 fosfato (G3P) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) 1 mM en un buffer de TEA 100 mM y EDTA 10 mM, pH 7.4, en una reacción acoplada con la enzima α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (α -GDH) a 1.25 U/ml, siguiendo la oxidación del NADH en concentraciones iniciales de 0.2 mM a una absorbancia de 340 nm. La concentración de proteína para iniciar la reacción fue de 5 ng para un volumen total de reacción de 1 ml. (Figura 15).

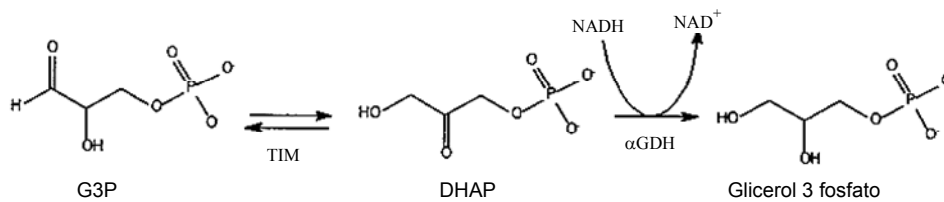


Figura 15. Reacción acoplada para medir la actividad de la TIM. La TIM cataliza la transformación del G3P en DHAP, el proceso se sigue espectrofotométricamente por la reacción acoplada de la α -GDH, enzima que convierte la DHAP y el NADH en glicerol 3-fosfato y NAD⁺.

4.7 Determinación de parámetros cinéticos

Para caracterizar cinéticamente las mutantes, se obtuvieron los parámetros cinéticos k_m y k_{cat} realizando ensayos a diferentes concentraciones de sustrato (G3P), desde 0.05 hasta 2.5 mM. Las actividades específicas resultantes se graficaron contra cada concentración de G3P correspondiente. Las curvas obtenidas se ajustaron al modelo de Michaelis- Menten (ecuación 1) y se calcularon la K_m y la $V_{m\acute{a}x}$ por regresión no lineal, a través del programa Origin Professional 6.0.

$$V_0 = (V_{m\acute{a}x} [S]) / k_m + [S] \quad \text{-----} \quad \text{donde}$$

V_0 : velocidad inicial
 $V_{m\acute{a}x}$: velocidad máxima;
 $[S]$: concentración inicial de sustrato
 k_m : constante de Michaelis-Menten.

Ecuación 1. Ecuación de velocidad de Michaelis y Menten.

4.8 Estabilidad a la dilución

Para ver el efecto de la concentración en la estabilidad específica de las enzimas, la TcTIM y las mutantes se incubaron en un intervalo de concentración de 0.5 a 200 µg/ml en amortiguador de TEA 100mM, EDTA 10 mM a pH 7.4 durante 2 horas a 36 °C. La actividad catalítica se determinó con 5 ng/ml de proteína antes y después de las 2 horas de incubación. Se graficó el % de actividad catalítica contra la concentración de proteína. La curva se ajustó por regresión no lineal a una sigmoide, luego que el eje de las x se ajustara a escala logarítmica, utilizando el programa Origin Professional 6.0. Modelo "Logistic" aplicando la ecuación:

$$y = [A_1 - A_2 / (1 + (x/x_0)^p)] + A_2$$

x: Concentración de proteína
y: % Actividad residual
A₁: Valor de ajuste inicial
A₂: Valor de ajuste final
x₀: Valor medio o centro del ajuste
p: poder

Ecuación 2. Ecuación para la determinación de K_d. Se tomó como valor de K_d a x₀, que es la concentración aproximada a la cual el 50% de la proteína se encuentra disociada.

4.9 Ensayos de inhibición con el compuesto 8

La actividad catalítica de TcTIM y las mutantes se determinó a concentraciones de 5 ng/ml de estas enzimas después de haber sido incubadas a 50 µg/ml en amortiguador de TEA 100 mM, EDTA 10 mM a pH 7.4 durante 2 horas a 36 °C a diferentes concentraciones del compuesto 8 (40-400 µM). La I₅₀, concentración de compuesto que induce la mitad de la inactivación máxima, se determinó a través de las curvas de inactivación del compuesto 8 para cada enzima utilizando la ecuación (Téllez-Valencia, *et al.*, 2002):

$$V_i = (V_0 \times I_{50}^n) / (I_{50}^n + I^n)$$

Donde:

V_i: Es la actividad a la concentración dada del compuesto
V₀: Indica la actividad inicial
I₅₀: Concentración del compuesto que induce el 50% de la inactivación
n: Es el número de Hill

Ecuación 3. Ecuación para la determinación de la I₅₀.

4.10 Cristalización y colecta de datos

Se obtuvo la estructura cristalina de las mutantes Y103V, Y103F y Y102F/Y103F. El método de cristalización empleado fue la difusión de vapor en gota colgante. Las gotas fueron formadas de 2 μ l de solución de proteína entre 8 y 11 mg/ml más 2 μ l de solución de cristalización del reservorio. Todas estas mutantes de TcTIM cristalizaron en presencia de la solución de cristalización “*crystal screen 1 number 9*” (CS9, Hampton Research). Adicionalmente se colocaron gotas de cristalización con CS9 en donde se usó como aditivo PEG 400 al 10-15% v/v extra para controlar la nucleación y como agente de crio-protección durante la difracción. La solución CS9 contiene 0.1 M de citrato de sodio tribásico dihidratado pH 5.6, 0.2 M de acetato de amonio y 30 % w/v polietilenglicol 400. Para la mutante Y102F/Y103F se usaron cristales formados en CS9 sin el aditivo de PEG 400; para esta mutante se usó glicerol como crioprotector.

Los cristales se montaron en el sistema de crio-loops (Hampton Research) y se congelaron en nitrógeno líquido por inmersión y se almacenaron para su traslado en un *dry shipper* o contenedor seco para viaje (no va a presión) de muestras congeladas con nitrógeno líquido.

La colecta de la difracción de los cristales fue realizada a temperatura de flujo de nitrógeno (aprox. 100° K) en Advanced Photon Source (APS) del Argonne National Laboratory (Argonne, Chicago II, USA) líneas SER-CAT 22-ID y DND-CAT 5-ID.

Los datos de la difracción fueron integrados, reducidos y escalados con CCP4 v.6 (programas de MOSFILM y de SCALA). Las reflexiones para la prueba de R free fueron separadas con el programa SCALA y seleccionadas con el método al azar. Las estructuras fueron resueltas usando reemplazo molecular con el programa phaser (CCP4 v.6) con todos los grupos espaciales posibles para el red de simetría ortorrómbica. El archivo de PDB usado como templado en reemplazo molécula fue 1TCD (TcTIM enzima silvestre) y fue modificado en los residuos mutados (posiciones 102 y 103) por ALA, así como retiradas las coordenadas correspondientes a los residuos del asa 6 (170 to 176).

El afinamiento cristalográfico fue hecho usando el programa “CNS 1.2” a través de los pasos siguientes: 1) recocido simulado, 2) ajuste manual del modelo en los mapas de densidad electrónica generados en Refmac (CCP4 v.6) y CNS (mapas de omisión de

región), y 3) minimización y afinamiento de valores de desplazamiento atómico (valores B). Los pasos 2 y 3 fueron repetidos incrementando la resolución y usando la misma prueba de R “free” establecida. El ajuste manual del modelo a los mapas generados fue realizado con el programa gráfico “Coot” (CCP4 v.6). Las moléculas de aguas fueron buscadas automáticamente en “WinCoot” subrutina: Find Waters - Mask - Find Peaks. Se usó como máscara la proteína construida y para la búsqueda se realizó 3 ciclo bajando el sigma a 2.0, luego 1.6 y 1.4, guardando las aguas potenciales en cada ciclo. Luego se examinaron las aguas visualmente cotejando el mapa de densidad electrónica 2 Fo-Fc a 1.4 Sigmas y el mapa Fo-Fc a 2 Sigmas. Todas las aguas o posibles aguas a menos de 1.4 Sigmas fueron descartadas, excepto aquellas a 1.3 Sigmas que presentaran una esfera bien definida e interacciones por puentes de hidrógeno a 2.6-3 Å de distancia. Finalmente se realizó una búsqueda en “WinCoot” adicionando algunas moléculas de agua con criterio manual.

4.11 Determinación del área accesible al solvente

El Área Accesible al Solvente (ASA) de cada residuo en todas las mutantes cristalizadas y la enzima silvestre se determinó por medio del programa “Getarea 1.1” con un radio de esfera de 1.2 Å. (Servidor “Output of Getarea 1.1” www.scsb.utmb.edu/getarea/area_form.html).

4.12 Análisis de interacciones Cación – pi

Las interacciones Cación–pi son interacciones no covalentes entre la cara de un sistema π rico en electrones (como los sistemas aromáticos) y grupos catiónicos. Energéticamente tienen el mismo orden de magnitud que los enlaces de hidrógeno y los puentes salinos y juegan un papel importante en el reconocimiento de moléculas y la estabilidad de las proteínas.

En los grupos aromáticos la densidad electrónica, por debajo y por encima del anillo aromático, confiere una carga parcial negativa que puede interactuar favorablemente con grupos cargados positivamente como los grupos amino de Arg y Lys.

Utilizando las coordenadas cristalográficas de la enzima silvestre (clave PDB: 1TCD) y las mutantes, se hicieron análisis de las interacciones cación–pi, energéticamente significativas, en los residuos de la zona del cluster aromático utilizando el programa CaPTURE (Gallivan & Dougherty, 1999).

4.13 Efecto de Cloruro de Sodio y Cloruro de Amonio en la actividad

Se determinó la actividad catalítica de la TcTIM y las mutantes Y103V, Y103F a 5 ng/ml en amortiguador de TEA 100 mM/EDTA 10 mM a pH 7 con concentraciones de 0.05 a 1 M de cloruro de sodio (NaCl) y de 50 a 200 mM de cloruro de amonio (NH₄Cl) en 50 µg/ml de proteína. Se calculó el % actividad residual para cada concentración de NaCl y NH₄Cl tomando como 100% la actividad en ausencia de sal.

4.14 Ensayos de inactivación por Metilmetanotiosulfonato

Se probó el efecto del metilmetanotiosulfonato (MMTS) sobre la actividad de las mutantes Y103V, Y103F y la enzima silvestre a 50 µg/ml en un amortiguador de TEA 100mM, EDTA 10mM, pH 7, con concentraciones de 2.5 a 20 µM de MMTS. Se midió la actividad de las enzimas a tiempo cero y luego se incubaron durante 2 horas a 25°C; al cabo de este tiempo se tomaron alícuotas para medir la actividad con una concentración final de enzima de 5 ng/ml. El porcentaje de actividad residual se calculó con respecto a la actividad de las enzimas en el tiempo cero en ausencia de MMTS.



MMTS

Metildisulfuro

Figura 16. Reacción de derivatización entre el metilmetanotiosulfonato y el grupo sulfhidrilo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Mutación de los genes que codifican para las enzimas mutantes

Los productos de las reacciones de PCR realizadas para introducir las mutaciones en los residuos 102 y 103 en la TcTIM se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% como se muestra en las figuras 17 y 18.

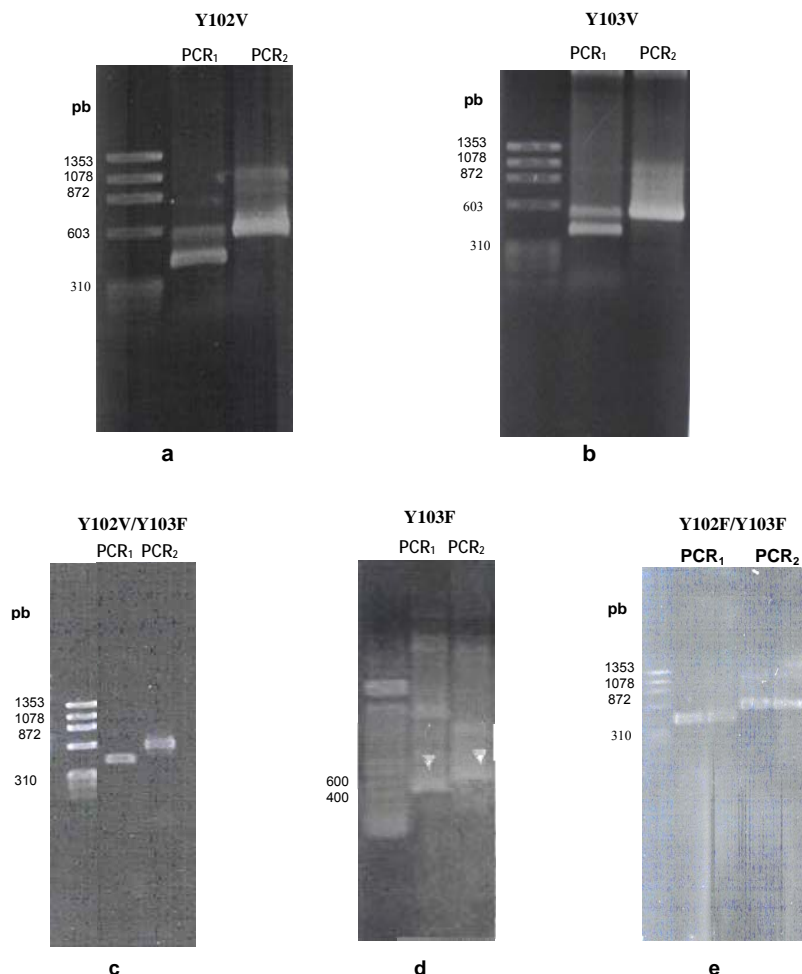


Figura 17. Electroforesis en geles de agarosa al 1% (P/V), productos amplificados de PCR1 y PCR2. En todos los carriles 1 se observa el marcador de peso molecular IX de ROCHE[®], excepto en el gel (d) que se utiliza un marcador de molecular 100pb de Invitrogen. Carriles 2 y 3, PCR1 y PCR2, respectivamente, (a): Mutante Y102V. (b): Mutante Y103V. (c): Mutante Y102V/Y103F. (d): Mutante Y103F.; (e): Mutantes Y102F/Y103F. Los fragmentos amplificados corresponden al peso de los fragmentos esperados para cada una de las reacciones que es de aproximadamente 403pb para la PCR1 y 590pb para la PCR2.

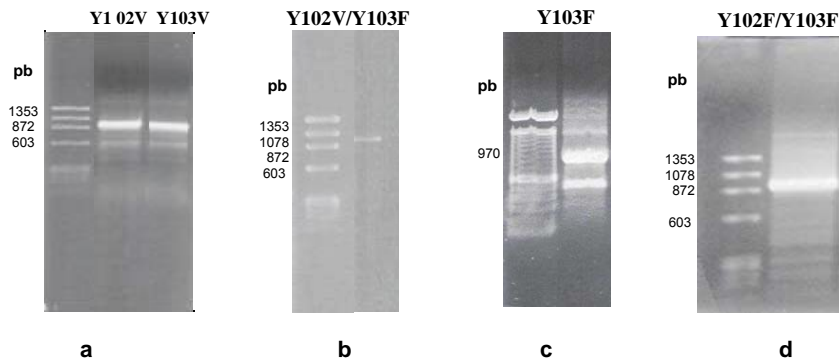
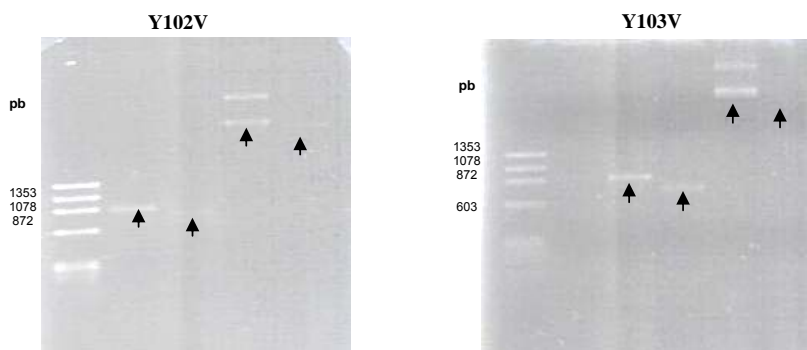


Figura 18. Electroforesis en geles de agarosa al 1% (P/V), productos amplificados de PCR3. **(a)**: Los carriles 2 y 3 corresponden al PCR3 de las mutantes Y02V y Y103V respectivamente; **(b)**: Carril 2, PCR3, de la mutante Y102V/Y103F; **(c)**: Carril 2, PCR3 de la mutante Y103F; **(d)**: Carril 2, PCR3, de la mutante Y102FY103F. Los fragmentos amplificados corresponden al peso de los fragmentos esperados de aproximadamente 970pb.

5.2 Ligaciones y digestiones

Se realizaron las digestiones del plásmido y el inserto de DNA de cada mutante para llevar a cabo las reacciones de ligación. En la figura 19 se muestra el plásmido pET-3a y el DNA de las mutantes obtenido de las reacciones de PCR3, tanto digeridos y como sin digerir. Cada uno de estos DNAs está listo para realizar la reacción de ligación. Los fragmentos corresponden al peso esperado, tanto para el inserto como para el pET-3a.



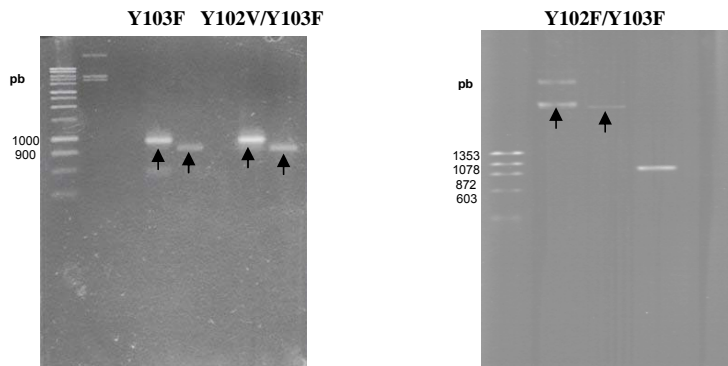


Figura 19. Geles de agarosa al 1% mostrando el corrimiento por electroforesis de los DNAs digeridos y sin digerir, y el pET-3a digerido y sin digerir, ambos listos para hacer la reacción de ligación para cada mutante.

Hecha la reacción de ligación, y confirmada la presencia del inserto, se enviaron las clonas a secuenciar utilizando los oligonucleótidos externos T7 promotor y T7 terminador que flanquean el gen insertado. En la figura 20 se muestran las porciones de los electrofluorogramas de los genes donde se distinguen las mutaciones para cada enzima.

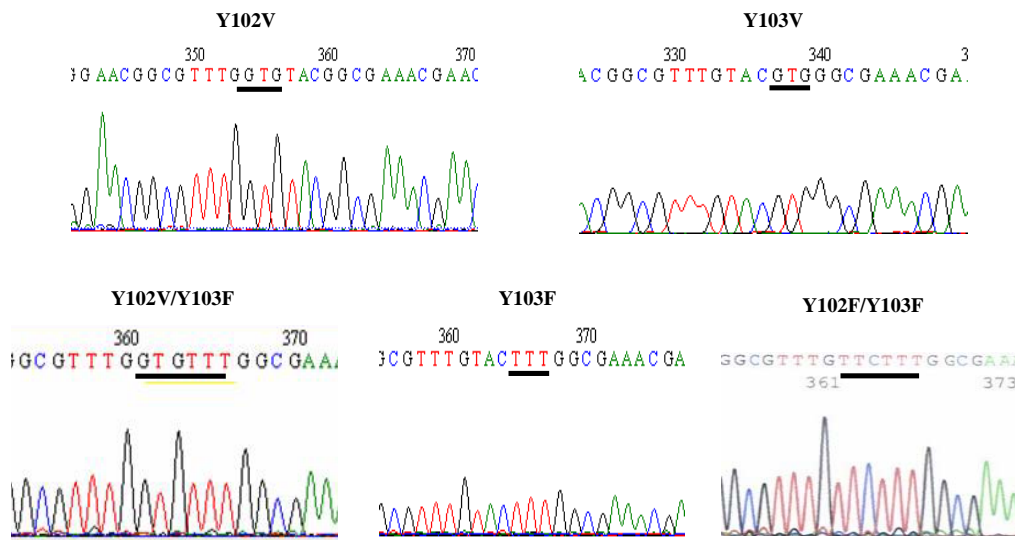


Figura 20. Electrofluorogramas de la secuenciación de los genes para las mutantes Y102V, Y103V, Y102V/Y103F, Y103F y Y102F/Y103F. Con las líneas negras se indican los codones de las bases mutadas.

Aparentemente no hubo diferencias significativas en la sobreexpresión de las mutantes al incubarlas a las diferentes temperaturas. Al escalar los cultivo para la purificación se decidió incubar las mutantes a 30 °C.

5.4 Purificación de las proteínas recombinantes

Las purificaciones se realizaron a partir de un litro de cultivo bacteriano, excepto en la mutante Y103F, para la cual se utilizaron 500 ml. El proceso se siguió tomando alícuotas y analizándolas en condiciones desnaturalizantes con geles al 16% en SDS-PAGE y tiñendo con azul de Coomassie. Para purificar las enzimas mutantes, inicialmente se siguió el protocolo reportado por Ostoa-Saloma, *et. al*, (1997), pero, a diferencia de la TcTIM silvestre, durante la precipitación diferencial con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ las proteínas se enriquecieron más en el pellet que en el sobrenadante. Las logramos solubilizar en NaCl 200 mM y, en consecuencia, realizamos el protocolo descrito en la sección 4.5. En las figuras se muestran los geles de SDS-PAGE al 16% de los perfiles de elución de las columnas durante los pasos de la purificación.

En los geles las bandas de las proteínas enriquecidas corresponde a 27 kDa, que coincide con el peso para el monómero de la TcTIM.

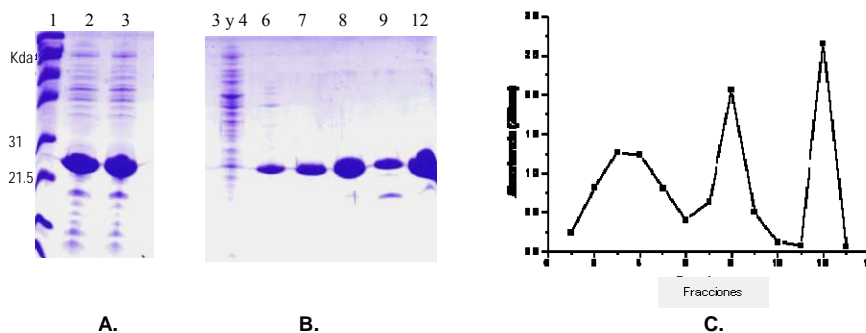


Figura 22. Pasos de la purificación de la mutante Y102V Gel SDS-PAGE al 16%. **A.** 1. Marcador de pesos; 2. Muestra antes de dializar; 3. Muestra antes de adsorber en la columna, **B.** Fracciones eluidas de la columna de intercambio iónico, **C.** Diagrama de elución de las fracciones eluidas de la columna.

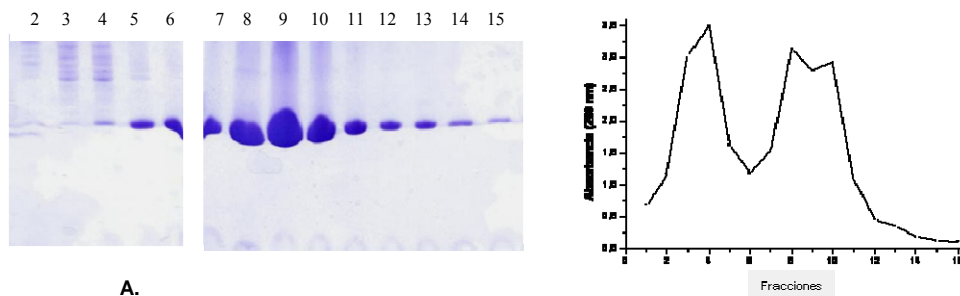


Figura 23. **A.** Fracciones eluidas de la mutante Y103V en la columna de Intercambio iónico. **B.** Diagrama de elución de las fracciones eluidas de la columna.

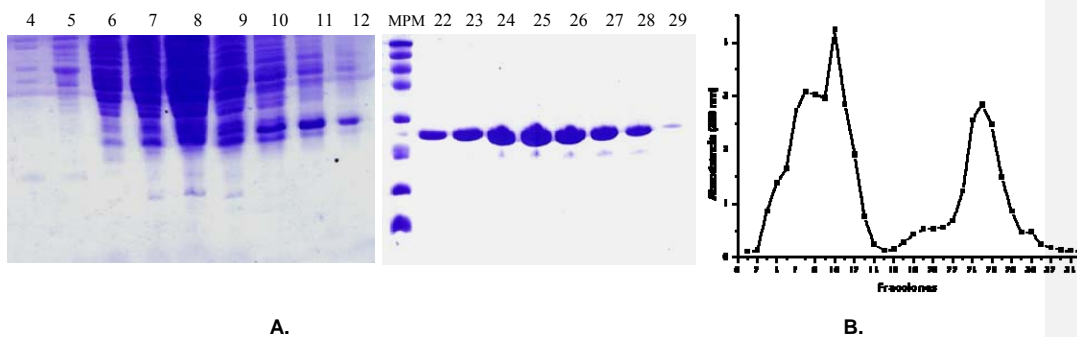


Figura 24. Mutante Y102V/Y103F. **A.** Fracciones eluidas de la columna de Intercambio iónico, **B.** Diagrama de elución de las fracciones eluidas de la columna.

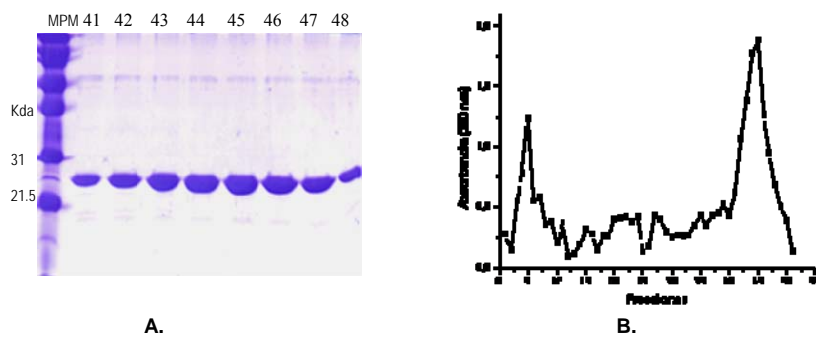


Figura 25. **A.** Fracciones eluidas de la mutante Y103F por HPLC en columna de intercambio iónico, **B.** Diagrama de elución de las fracciones eluidas por HPLC.

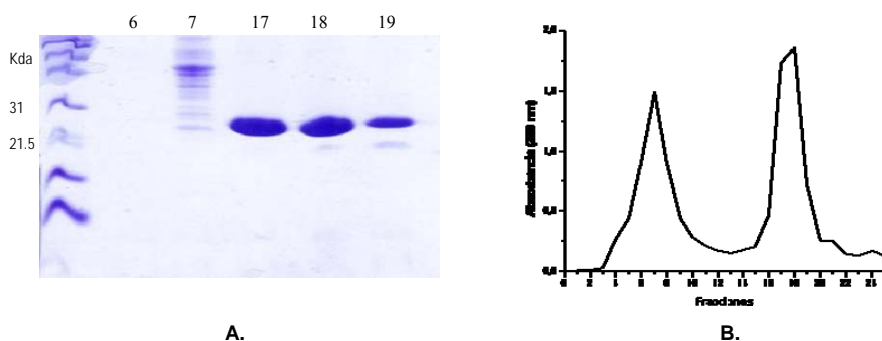


Figura 26. **A.** Fracciones eluidas de la mutante Y102F/Y103F en la columna de Intercambio iónico. **B.** Diagrama de elución de las fracciones eluidas de la columna.

Las fracciones eluidas de la columna que se observaron en el gel con mayor grado de pureza se juntaron y cuantificó a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar de $34\ 950\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para las mutantes Y102V, Y103V, Y103F; y $33\ 460\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para las mutantes Y102V/Y103F y Y102F/Y103F, determinado por el programa "ProtParam" utilizando el servidor "ExPASy Proteomics". (Gasteiger E., *et al.*, 2005).

Las proteínas puras se precipitaron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% y almacenaron a $4\ ^\circ\text{C}$. (Figura 27).

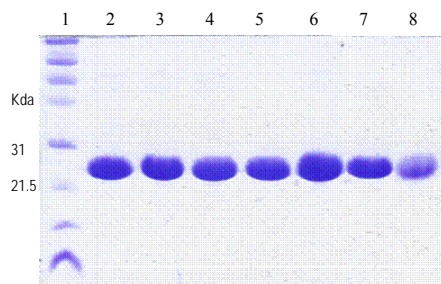


Figura 27. Gel SDS-PAGE al 16%. Proteínas puras. 1. Marcador de pesos; 2. Mutante Y102V; 3. Mutante Y103V; 4. Mutante Y102V/Y103F; 5. Mutante Y103F; 6. Mutante Y102F/Y103F; 7. TcTIM; 8. HTIM.

En las tablas 6, 7, 8, 9, y 10 se puede apreciar el seguimiento cuantitativo de algunas de las principales etapas de la purificación de las enzimas mutantes.

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Actividad total ($\times 10^5$) ($\mu\text{mol .0min}^{-1}$)	% Rendimiento
Extracto Total	387.6	1177.7	4.56	100
Pdo. Ultra.	112.8	1184.9	1.33	29.1
Sn. Ultra	275.6	566.5	1.56	32.9
Pdo. 75%	136.0	3014.2	4.09	89.6
Purif. Columna	53.6	2979.0	1.59	34.8

Tabla 6. Tabla de purificación de la mutante Y102V.

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Actividad total ($\times 10^5$) ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	% Rendimiento
Extracto Total	688.0	836.1	5.75	100
Pdo. Ultra.	188.0	1689.0	3.17	55.1
Sn. Ultra	280.4	656.4	1.84	32.0
Pdo. 75%	80.3	2333.7	1.87	32.5
Purif. Columna	42.3	2668.7	1.13	19.6

Tabla 7. Tabla de purificación de la mutante Y103V.

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Actividad total (10^5) ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	% Rendimiento
Extracto Total	447.7	584.3	2.62	100
Pdo. Ultra	187.2	1182.1	2.21	84.3
Sn. Ultra	262.8	675.5	1.77	67.5
Pdo. 75%	48.8	2628.6	1.28	48.8
Purif. Columna	32.4	2893.9	0.94	35.8

Tabla 8. Tabla de purificación de la mutante Y102V/Y103F.

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Actividad total (10^5) ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	% Rendimiento
Extracto Total	324.0	1599.8	5.18	100
Pdo. Ultra	108.5	2014.1	2.10	40.5
Sn. Ultra	164.8	1599.8	1.98	38.2
Pdo. 75%	85.1	2654.0	2.26	43.6
Purif. Columna	25.9	3145.9	0.82	15.8

Tabla 9. Tabla de purificación de la mutante Y103F.

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Actividad total (10^5) ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	% Rendimiento
Extracto Total	867.6	1027.3	8.91	100
Pdo. Ultra	130.8	2990.4	3.90	43.8
Sn. Ultra	452.0	887.5	4.01	45.0
Pdo. 75%	128.0	3802.6	4.87	54.7
Purif. Columna	51.1	3418.0	1.74	19.5

Tabla 10. Tabla de purificación de la mutante Y102F/Y103F.

De la cantidad total de proteínas que habían inicialmente en el extracto total de las mutantes Y102V, Y103V, Y102V/Y103F, Y103F y Y102F/Y103F, se obtuvo un 13.8%, 6.2%, 7.2%, 7.9% y 5.9% respectivamente de proteínas puras.

5.5 Caracterización cinética

De forma general, como se observa en la tabla 11, no hubo diferencias significativas entre los valores cinéticos obtenidos de las mutantes y la enzima silvestre. La K_m determinada para TcTIM es similar a la reportada por la literatura.

Enzima	K_m (mM)	$k_{cat} \times 10^5$ (min^{-1})	$k_{cat}/K_m \times 10^7$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
TcTIM	0.44 ± 0.009	2.76	1.04
Y102V	0.70 ± 0.101	2.75	0.65
Y103V	0.67 ± 0.088	2.06	0.51
Y102V/Y103F	0.84 ± 0.101	2.62	0.52
Y103F	0.51 ± 0.041	2.64	0.86
Y102F/Y103F	0.56 ± 0.117	2.89	0.86
HTIM	0.49*	2.70*	0.92

Tabla 11. Los parámetros cinéticos se determinaron al graficar la actividad contra diferentes concentraciones de sustrato tanto para la enzima silvestre como las mutantes. Los datos se ajustaron por regresión no lineal utilizando el modelo de Michaelis-Menten. * Datos tomados de Mainfroid, V.; *et al*, 1996.

Al hacer una comparación más detallada observamos que las mutantes a las cuales se les sustituyó la Tyr por Val, ya sea en la posición 102 o 103, tienden a tener valores

de K_m mayores; sin embargo, las K_m de las enzimas Y103F y Y102F/Y103F son parecidas a la de la TcTIM. Es decir, el cambio por Val resulta en mutantes con afinidad ligeramente menor por el sustrato, pero, el remplazo de las Tyr por Phe parece no afectar la afinidad. Estos efectos se ven reflejados en la constante de especificidad (k_{cat}/K_m), donde, las mutantes Y103F y Y102F/Y103F, presentan cifras similares a las de la enzima silvestre y las mutantes Y102V, Y103V y Y102V/Y103F son catalíticamente menos eficientes.

Por otro lado las mutaciones no provocaron cambios significativos en la constante catalítica (k_{cat}).

A pesar de la diferencias que existen en la secuencia (48.7% de identidad), los parámetros cinéticos reportados para la HTIM son similares a los de TcTIM con una K_m de aproximadamente 0.50 mM (Mainfroid, *et al.*, 1996; Tellez Valencia *et al.*, 2002).

5.6 Efecto de la estabilidad a la dilución

En varias publicaciones se ha descrito la importancia de la concentración en la estabilidad de la TcTIM (Mainfroid, *et al.*, 1996, Tellez Valencia *et al.*, 2002) y su influencia en la proporción dímero-monómero, señalando la pérdida de la actividad a medida que la enzima presenta mayor dilución. En base a estos antecedentes decidimos ver el comportamiento de las mutantes y la TcTIM a diferentes concentraciones, incubándolas durante dos horas a 36 °C a concentraciones desde 0.05 hasta 200 µg/ml. Posteriormente se determinó el porcentaje (%) de actividad residual y, a través de un ajuste por regresión no lineal, se determinó la constante de disociación (K_d) luego de graficar el % actividad residual contra concentración de proteína. Este ensayo permitió definir la concentración de enzima a la cual su actividad no se vio afectada por la dilución, después de ser incubada durante 2 horas a 36 °C, y tomarla para realizar los ensayos con el compuesto 8. Además, se pudo comparar el efecto de la dilución en las mutantes con el mismo tratamiento en la enzima silvestre.

La figura 28 muestra las diferencias en estabilidad entre las proteínas y la magnitud de estas diferencias se puede ver reflejada en el valor de las constantes de disociación (K_d). Las mutantes Y102V y Y103V son las más inestables bajo las condiciones de este ensayo, con valores de K_d casi del doble de la enzima silvestre. De las dos enzimas, la inestabilidad es mayor cuando la Val sustituye a la Tyr en la posición 103, lo que quiere

decir que la mutante Y103V se monomeriza a concentraciones mayores que el resto de las enzimas, con una K_d de 14.0×10^{-8} . En cambio, en las enzimas en que la posición 103 se les mutó por Phe, tienden a ser más estables a la dilución, con valores de K_d similares a la TcTIM.

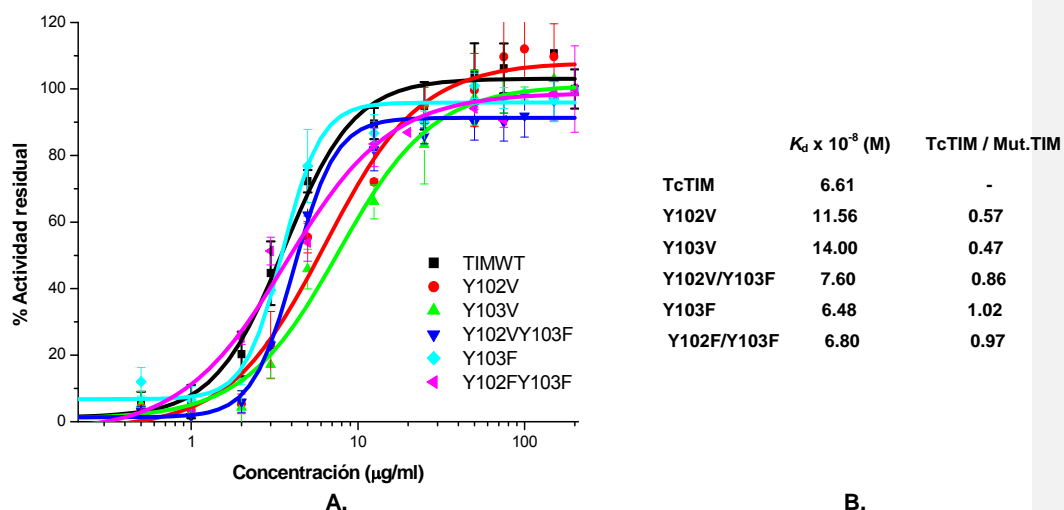


Figura 28. **A.** Ensayos de estabilidad a la dilución por incubación de las enzimas durante 2 horas a 36°C a diferentes concentraciones de proteína. **B.** Constantes de disociación (K_d) determinadas para cada mutante y la TIM silvestre, representa la concentración aproximada a la cual la mitad de las proteínas se encuentran en forma de dímero \leftrightarrow monómero. La última columna muestra el cociente de K_d s entre la TcTIM y las mutantes.

Probablemente este comportamiento está relacionado con los residuos ó interacciones óptimas que ha ido desarrollando la proteína a través de la evolución para darle mayor estabilidad y funcionalidad, ya que si hacemos un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la TIM de 655 especies, tomando como referencia la TcTIM, observamos que la naturaleza es estricta con el volumen y variedad de aminoácidos en la posición 103, pues además de ser una posición conservada donde la Phe se encuentra en el 55.09% de las especies, los residuos que aparecen en mayor proporción son de tamaño voluminoso.

Esto podría explicar los resultados obtenidos en nuestra caracterización, donde las diferencias más notables han sido cuando hemos mutado la posición 103 y la proteína ha sido más inestable y sensible al sustituir un residuo aromático por Val, como en la mutante Y103V. Por otro lado, la posición 102 es menos conservada, donde el 34.7% de

las especies presenta Tyr, y la variedad de residuos que pueden ocupar esta posición es mayor (Tabla 12).

A pesar de que las especies comparadas pueden encontrarse alejadas evolutivamente, los residuos que forman parte del cluster aromático en las TIMs conservan mayoritariamente sus características hidrofóbicas, indicando la importancia de esta zona en la estabilidad de la proteína.

Del 34.7% de las especies que presentan Tyr en la posición 102, sólo un 7% tienen Tyr en la posición 103 (como la TcTIM). Del 15.6% de las especies que poseen Val en la posición 102, el 90.19% tienen Phe en la posición 103 (Y102V/Y103F) y solo 1.96% (2 especies) tienen Tyr en la posición 102 (Y102V) lo que representa un 14% y 0.30%, respectivamente, del total de las especies analizadas (Tabla 12).

Aminoácidos	75	102	103
	%	%	%
Tyr	25.51	34.70	6.57
Val	-	15.60	-
Phe	59.05	1.53	95.04
His	5.83	0.15	18.96
Ileu	-	21.71	2.90
Asp	-	4.74	-
Leu	1.26	12.08	5.51
Ala	-	0.46	-
Arg	0.47	0.15	0.31
Asn	0.15	0.15	0.76
Cys	0.15	0.15	0.31
Glu	-	1.07	-
Gln	-	0.61	0.46
Gly	0.15	0.92	-
Thr	-	0.61	-
Lys	-	0.31	0.46
Met	-	4.43	0.44
Pro	-	0.15	-
Trp	7.40	0.15	
Ser	-	0.31	0.15

Tabla 12. Comparación en porcentaje de los residuos en la posición 75, 102, 103 que se encontraron por alineamiento de la secuencias de aminoácidos de la TIM en 655 especies tomando como referencia la TcTIM.

En la tabla 13, se hace un análisis de la proporción en que se encuentran los residuos de la posición 75, 102, 103 a la vez en las mutantes, TcTIM y HTIM. No incluimos la posición 69, que en el humano presenta Tyr y forma parte de su cluster aromático, porque solo 7 especies (1.07%) tienen Ile en la posición 69, todos ellos tripanosomátidos, y presentan Phe75, Tyr102 y Tyr103. Por lo tanto, en la tabla solo analizamos los residuos que exhiben el cluster de la TcTIM.

Hay 2 especies que tienen Val en la posición 102 y Tyr en 103 (como comentamos anteriormente), pero en la posición 75 presentan Tyr, e His en la posición 69. Por lo tanto no se identificaron especies que presenten las combinaciones de los 4 residuos (69, 75, 102 y 103), con la combinatoria de aminoácidos que tienen las mutantes estudiadas. Quizás esto significa que, por selección natural, la combinación de residuos que están presentes en las mutantes estudiadas, como parte del cluster aromático, no son las óptimas, lo que no quiere decir que la enzimas no sean funcionales, ya que se lograron caracterizar cinéticamente, y sus parámetros no diferían significativamente de la enzima silvestre.

Enzimas/Posición	75	102	103	%
TcTIM	Phe	Tyr	Tyr	1,53
Y102V	Phe	Val	Tyr	—
Y103V	Phe	Tyr	Val	—
Y102V/Y103F	Phe	Val	Phe	13,59
Y103F	Phe	Tyr	Phe	11,75
Y102F/Y103F	Phe	Phe	Phe	0,3
HTIM	Phe	Val	Phe	13,59

Tabla 13. Porcentaje de las especies que se identificaron con la combinación de residuos en la posición 75, 102, 103 presentes en las mutantes obtenidas por un alineamiento de la secuencias de aminoácidos de la TIM en 655 especies tomando como referencia la TcTIM.

Considerando los resultados de la tabla 13, podemos resumir que los residuos que están en mayor proporción son los que presenta la TIM de humano. Además del 14% de las especies que presentaban la combinación 102V103F, mencionada anteriormente, la mayoría (13.59%) tienen Phe en la posición 75 y el 13.1% de la especies presentan además Tyr en la posición 69, que son exactamente los residuos que están presentes en el cluster de la HTIM.

Con todo lo antes descrito, y en base a nuestros resultados, parece que la posición 103 es importante en las interacciones de la enzima y sugiere que, el que la Phe ocupe esa posición, permite que las interacciones sean favorables. No obstante, no ocurre lo mismo si la Phe se encuentra en la posición 102, pues son muy pocas las especies (8 de 655) que presentan Phe en la posición 102.

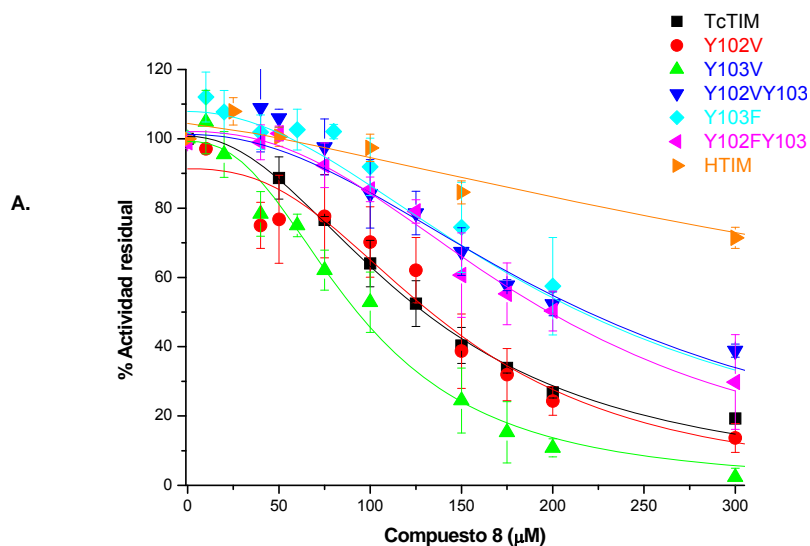
Según lo expuesto anteriormente, parece haber una correlación entre los resultados obtenidos para la estabilidad de las diferentes proteínas mutantes con la probabilidad de encontrar cierto tipo de residuo en la posición 102 o 103 y qué tan conservados están en la escala evolutiva.

5.7 Ensayos de inhibición con el compuesto 8

Las enzimas se incubaron a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ durante 2 horas a 36°C con concentraciones de 40-400 μM de compuesto 8. Estas condiciones difieren del protocolo desarrollado por Téllez-Valencia et al. (2002) para los ensayos de inhibición con los benzotiazoles, en que incuban a las enzimas silvestres a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$. Debido a que algunas mutantes eran menos estables a la dilución que la enzima silvestre, para nuestros ensayos se decidió escoger una concentración en la cual la mayoría de las mutantes recuperaran su actividad residual en un 90-100 %, para poder asegurar que la pérdida de la actividad se debiera solo a la inhibición con el compuesto.

En la figura 29 podemos observar que la mutante Y103V es la más sensible al compuesto 8 y presenta la I_{50} más baja, (la I_{50} es la mitad de la concentración a la cual ocurre la máxima inhibición). Este efecto sólo se da cuando sustituimos la Tyr por Val en la posición 103, porque, si mutamos el aminoácido en la posición 102 por Val (mutante Y102V) esto no parece afectar la sensibilidad de esa mutante frente al inhibidor comparado con la enzima silvestre. Sin embargo, al sustituirse la Phe por Tyr en la posición 103; las enzimas que se generan son más resistentes al compuesto 8, y de gran interés para nuestro estudios, por tener un comportamiento más parecido a la HTIM. En la tabla 3 publicada por Olivares-Illana, et al. (2006), se puede observar que los residuos en la posición 103 son iguales en las TIMs de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* (TbTIM) y *Leishmania mexicana* (LmTIM) (que presentan Tyr) y diferentes en las TIMs de humano, levadura, pollo, *Plasmodium falciparum* (PfTIM) y

Entamoeba histolytica que tienen Phe. Esta diferencia pudiera ser responsable del distinto comportamiento, en la estabilidad a dilución y sensibilidad a los compuestos benzotiazoles de las enzimas en los tripanosomátidos de las otras especies.



B.

Enzimas	I_{50} (μM)	n	V_o
TcTIM	128.57	2.1	100.7
Y102V	143.57	2.5	91.3
Y103V	93.47	2.4	99.2
Y102V/Y103F	200.57	2.0	107.9
Y103F	217.17	2.4	106.7
Y102F/Y103F	194.56	2.3	102.1
HTIM	572.80	1.3	104.4

Figura 29. Ensayos de inhibición con el compuesto 8. Las enzimas se incubaron durante 2 horas a 36 °C a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ con el compuesto 8. **A.** Curva de % de actividad residual contra concentración de compuesto 8. **B.** I_{50} s de las mutantes TcTIM, Y102V, Y103V, Y103F, Y102V/Y103F, Y102F/Y103F y HTIM; mostrando que la mutante Y103V fue la más sensible a la acción del compuesto 8. El valor de n nos sugiere que todas las mutantes al menos 2 moléculas están involucradas en la inactivación; V_o es la velocidad inicial de la reacción.

Los valores de n, determinados tanto para las mutantes como para la TcTIM son cercanos a 2 (figura 29 B.), lo que sugiere que, al menos 2 moléculas de compuesto 8 están involucradas en la inhibición, a diferencia de la HTIM en que el valor es cercano a uno. Al comparar las curvas y los valores de I_{50} de la TcTIM y HTIM frente al compuesto

8, observamos que las diferencias son notables: la enzima de humano es mucho más resistente al inhibidor. Estos datos coinciden con los reportados por Téllez-Valencia *et al.* (2002). En cuanto a V_o no hubo diferencias significativas.

Cuando hacemos una comparación entre la K_d y la inversa de la I_{50} en cada enzima (figura 30) observamos que, excepto para la enzima silvestre, las mutantes que son más inestables a la dilución son más sensibles a la acción del compuesto 8 y viceversa. Es importante resaltar que en los experimentos de sensibilidad al compuesto 8 se aseguró tomar una concentración en la cual el 90 % de las enzimas estuvieran en forma de dímero (50 $\mu\text{g/ml}$) con la finalidad de que el ensayo no fuera afectado por la estabilidad a la dilución; por tanto podemos decir que la susceptibilidad al compuesto 8 es debido a las propiedades adquiridas por las enzimas al cambiar esos residuos y que se comentan a través de este capítulo.

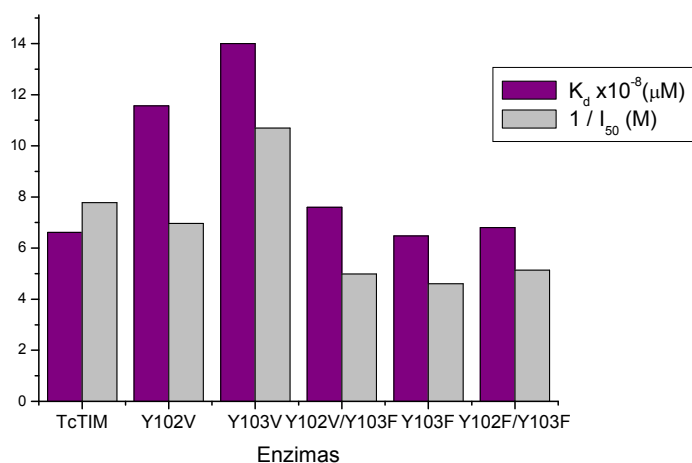


Figura 30. Comparación entre los valores de la inversa de la mitad de la concentración a la cual ocurre la máxima inhibición con el compuesto 8 ($1/I_{50}$) y la constante de disociación (K_d) determinadas para la TcTIM y las mutantes estudiadas.

5.8 Obtención y análisis de la estructura cristalina

En vista de las diferencias en la actividad frente al compuesto 8 y comportamiento a la dilución en cada una de las enzimas mutantes de TcTIM, y con el objetivo de lograr una mejor caracterización, el Dr. Rodrigo Arreola Alemón obtuvo por cristalografía de rayos X las estructuras en forma apo de las mutantes Y103V, Y103F y Y102F/Y103F (Tabla 14).

	103V 2.35	Y102F/Y103F 2.1	103F 2.1
Resolución	2.35	2.1	2.1
Integridad de los datos	99.8 (100)	99.3	95.7 (84.9)
No. Reflexiones	21507	30850	28950
Multiplicidad	4 (4)	.9 (5)	4.1 (3.9)
Rmerge (%)	0.092 (0.308)	0.079 (0.211)	0.08 (0.18)
I/sigma	6.7 (2.4)	7.5 (3.5)	3.3 (3.8)
Mn (I/sd)	12.9 (3.7)	16.2 (7.3)	14.1 (6.4)
Grupo espacial	P212121	P212121	P212121
Programa de afinamiento	CNS	CNS	CNS
R	0.211 (0.288)	0.18 (0.185)	0.20 (0.22)
Rfree	0.258 (0.345)	0.2 (0.22)	0.24 (0.27)
Media de B	32	16.2	17.7
Error Luzzati	0.28	0.2	0.24
Longitud de enlaces	0.006 (0.012)	0.006	0.006
Ángulos de enlaces	1.3 (2.)	1.4	1.4
Ángulos dihedro	22.5	23.3	22.4
Ángulos impropios	0.77 (1.53)	0.88	0.82
Sincrotrón	Si	Si	Si
Tipo	apo	apo	apo

Tabla 14. Estadística de la colecta de datos, reducción y refinamiento de los cristales de las mutantes. Entre paréntesis se muestran los valores de la última capa de resolución.

Al superponer los C_α de la estructura cristalográfica de TcTIM (Clave 1TCD, PDB) y las mutantes Y103V, Y103F y Y102F/Y103F las diferencias en los RMS (Root Mean Square) fueron de 0.60, 0.64 y 0.49 Å, respectivamente. Lo que quiere decir y como se aprecia en la figura 31 que las mutaciones puntuales no provocaron cambios generales en la estructura con respecto a la enzima silvestre, pero si se detectaron variaciones en la orientación de cadenas laterales de algunos residuos. El asa 6, conocida como asa móvil, a diferencia de la estructura de la TcTIM en que el monómero A y B se encuentran en conformación cerrada y abierta, en las mutantes difractadas en ambos monómeros se observa en conformación abierta.

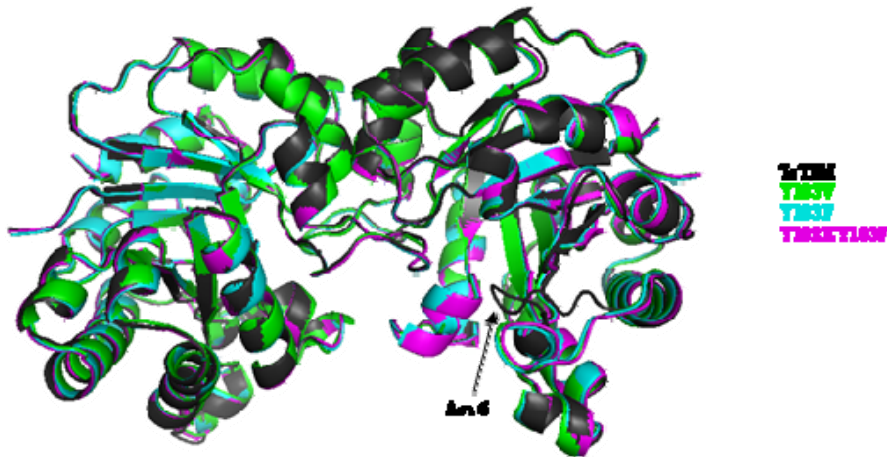


Figura 31. Superposición de los carbonos alfa de las estructuras de las mutantes Y103V, Y103F y Y102F/Y103F sobre las coordenadas de la TcTIM, PDB clave 1TCD, obteniendo valores de RMS de 0.60, 0.64, 0.49 Å respectivamente.

Enfocándonos a la zona del cluster aromático, los residuos de la mutante Y103F y Y102F/Y103F fueron muy similares a los de la enzima silvestre. La sustitución de Phe en la posición 103 (en la mutante Y103F) provoca un ligero ajuste en la orientación de los anillos pertenecientes a la Tyr102 y la Phe 103 que rotan alrededor de 0.7 Å con respecto a la posición de esos residuos en la enzima silvestre. Ese efecto es mayor cuando, además, se sustituye el residuo en la posición 102 por Phe (como la mutante Y102F/Y103F). En este caso hay un reacomodo de los anillos aromáticos, probablemente para lograr interacciones energéticamente más favorables; la Phe de la posición 102 rota aproximadamente 13.6 grados con respecto a la posición de la Tyr de la enzima silvestre, lo que representa aproximadamente 1.28 Å de distancia desde los carbonos zeta (ζ) de los anillos aromáticos. (Figura 32).

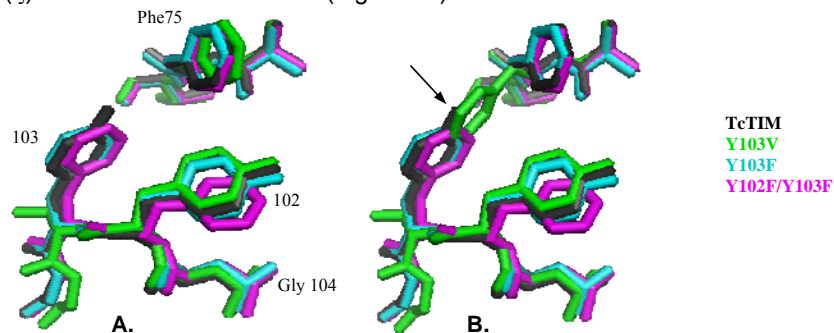


Figura 32. Superposición de los residuos 75, 102 y 103 de la TcTIM en las mutantes Y103V, Y103F y Y102F/Y103F usando como referencia la TcTIM señalando las 2 conformaciones encontradas en las mutantes Y103V. A. Conformación abierta, B. Conformación cerrada.

Los cambios más notables se observaron en la estructura de la mutante Y103V, donde las densidades electrónicas proponen 2 conformaciones para la Phe 75 del monómero B (figura 33). Una de las posiciones es muy similar a la que ocupa este residuo en la enzima silvestre, con una diferencia de alrededor de 3 grados (conformación abierta); en la otra conformación (conformación cerrada), el residuo se encuentra desplazado alrededor de 102.6 grados, lo que representa, aproximadamente, 0.53 Å y 6.71 Å de distancia, respectivamente, cuando se mide desde los carbonos zeta (ζ) de los anillos aromáticos. (Figura 34).



Figura 33. Mapa de densidad electrónica Fo-Fc mostrando las dos conformaciones de la Phe 75 en la TcTIM con sigma 2.

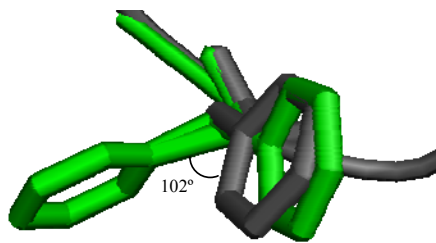


Figura 34. Superposición del Phe 75 de las dos conformaciones encontradas en la estructura de la mutante Y103V y la TcTIM.

En la literatura podemos encontrar varios ejemplos de cómo las interacciones que involucran anillos aromáticos son energéticamente favorables y descripciones de su importancia en la estabilidad y funcionalidad de las proteínas. (Burley, *et al.*, 1985; Castellano, *et al.*, 2003; Brinda, *et al.*, 2002; Esquivel, *et al.*, 2006; Burley, *et al.*, 1988; Maithal, *et al.*, 2002). En base a lo anterior, es posible que el efecto de sustituir los

residuos aromáticos por Val, en las mutantes estudiadas, haga que la cavidad hidrofóbica sea de mayor tamaño, desestabilizando las interacciones de esta zona de la interfase. Esto puede facilitar la interacción con el compuesto 8, porque considerando la superficie y el volumen de los aminoácidos libres tomadas de la tabla publicada por el “Jena Library of Biological Macromolecules”, la Tyr ocupa mayor superficie y volumen que la Phe y la Val en un 8.7%, 32.6% y 1.91%, 27.7%, respectivamente. Así mismo, cuando comparamos el área accesible al solvente (ASA) que tienen los residuos en la posición 103, al cambiar Tyr por Val (en la mutante Y103V) (tabla 17), observamos una disminución de 39.54%. Proponemos entonces, que la conformación cerrada es provocada para compensar las interacciones perdidas entre los anillos aromáticos, al sustituir la Tyr por la Val en la posición 103 y orientando el Phe 75 hacia la cavidad hidrofóbica. Esta sustitución también causa un reacomodo de la Gly 104 en 2 grados, como se observa en la figura 32.

5.9 Análisis de las interacciones Cation- π

Los aminoácidos con cadenas laterales que presentan grupos aromáticos como Trp, Tyr y Phe son capaces de interactuar con residuos catiónicos como Arg y Lys, a través de interacciones denominadas cation- π . Utilizando el programa CaPTURE (Gallivan & Dougherty, 1999), el Dr. Rodrigo Arreola Alemón hizo un análisis de las interacciones energéticamente significativas tipo cation- π de los residuos pertenecientes al cluster aromático en las mutantes que se lograron difractar y la enzima silvestre (tabla 15).

Proteínas	Residuos catiónico	Residuos aromáticos	E(es) (Kcal/mol)	E(vdw) (Kcal/mol)
TcTIM	Arg 99 A	Tyr 103 A	-1.61	-1.87
TcTIM	Arg 99 B	Tyr 103 B	-1.05	-2.09
Mutante 103F	Arg 99 A	Phe103 A	-2.38	-2.02
Mutante 103F	Arg 99 B	Phe103 B	-2.09	-1.70
Mutante Y102F/103F	Arg 99 A	Phe103 A	-1.50	-1.75
Mutante Y102F/103F	Arg 99 B	Phe103 B	-1.18	-1.69

En la mutante Y103V se pierde la interacción Arg 99 - Val 103

Tabla 15. Análisis de las energías de interacción electrostática, E(es) y de Van der Waals E(vdw) entre la Arg 99 y los residuos en la posición 103 de la TcTIM y las mutantes Y103V, Y103F y Y102F/Y103F.

Según el autor si:

- * $E(es) \leq -2.0$ kcal/mol, la interacción es energéticamente significativa,
- * $-2.0 < E(es) \leq -1.0$ kcal/mol la interacción es energéticamente significativa solo si:
 $E(vdw) \leq -1.0$ kcal/mol.
- * $E(es) \geq -1.0$ kcal/mol, la interacción no debe ser considerada

Al estudiar los parámetros en la TcTIM se encontró una interacción significativa entre los residuos Arg 99 y Tyr 103. Estas interacciones se pierden cuando la Tyr se muta por Val y, en la mutante Y103F, se hace más significativa esta interacción. Estos datos son consistentes y apoyan el comportamiento observado de ambas enzimas en los ensayos realizados y descritos anteriormente.(Figura 35).

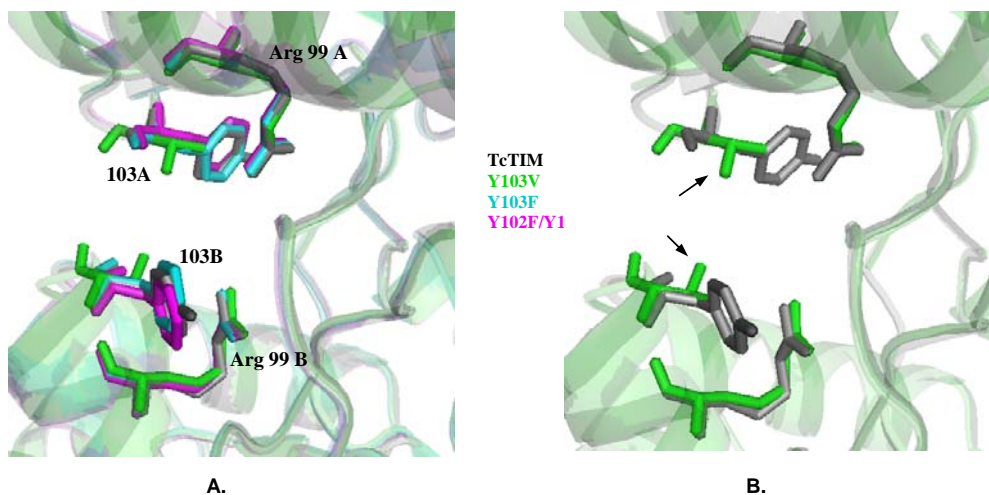


Figura 35. **A.** Superposición de la estructura de la TcTIM y mutantes Y103V, Y013F Y Y102F/Y103F, señalando la Arg 99 de cada monomero, ubicada en el asa 4, interactuando con los residuos aromáticos de la posición 103 correspondiente a cada mutante, localizados en el asa 4. **B.** La mutación de Tyr por Val en la posición 103, hace que se pierda la interacción Cation-pi.

5.10 Análisis de área accesible al solvente

Utilizando las coordenadas cristalográficas determinadas para cada mutante, y la enzima silvestre se determinó el área accesible al solvente (ASA) con un radio de esfera de molécula de agua que representa la molécula de solvente de 1.2 Å.

Al comparar las ASAs se observaron cambios significativos de accesibilidad en las 3 mutantes, con respecto a la enzima silvestre. Estas variaciones no sólo estaban localizadas en la zona del cluster aromático, donde se realizaron las mutaciones, sino

también distribuidos en toda la estructura. Muchos de estos residuos se encontraban localizados en la periferia de las proteínas, áreas donde las cadenas laterales son muy móviles por la interacción con el solvente, y otros están ubicados en el asa 6, conocida como asa móvil.

Convenientemente, los cristales de las enzimas que se lograron cristalizar fueron los que tuvieron diferencias más significativas con respecto a la TcTIM en los ensayos realizados en nuestro proyecto. Para tratar de identificar las regiones o residuos que nos pudieran dar indicios de cambios en la estructura que contribuyeran a estas diferencias decidimos restar las ASA entre las mutantes y analizar los aminoácidos que presentaron variaciones de más de 20 Å en el área accesible al solvente. (Tabla 16).

Si el valor en la tabla es negativo, esto significa que ese residuo aumentó su área accesible al solvente comparado con la enzima silvestre, de lo contrario, un valor positivo representa que ese residuo se encuentra menos expuesto al solvente.

Residuos	Y103V-Y103F	Residuos	Y103V-Y102F/Y103F	Residuos	Y103F-Y102F/Y103F
60 LYS A	-55,60	75 PHE A	-20,13	60 LYS A	56,14
103 TYR A	-24,76	103 TYR A	-23,43	87 TYR A	-22,65
190 LEU A	20,33	142 ALA A	20,89	154 LYS A	-24,87
196 ARG A	-32,92	196 ARG A	-37,24	19 GLU B	-29,86
19 GLU B	21,97	33 THR B	-51,77	33 THR B	-57,87
154 LYS B	21,41	36 HIS B	-54,08	36 HIS B	-50,07
75 PHE B	-28,60	60 LYS B	-23,78	60 LYS B	-30,50
103 TYR B	-30,95	75 PHE B	-34,56	154 LYS B	-27,30
225 GLN B	-23,39	103 TYR B	-21,24		

Tabla 16. Diferencias de área accesible al solvente mayor a 20 Å entre las mutantes. Los datos presentados para la mutante Y103V son los de la conformación cerrada de la Phe75. Se tomó como valor de corte 20 Å a manera de selección de los valores que tuvieron diferencias en el ASA más drástica.

Al comparar las ASAs se observaron cambios significativos de accesibilidad entre las 3 mutantes, con respecto a la enzima silvestre. Al analizar en las estructuras las posiciones de los residuos de la tabla 16, observamos que se encontraban localizados en la periferia de las proteínas, áreas donde las cadenas laterales son muy móviles por la interacción con el solvente, por lo que consideramos que estas diferencias se deben a reacomodos de las cadenas laterales por la interacción con el solvente.

En la tabla 17 se presentan las ASAs de los residuos que forman parte del cluster aromático en la TcTIM y HTIM. Al considerar las variaciones entre la enzima silvestre y las mutantes, se observa que, en la posición 75 en las mutantes Y103F y Y102F/Y103F

no hubo cambios significativos con respecto a la TcTIM, a diferencia de la mutante Y103V en que el Phe 75 varia su exposición al solvente y esto depende de cual de los 2 confórmeros descritos anteriormente se trate: si la Phe 75 está desplazada hacia la cavidad hidrofóbica, parece estar menos expuesta, ya que disminuye su accesibilidad al solvente en 16.93 \AA^2 , y, si su conformación esta de forma similar a la de la enzima silvestre la Phe queda más expuesta al solvente por 10 \AA^2 , con respecto a esta misma posición en la TcTIM.

	69 (\AA^2)	75 (\AA^2)	102 (\AA^2)	103 (\AA^2)
TcTIM	20.94	57.51	121.87	75.09
Y103V	23.14	* 40.58 • 67.74	129.70	45.40
Y103F	21.67	59.18	119.79	70.16
Y102F/Y103F	22.19	60.71	119.69	68.83

Tabla 17. Área accesible al solvente. Se indican las 2 posibles conformaciones de la Mutante. Y103V: * Conformación cerrada. • Conformación abierta.

6. CONCLUSIONES

- Las enzimas mutantes Y102V, Y103V, Y102V/Y103F, Y103F y Y102F/Y103F no presentan diferencias significativas en sus parámetros cinéticos con respecto a la enzima silvestre.
- La mutante Y103V fue la enzima más inestable a la dilución y de mayor susceptibilidad al compuesto 8, con una constante de disociación casi el doble de la que tiene la enzima silvestre y una I_{50} de 93.47 μ M.
- La sustitución de Tyr por Val en la posición 103, provocó la pérdida de una interacción del tipo catión- π entre la Arg 99 y la Tyr 103 que existía en la enzima silvestre y una disminución del área accesible al solvente en un 39.54 % en la posición 103, exponiendo el área de la cavidad hidrofóbica, lo que podría explicar la sensibilidad al compuesto 8 y la inestabilidad a la dilución de esta mutante.
- La sustitución en la posición 103 por Phe, genera enzimas más resistentes al compuesto 8.
- Al resolver las estructuras tridimensionales de las mutantes Y103V, Y103F y Y102F/Y103F se observaron algunos cambios en la zona del cluster aromático con respecto a la TcTIM. El más notable fue el desplazamiento en 102.6 grados de la Phe 75 en la mutante Y103V, probablemente para tratar de compensar las interacciones perdidas que existen entre los anillos aromáticos en la enzima silvestre.

7. PERSPECTIVAS

En la estructura de la HTIM, observamos que en la posición 69 presenta una Tyr localizada de tal manera que los residuos del cluster aromático se encuentran más aglomerados con respecto a la TcTIM, provocando que la cavidad hidrofóbica sea más cerrada. Sería interesante entonces, realizar la mutante I69Y/Y102V/Y103F en la TcTIM, que tendría este cluster aromático compacto, para determinar la relación del tamaño de la cavidad con la estabilidad de la proteína y la sensibilidad al compuesto 8 (además de determinar la importancia de este residuo como parte de esta zona).

En nuestro equipo de trabajo recientemente se han sintetizado nuevos compuestos con acción inhibitoria sobre las TIMs de parásitos, algunos de ellos fueron diseñados utilizando como base la estructura del compuesto 8, por lo que resultaría muy interesante realizar ensayos de las mutantes con estos compuestos para saber si el comportamiento es comparable o diferente de los resultados obtenidos en nuestros ensayos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Alvarez, M., Zeelen, J.P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Wyns, L., Wierenga, R.K., Maes, D. (1998). Triosephosphate isomerase (TIM) of the *psychrophilic bacterium Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 2199–2206.

Arkin, M.R., Wells, J.A. (2004). Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nature reviews. Drug discovery*, 3: 301-317.

Barret, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet*, 362: 1469-1480.

Blacklow, S.C., Raines, R.T., Lim, W.A., Zamore, P.D., Knowles, J.R. (1988). Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. Appendix: Analysis of triosephosphate equilibria in aqueous solution by ³¹P NMR. *Biochemistry*, 27: 1158-1167.

Bogan, A.A., Thorn, K.S. (1998). Anatomy of hot spots in protein interfaces. *Journal of Molecular Biology*, 280: 1-9.

Brunton, L.L., Lazo J.S. & Parker K.L. Pharmacology Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Edition, McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2006.

Chávez-Cárdenas, M.E., Pérez-Hernández, G., Sánchez-Rebollar, B.G., Costas, M., Vázquez-Contreras, E. (2005). Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry*, 44: 10883-10892.

Che, Y., Bernard, R.B., Garland, R.M. (2006). Development of small molecules designed to modulate protein-protein interactions. *Journal of Computers–Aided Molecular Design*, 20: 109-130.

Cortés-Figueroa, A., Pérez-Torres, A., Salaiza, N., Cabrera, N., Escalona-Montaño, A., Rondán, A., Aguirre-García, M., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Becker, I. (2008). A monoclonal antibody that inhibits *Trypanosoma cruzi* growth in vitro and its reaction with intracellular triosephosphate isomerase. *Parasitology Research*, 102: 635-643.

Enriquez-Flores, S., Rodríguez-Romero, A., Hernández-Alcantara, G., De la Mora-De la Mora, I., Gutiérrez-Castrellón, P., Carvajal, K., López-Velázquez, G., Reyes-Vivas, H. (2008). Species-specific inhibition of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 157: 179-186.

Erlandsen, H., Abola, E.E., Stevens, R.C. (2000). Combining structural genomics and enzymology: completing the picture in metabolic pathways and enzyme active sites. *Current Opinion in Structural Biology*, 10: 719-730.

Espinoza-Fonseca, L.M., Trujillo-Ferrara, J.G. (2004). Exploring the possible binding sites at the interface of triosephosphate isomerase dimer as a potential target for anti-trypanosomal drug design. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14: 3151-3154.

Fernández-Velasco, D.A., Sepúlveda-Becerra, M., Galina, A., Daros, A., Gómez Poyou, M., Gómez-Poyou, A. (1995). Water requirement in monomer folding and dimerization of triosephosphate isomerase in reverse micelles. Intrinsic fluorescence of conformers related to reactivation. *Biochemistry*, 34: 361-369.

Gadek, T.R., Nicholas, J.B. (2003). Small molecule antagonists of proteins. *Biochemical Pharmacology*, 65: 1-8.

Gallivan, J.P. and Dougherty, D.A. (1999). Cation- π interactions in structural biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 9459-9464.

Gao, X.G., Garza-Ramos, G., Saavedra-Lira, E., Cabrera, N., Gómez-Puyou, M.T., Perez-Montfort, R., Gómez-Puyou, A. (1998). Reactivation of triosephosphate isomerase from three trypanosomatids and human: effect of suramin. *The Biochemical Journal*, 332: 91-96.

Gao, X., Maldonado, E., Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Gómez Puyou, M.T., Gómez Puyou, A., Rodríguez Romero, A. (1999). Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 10062-10067.

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

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

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press pp. 571-607.

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

Goodsell, D.S., Olson, A.J., (2000). Structural symmetry and protein function. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29: 105-153.

Gracy, R.W., Yuskel, K.U., Gómez-Puyou, A., (1995). Deamidation of triosephosphate isomerase *in vitro in vivo*. En deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins (Aswald D.A., ed), p.p. 133-155, CRC Press, Boca Raton.

Hernández-Alcántara, G., Garza-Ramos, G., Méndez-Hernández, G., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R. (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.

Kohlhoff, M., Dahm, A., Hensel, R. (1996). Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic archaea. *FEBS Letters*, 383: 245-250.

Knowles, J. R. (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*, 350: 121-124.

Lakhdar-Ghazal, F., Blonski, C., Willson, M., Michels, P., Perie, J. (2002). Glycolysis and proteases as targets for the design of new anti-trypanosome drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2: 439-456.

Lolis, E., Alber, T., Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C., Petsko, G.A. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, 29: 6609-6618.

Lolis, E., Petsko, G.A. (1990). Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5-Å resolution: implications for catalysis. *Biochemistry*, 29: 6619-6625.

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

Lowman, J.W. and Hamilton, A.D. (2005). Recent developments in the identification of chemotherapeutics for Chagas disease. *Current Medical Chemistry*, 12: 945-959.

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

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

- Maithal, K., Ravindra, G., Nagaraj, G., Singh, S.K., Balaram, H., Balaram, P. (2002). Subunit interface mutation disrupting an aromatic cluster in *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: effect on dimer stability. *Protein Engineering*, 15: 575-584.
- Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R. (1998). Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *Journal of Molecular Biology*, 283: 193-203.
- Mande, S.C., Mainfroid, V., Kalk, K.H., Goraj, K., Martial, J.A., Hol, W.G.J. (1994). Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanomal enzyme. *Protein Science*, 3: 810-821.
- Mattos, C., Ringe, D. (1996). Locating and characterizing binding sites on proteins. *Nature Biotechnology*, 14: 595-599.
- Michels, P.A. (1988). Compartmentation of glycolysis in trypanosomes: a potential target for new trypanocidal drugs. *Biology of the Cell*, 64: 157-164.
- Moreira, I.S., Fernández, P.A., Ramos, M.J. (2007). Hot spots—a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins*, 68: 803-812.
- Olivares-Illana, V., Pérez-Montfort, R., López-Calahorra, F., Costas, M., Rodríguez Romero, A., Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. (2006). Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitrypanosomatid inhibitor. *Biochemistry*, 45: 2556-2560.
- Olivares-Illana, V., Rodríguez-Romero, A., Becker, I., Berzunza, M., García, J., Pérez-Montfort, R., Cabrera, N., López-Calahorra, F., de Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou A. (2007). Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1:e1.
- Opperdoes, F.R. (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annual Review of Microbiology*, 41: 127-151.
- Opperdoes, F.R., Michels, P.A. (2001). Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *International Journal for Parasitology*, 31: 482-490.
- Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramírez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R. (1997). Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Biochemistry*, 244: 700-705.
- Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Gao, X., Maldonado, E., Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A. (1999). Derivatization of the interface 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.

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

Prasanna, V., Bhattacharjya, S., Balaram, P. (1998). Synthetic interface peptides as inactivators of multimeric enzymes: Inhibitory and conformational properties of three fragments from *Lactobacillus casei* thymidylate synthase. *Biochemistry*, 37: 6883-6893.

Reyes –Vivas, H., Díaz, A., Peón, J., Mendoza-Hernández, G., Hernández-Alcantara, G., De la Mora-De la Mora, H., Enríquez-Flores, S., Domínguez-Ramírez, L., López-Velazquez., G. (2007). Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *Journal of Molecular Biology*, 365: 752–763.

Ringe, D. (1995). What makes a binding site a binding site?. *Current Opinion in Structural Biology*, 5: 825-829.

Rodríguez-Almazán, C., Arreola, R., Rodríguez-Larrea, D., Aguirre-López, B., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Gómez-Puyou, A., Torres-Larios, A. (2008). Structural basis of triosephosphate isomerase deficiency: Mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 23254-23263.

Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A., Fernández-Velasco, D. (2002) Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytic*. *Journal of Molecular Biology*, 322:669-675.

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

Sillerud, L.O., Larson, R.S. (2005). Design and structure of peptide and peptidomimetic antagonists of protein-protein interaction. *Current Protein and Peptide Science*, 6: 151-169.

Singh, K.S., Maithal, K., Balaram, H., Balaram, P. (2001). Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by interface peptides. *FEBS Letters*, 501: 19-23.

Tay, Z.J., Gutiérrez, Q.M., López, M.R., Manjares, Z.M.E., Molina, L.J. Microbiología y Parasitología Médica. 3ª ed., Méndez Cervantes Editores; México 2003.

Téllez-Valencia, A., Ávila-Ríos, S., Pérez-Montfort, 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*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295: 958-963.

Téllez Valencia, A., Olivares-Illana, V., Hernández-Santoyo, A., Pérez- Montfort, R., Costas, M., Rodríguez Romero, A., López-Calahorra, F., Gómez- Puyou, M.T., Gómez

Puyou A. (2004). Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *Journal of Molecular Biology*, 341: 1355-1365.

Tielens, A.G., Van Hellemond, J.J. (1998). Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. *Parasitology Today*, 14: 265-272.

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

Veselovsky, A.V., Ivanov, Y.D., Ivanov, A.S., Archakov AI, Lewi P, Janssen P. (2002) Protein-protein interactions: mechanisms and modification by drugs. *Journal of Molecular Recognition*, 15: 405-422.

Walden, H., Taylor, G., Lilie, H., Knura, T., Hensel, R. (2004). Triosephosphate isomerase of the hyperthermophile *Thermoproteus tenax*: thermostability is not everything. *Biochemical Society Transactions*, 32: 305.

Waley, S.G. (1973). Refolding of triosephosphate isomerase. *The Biochemical Journal*, 135: 165-172.

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

Zhao, L., Chmielewski, J. (2005). Inhibiting protein-protein interactions using designed molecules. *Current Opinion in Structural Biology*, 15: 31-34.

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

Zubillaga, R.A., Pérez-Montfort, R., Gómez-Puyou, A. (1994). Differential inactivation of rabbit and yeast triosephosphate isomerase: effect of oxidations produced by chloramine-T. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 313: 328-336.

Direcciones electrónicas:

* "Jena Library of Biological Macromolecules". "The Amino Acid Repository". www.imb-jena.de/IMAGE_AA.html)

* "World Health Organization" www.who.org

* www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/swg_chagas.pdf. Reporte del grupo de trabajo sobre la enfermedad de Chagas. Organización Mundial de la Salud. 2005. Actualización 2007.

* "Output of Getarea 1.1" www.scsb.utmb.edu/getarea/area_form.html

APÉNDICE

A1. Efecto de Cloruro de Sodio y Cloruro de Amonio en la actividad

Rodríguez-Almazán *et al.*, 2008, en un análisis hecho en 15 estructuras de TIMs de 13 diferentes especies, describieron un conjunto de moléculas de agua que están muy conservadas. Esta red de aguas establece interacciones entre ellas y ciertos residuos muy conservados que parecen jugar un papel importante en la estabilidad y formación del dímero activo. En esa región en particular, la única interacción directa entre residuos de las dos subunidades de los monómeros de HTIM es un puente salino formado por el Glu 77 y Arg 98 (numeración de HTIM). Estos aminoácidos están delimitados por varios residuos hidrofóbicos, entre ellos los pertenecientes al cluster aromático, que, posiblemente, pudiera permitir el acceso a esta zona. En el artículo se describe una mutación de Glu por Asp en la posición 104, que provoca un incremento en la distancia del puente salino, induciendo alteraciones en la red de moléculas de agua conservadas y afectando las interacciones entre las dos subunidades, lo que produce una mutante menos estable.

Para determinar la relación de la región descrita anteriormente con las Tyr 102 y 103, se siguió la actividad a una concentración de 5 ng/ml de la TcTIM y de las mutantes Y103V y Y103F (que fueron las que tuvieron un comportamiento más extremo en nuestros ensayos) con diferentes concentraciones de NaCl ó de NH₄Cl en un amortiguador de TEA 100 mM / EDTA 10 mM pH 7.4 en un volumen final de 1 ml. (Figura A1).

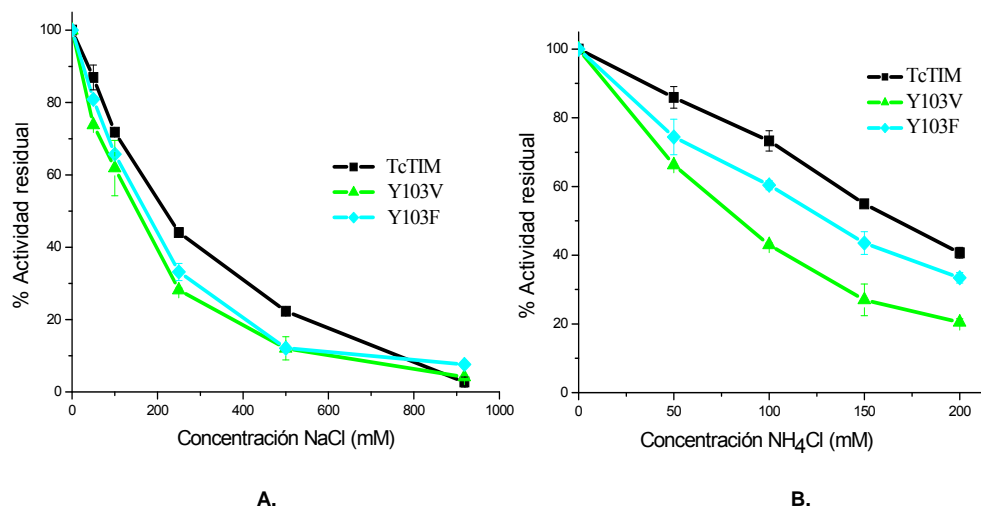


Figura A1. Curvas de **A.** Cloruro de sodio (NaCl) y **B.** Cloruro de amonio (NH₄Cl) con la TcTIM y las mutantes Y103V y Y103F.

Diferente al comportamiento en la estabilidad a la dilución, ambas mutantes fueron más sensibles a las sales que la enzima silvestre. Las concentraciones de sales que causaron aproximadamente un 50% de la disociación de la TcTIM, y de las mutantes Y103V y Y103F fueron de 309.4, 148.3 y 155.2 mM de NaCl y de 104.9, 63.5 y 91.7 mM de NH₄Cl, respectivamente.

A2. Ensayos de inactivación por Metilmetanotiosulfonato

La TcTIM presenta 4 cisteínas en las posiciones 15, 40, 118 y 127. En varios estudios se ha reportado la importancia de la Cys 15 en la estabilidad y sensibilidad frente a los agentes derivatizantes del grupo sulfridilo en la TcTIM. (Garza-Ramos, *et al.*, 1998, Pérez-Montfort, *et al.*, 1999). En cada monómero este residuo está rodeado por el asa 3 de la otra subunidad. El asa 3 está compuesta por 16 residuos que comprenden desde la Ala 65 a la Ser 80 (Maldonado, *et al.*, 1998). Cuando evaluamos los aminoácidos que están a menos de 4 Å de las Tyr 102 y 103, y por lo tanto con mayor probabilidad de interactuar con ellas, algunos se encuentran ubicados en el asa 3.

Adicionalmente, en un análisis de la interfase utilizando el servidor PISA se determinó el área superficial oculta (del Inglés buried surface area) de cada residuo en la TcTIM y

las mutantes que se lograron cristalizar. Observándose que en la subunidad B de estructura de la mutante Y103V con la doble conformación del Phe 75, la Cys 15 se encuentra más expuesta que la TcTIM y las demás mutantes. (Tabla A1).

Enzimas	BSA (Å ²)	
	A	B
TcTIM	125.33	125.16
Y103V	125.68	102.72
Y103F	124.79	124.03
Y102F/Y103F	125.71	125.51

Tabla A1. Valores de área superficial oculta de la Cys 15 en la TcTIM y mutante Y102V, Y103V, Y103F y Y102V/Y103F determinadas a través del servidor PISA. A y B son las subunidades correspondientes de cada monómero.

En base a las diferencias encontradas en la Phe 75 en la estructura de la Y103V y la exposición de la Cys 15 del monómero B; se decidió entonces, realizar experimentos de inactivación con metilmetanotiosulfonato (MMTS), reactivo que reacciona sólo con cisteínas. La enzima silvestre y las mutantes Y103V y Y103F se incubaron con concentraciones de 0 a 20 µM de MMTS durante 2 horas a 25°C (figura A2) y se midió la actividad residual.

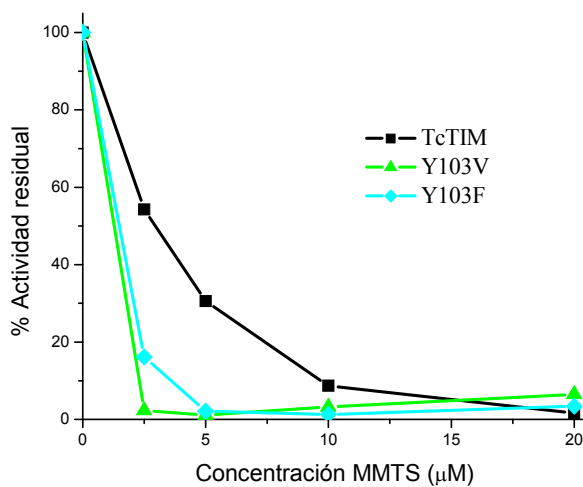


Figura A2. Curvas de inactivación por MMTS en TcTIM y las mutantes Y103V, Y103F. Las enzimas se incubaron a una concentración de 50 µg/ml con diferentes concentraciones de MMTS durante 2 horas a 25°C.

El comportamiento de la TcTIM fue similar al reportado en la literatura (Pérez-Montfort, *et al.*, 1999). La mutante Y103V es la más sensible al efecto del MMTS, observándose una pérdida total de la actividad a la concentración mas baja que se utilizó del reactivo (2.5 μ M). A esta concentración la enzima silvestre todavía mantiene más del 50% de su actividad. La mutante Y103F no presentó diferencias significativas con la mutante Y103V.

Estos ensayos fortalecen los indicios de la importancia en la posición 103 como parte del cluster aromático, aunque consideramos que también es importante realizar los experimentos en el resto de las mutantes (que presentan mutaciones en la posición 102) como control de estas observaciones.