



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

MECANISMOS DE INACTIVACIÓN
SELECTIVA DE LA TRIOSAFOSFATO
ISOMERASA DE *Giardia lamblia*,
DIRIGIDA AL DISEÑO DE
ANTI $GIARDI$ ÁSICOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. SERGIO ENRÍQUEZ FLORES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. HORACIO REYES VIVAS
COMITÉ TUTORAL: DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

México, D.F.

Junio, 2012



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

MECANISMOS DE INACTIVACIÓN
SELECTIVA DE LA TRIOSAFOSFATO
ISOMERASA DE *Giardia lamblia*,
DIRIGIDA AL DISEÑO DE
ANTI $GIARDIÁSICOS$.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. SERGIO ENRÍQUEZ FLORES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. HORACIO REYES VIVAS
COMITÉ TUTORAL: DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

México, D.F.

Junio, 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 05 de marzo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ENRÍQUEZ FLORES SERGIO** con número de cuenta 89166512, con la tesis titulada **“MECANISMOS DE INACTIVACIÓN SELECTIVA DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Giardia lamblia* DIRIGIDA AL DISEÑO DE ANTIGIARDIÁSICOS.”** realizada bajo la dirección del **DR. HORACIO REYES VIVAS:**

Presidente: DRA. MARIETTA TUENA SANGRI
Vocal: DRA. LILIAN YÉPEZ MULIA
Secretario: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Suplente: DR. MIGUEL ANTONIO COSTAS BASÍN
Suplente: DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de junio de 2012

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

**A CONACyT por otorgarme la beca número 226166, mientras cursé
mis estudios de Doctorado**

A los miembros del Comité Tutorial:

Dra. Adela Rodríguez Romero

Dr. Abraham Landa Piedra

Dr. Horacio Reyes Vivas (Tutor principal)

**Este trabajo se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Pediatría,
Torre de Investigación, en el Laboratorio de Bioquímica-Genética.**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Jurado por el tiempo y dedicación empleada en la revisión de esta Tesis y por sus acertados comentarios:

Dra. Marietta Tuena Sangri

Dra. Adela Rodríguez Romero

Dr. Miguel Costas Basín

Dra. Lilián Yépez Mulia

Dr. Abraham Landa Piedra

A mi Aló

Alondra Nikté Enríquez Ramos

ÍNDICE

	PAG
RESÚMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades de <i>G. lamblia</i>	2
1.1.2 Ciclo de vida e invasión al hospedero.....	2
1.1.3 Evasión de <i>G. lamblia</i> al mecanismo de defensa del hospedero.....	5
1.1.4 Variación antigénica como sistema de evasión de la respuesta inmune del hospedero contra el parásito.....	6
1.2 Tratamiento contra la giardiasis.....	6
1.2.1 Tratamiento con derivados del nitroimidazol.....	7
1.2.2 Tratamiento con bencimidazoles.....	8
1.2.3 Perspectivas a futuro sobre el desarrollo de nuevas terapias anti-giardiasis.....	8
1.3 La triosafosfato isomerasa de <i>G. lamblia</i> (GITIM) como blanco potencial para el diseño de compuestos anti-giardiasis.....	9
1.4 Otras posibilidades de biomoléculas como blanco de fármacos en <i>G. lamblia</i>	12
1.5 Antecedentes sobre la búsqueda de sitios blanco en la TIM.....	13
2 HIPÓTESIS.....	15
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos particulares.....	15
4 MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
4.1 Clonación, mutagénesis y purificación de las enzimas.....	16

4.2 Determinación del orden de derivatización de Cys en la GITIM.....	16
4.3 Determinación de los parámetros cinéticos.....	18
4.4 Ensayos espectroscópicos.....	18
4.5 Inactivación y cuantificación de Cys en la GITIM y sus mutantes por medio de los derivatizantes MMTS, MTSCE y DTNB.....	19
4.6 Experimentos de unión del 2-fosfoglicolato (2-PG) a la GITIM.....	19
4.7 Calorimetría de titulación isotérmica de unión a 2-PG.....	20
4.8 Cristalización, derivatización, colecta de datos de difracción y determinación de la estructura de la GITIM.....	21
5 RESULTADOS.....	22
5.1 Orden de derivatización de las Cys de la GITIM.....	22
5.2 Parámetros cinéticos y estabilidad térmica de GITIM silvestre y sus mutantes.	23
5.3 Constantes de velocidad de inactivación de la GITIM utilizando derivatizantes.	27
5.4 Fluorescencia Intrínseca de la GITIM.....	28
5.5 Calorimetría de titulación isotérmica en la GITIM.....	32
5.6 Estructura cristalográfica de la mutante GITIM-C202A derivatizada con MMTS.	34
6 DISCUSIÓN.....	37
6.1 Orden de derivatización de las Cys en la GITIM.....	37
6.2 La Cys 222 de GITIM es un buen blanco farmacológico.....	38
6.3 La derivatización de la Cys 222 de GITIM perturba la unión de su ligando.....	39
6.4 La estructura cristalográfica de GITIM-MMTS evidenció cambios importantes en	

la Cys 14.....	40
7 CONCLUSIONES.....	41
8 PERSPECTIVAS.....	42
9 REFERENCIAS	43
ARTICULO PUBLICADO.....	55
MANUSCRITO ANEXO (ADDENDUM).....	56
I) JUSTIFICACIÓN.....	56
II) ESTRATEGIA GENERAL.....	57
III) MATERIALES Y MÉTODOS.	58
a) Construcción, expresión y purificación de mutantes de la GITIM.....	58
b) Cristalización, colecta de datos de difracción y determinación de las estructuras de las mutantes de la GITIM.....	59
IV) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
a) Caracterización espectroscópica de las proteínas recombinantes.....	60
b) Caracterización cinética de la GITIM silvestre y sus mutantes de Cys.....	60
c) Unión del 2-PG a la GITIM silvestre y sus mutantes.....	62
d) Estabilidad conformacional de la GITIM wt y sus mutantes.....	64
e) Estructuras cristalográficas de la GITIM C202A, C202A/C222N y C202A/C222D.....	64
V) CONCLUSIONES.....	70
VI) REFERENCIAS.....	71

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	PAG
CUADRO 1.....	1
CUADRO 2.....	24
CUADRO 3.....	26
CUADRO 4.....	32
CUADRO 5.....	34
CUADRO 6.....	35
CUADRO 7.....	61
CUADRO 8.....	63
CUADRO 9.....	65
FIGURA 1.....	3
FIGURA 2.....	4
FIGURA 3.....	10
FIGURA 4.....	14
FIGURA 5.....	22
FIGURA 6.....	25
FIGURA 7.....	26
FIGURA 8.....	27
FIGURA 9.....	29
FIGURA 10.....	31
FIGURA 11.....	33
FIGURA 12.....	35
FIGURA 13.....	36
FIGURA 14.....	62
FIGURA 15.....	66
FIGURA 16.....	67
FIGURA 17.....	68

FIGURA 18.....	69
FIGURA 19.....	69

RESUMEN

Giardia lamblia es un parásito unicelular que invade el intestino de diversos grupos de organismos. En humanos origina la giardiasis, enfermedad que provoca diarrea y otros síntomas intestinales. La estrategia para combatirlo y eliminarlo del hospedero, se basa principalmente en el uso de nitroimidazoles, bencimidazoles ó derivados de ambos. Sin embargo, desde hace más de 10 años se han reportado cepas de este organismo clínicamente resistentes a estos fármacos. Razón por la cual proponemos a la enzima glucolítica triosafosfato isomerasa de *G. lamblia* (GITIM), como blanco potencial para el diseño de compuestos anti-giardíacos. En nuestros ensayos incluimos 3 derivatizantes de Cys con diferencias en sus propiedades físico-químicas, demostramos que la GITIM es 200 veces más sensible a la inactivación que la TIM de humano. Además, de los 5 residuos de Cys por subunidad que contiene la GITIM, sólo con la derivatización de la Cys 222 se promueve su inactivación total. La k_2 de inactivación con el derivatizante MTSCE fue de $7.1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que con DTNB la k_2 fue de $43.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; lo que indica que la Cys 222 es rápidamente derivatizada por el DTNB, inactivador más potente que el MTSCE. Por otro lado la K_D del 2PG obtenida por fluorescencia ó calorimetría de la GITIM y de su mutante C222A en ausencia de derivatizantes, fueron de 26.4, y 52 μM respectivamente. Sin embargo, la K_D en presencia del MTSCE en la enzima silvestre no se logró obtener por ausencia de señal, sugiriendo pérdida de afinidad por su ligando. En cambio en la C222A derivatizada con MTSCE la K_D fue 1.3 mayor que la enzima sin derivatizar, sugiriendo que esta enzima sigue uniendo ligando aunque esté derivatizada. Datos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) en la GITIM silvestre indican que la enzima une ligando en ausencia de derivatizante; sin embargo si se derivatiza con MTSCE, pierde la capacidad de unir ligando, confirmando los datos de fluorescencia. La estructura de la GITIM derivatizada con MMTS obtenida por cristalografía no evidenció cambios conformacionales, que pudieran mostrar el mecanismo que induce la inactivación a través de la derivatización de la Cys 222. Sin embargo, en esta estructura se evidenciaron cambios importantes de los cuales se obtuvo información sobre el mecanismo de resistencia a la inactivación y disociación que la GITIM presenta cuando su Cys de interfase se derivatiza. Finalmente, Demostramos un nuevo mecanismo de inactivación en la GITIM a través de la modificación de la Cys 222, por lo que proponemos a esta enzima como un nuevo blanco terapéutico especie-específico.

ABSTRACT

Giardia lamblia is a unicellular parasite that invades the intestine of various groups of organisms. In humans causes giardiasis, a disease that causes diarrhea and other intestinal symptoms. The strategy to combat and eliminate giardia of its host is based primarily on the use of nitroimidazoles, benzimidazoles or derived from both. However, since ten years ago have reported strains of this organism clinically resistant to these drugs. In this work we propose to the glycolytic enzyme triosephosphate isomerase from *G. lamblia* (GITIM), as potential target for design anti-giardiasis compounds. Our assays include derivatizing Cys using thiol reagents with differences in their physicochemical properties; we demonstrated that GITIM is 200 times more sensitive to inactivation of the human TIM. Furthermore, from the five Cys residues per GITIM subunit, only with the derivatization of Cys 222 is promotes inactivation, even if other Cys also are derivatized. The k_2 inactivation with the thiol reagent MTSCE was $7.1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, whereas the k_2 from thiol reagent DTNB was $43.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; indicating that the Cys 222 is readily derivatized by DTNB, which is more potent than MTSCE. On the other hand the K_D of 2PG obtained by fluorescence or calorimetry from the GITIM and its mutant C222A in the absence of derivatizing, were 26.4, and 52 μM , respectively. However, the K_D of the GITIM derivatized by MTSCE was not obtained by the absence of signal, suggesting loss of affinity for its ligand. In contrast, the K_D from the C222A derivatized by MTSCE was 1.3 higher than the enzyme without derivatization, suggesting that this enzyme has affinity for this ligand. Data from isothermal titration calorimetry (ITC) in the wild type GITIM, indicate that the enzyme binds ligand in the absence of derivatizing but if derivatized with MTSCE loses the ability to bind ligand, confirming fluorescence data.

The crystallographic structure from GITIM was obtained in presence with MMTS, however not showed conformational changes, which could show the mechanism that induces the inactivation by derivatization of the Cys 222. Although, this structure showed significant changes of which we obtained information on the mechanism of resistance to inactivation and dissociation when interfacial Cys is derivatized. Finally, we demonstrate a novel mechanism of inactivation in the GITIM through the modification of Cys 222, and we propose this enzyme as a new therapeutic target species-specific.

MECANISMOS DE INACTIVACIÓN SELECTIVA DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Giardia lamblia*, DIRIGIDA AL DISEÑO DE ANTIGIARDIÁSICOS.

1. INTRODUCCIÓN.

Giardia lamblia, protozoo flagelado causante de la giardiasis, induce una enfermedad intestinal que genera síntomas como diarrea y mala absorción intestinal de nutrientes (Alvares y cols., 1994). Se estima que a nivel mundial 280 millones de personas son afectadas por esta enfermedad (Ali y Hill, 2003). Se ha reportado que la giardiasis es una de las causas de diarrea aguda persistente y que predomina tanto en la población infantil, en personas de la tercera edad e inmuno-comprometidas (Ortega y Adam, 1997). Esta enfermedad se puede transmitir por contagio interpersonal e ingestión de alimentos contaminados, aunque también se atribuye a la falta de saneamiento ambiental y por desconocimiento de las normas higiénicas (Quevedo y cols., 1990). Aunque es de distribución mundial, las poblaciones más afectadas son los países en vías de desarrollo, donde es frecuente la contaminación del agua ó alimentos con materia fecal (Botero y Restrepo, 1998).

En México, según la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud (SSA) *G. lamblia* es uno de los 10 principales organismos que generan parasitosis (SINAVE 2005, SSA), además la SSA revela en su boletín que la población infantil es muy susceptible a este y otros parásitos, el Cuadro 1 muestra un panorama estadístico nacional.

Parasitosis	Total de casos por año
Amoebiasis intestinal	610 937
Ascariasis	138 414
Giardiasis	34 918
Teniasis	375
Cisticercosis	306
Leishmaniasis	828
Enfermedad de Chagas	331

Cuadro 1. Estadística nacional de infecciones por parásitos, dentro de los que se encuentran *G. lamblia* y otros protozoarios (SINAVE 2005, SSA).

Según el Cuadro 1, de las enfermedades generadas por parásitos protozoarios se destacan la amoebiasis y la giardiasis. Esta última, aunque no es causa de mortalidad

importante, se considera una enfermedad de distribución homogénea en toda la república (Cedillo-Rivera y cols., 2009). Además la giardiasis tiene graves implicaciones en el estado nutricional y en las tasas de crecimiento de la población infantil (Quihui-Cota y cols., 2008). Por lo anterior y debido a que en los últimos años se han identificado cepas de este organismo resistentes a algunos medicamentos de uso común (Upfcroft y Upfcroft, 1993), se ha motivado la búsqueda de alternativas que ayuden a disminuir el número de infecciones provocadas por este organismo. En este contexto y como se abordará más adelante, existe una gran cantidad de estudios donde se ofrecen nuevos enfoques para combatir a este organismo. Sin embargo, tanto a nivel nacional como internacional, el empleo de medicamentos aprobados por las autoridades en salud de cada país sigue siendo la forma más común de tratamiento (Zaat y cols., 2000). Este trabajo centrará su atención en la caracterización de la enzima glucolítica triosafosfato isomerasa (TIM) de *G. lamblia* (GITIM) como blanco potencial en la generación de compuestos anti giardiásicos. Como se explica más adelante, esta enzima es un componente importante del metabolismo energético en la vía de la glucólisis. Sin embargo, antes de describir la importancia de esta enzima, es necesario dar a conocer la biología de *G. lamblia* con el propósito de comprender tanto los mecanismos de evasión del sistema de defensa en mamíferos, así como los mecanismos que le permiten sobrevivir a pesar de los diversos tratamientos para combatirlo.

1.1 Generalidades de *G. lamblia*.

1.1.2 Ciclo de vida e invasión al hospedero.

El ciclo de vida de *G. lamblia* tiene dos etapas bien diferenciadas: el trofozoíto y el quiste, que son el estado vegetativo e infeccioso, respectivamente. Los trofozoítos viven en el duodeno de muchas especies de vertebrados incluyendo a los mamíferos. Tienen forma de pera y miden de 12 a 15 μm de largo por 5 a 9 μm de ancho. Este organismo cuenta con 4 pares de flagelos dispuestos simétricamente: 2 antero-laterales, 2 postero-laterales, 2 caudales y 2 ventrales. En la porción ventral se localiza un disco adhesivo que le confiere la capacidad de adherencia a la mucosa intestinal. Característicamente tiene 2 núcleos que se evidencian cuando *G. lamblia* se observa mediante microscopía de luz, la Figura 1 esquematiza la descripción mencionada.

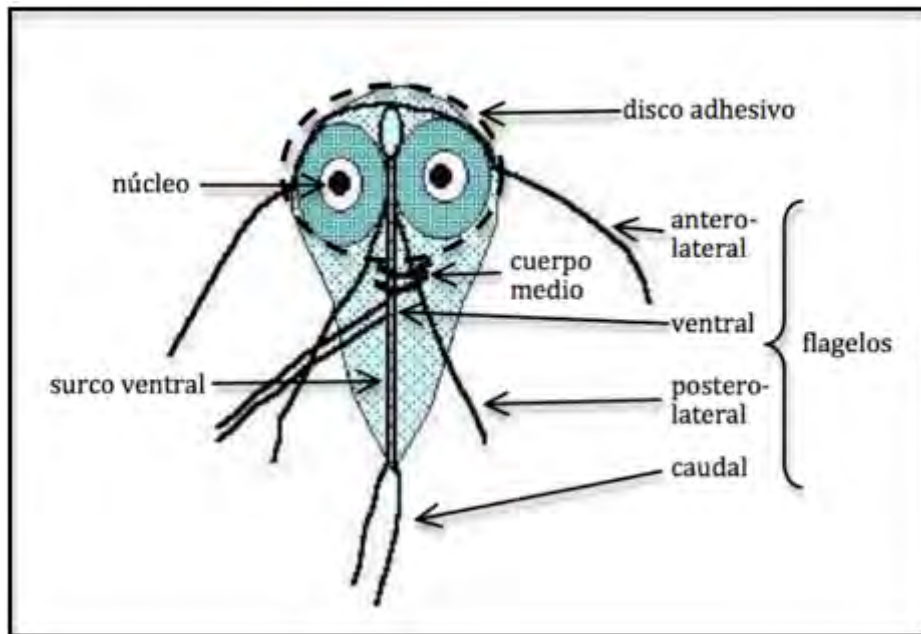


Figura 1. Esquema del trofozoíto de *G. lamblia*, donde se muestran algunas de sus estructuras que son visibles con microscopía de luz. Imagen modificada de la pagina de internet www.microbelibrary.org.

Internamente, contiene como sistema de endomembranas un retículo endoplásmico, se ha demostrado la presencia de aparato de Golgi rudimentario (Adam, 2001), así como también hace algunos años se demostró la presencia de nucléolo (Jiménez-García y cols., 2008). Aunque en el 2003 se identificó una estructura denominada mitosoma, definida como un reducto mitocondrial; no se ha detectado hasta la fecha que lleve acabo fosforilación oxidativa (Tovar y cols., 2003).

El ciclo de vida de *G. lamblia* comienza cuando los quistes se ingieren, algunos reportes indican que es necesaria la ingesta de por lo menos 10 de ellos para provocar infección (Martínez, 1982). El mecanismo de infección puede darse por medio de materia fecal diseminada al medio-ambiente, por consumo de alimentos mal lavados, también se han descrito brotes por transmisión a través del agua contaminada (Brandonisio, 2006) y por contacto sexual (Quinn, 1986). Después de ingerirse los quistes, pasan por un proceso de desenquistamiento que se inicia con la acidez estomacal a pH 2 y termina en el duodeno, lugar donde emergen dos trofozoítos por cada quiste. Una vez en el duodeno, el trofozoíto debe moverse constantemente y adherirse debido al recambio de la superficie del epitelio y al movimiento peristáltico; además, la capa de moco que protege las células epiteliales de la acción de las enzimas digestivas evita que tenga acceso inmediato al epitelio (Roxström y cols., 2006). Cuando se adhiere al epitelio intestinal mediante el disco ventral, el trofozoíto aprovecha del medio sus nutrientes

(Pope-DelaTorre y cols., 2005) que serán posteriormente incorporados a su metabolismo.

Después de adherirse al epitelio del duodeno y nutrirse en ese lugar, se lleva a cabo la división celular y comienza a colonizar el epitelio intestinal generando “parches” de colonias. Algunas consecuencias de este mecanismo de invasión por parte de los trofozoítos son que el hospedero no lleva a cabo una buena absorción de nutrientes y se produce irritación mecánica (Buret y cols., 1991). En referencia a esto, en humanos los efectos clínicos de la infección por *G. lamblia* abarcan desde el portador asintomático hasta el que presenta los síntomas descritos.

Continuando con el desarrollo de este organismo, algunas de esas formas vegetativas se desprenden del epitelio y viajan hacia la materia fecal. Entonces se inicia el enquistamiento en el intestino delgado, por lo que en sus primeros eventos se retraen sus flagelos y más tarde se rodea de una pared quística, mecanismo que regularmente ocurre en las porciones bajas del íleon (Farthing, 1983). Como consecuencia, los quistes se excretan con las heces y permanecen en estado de latencia con baja actividad fisiológica (Jarroll y cols., 2001), hasta que sean ocasionalmente ingeridos por otro hospedero, completándose así su ciclo de vida, la Figura 2 ilustra lo descrito.

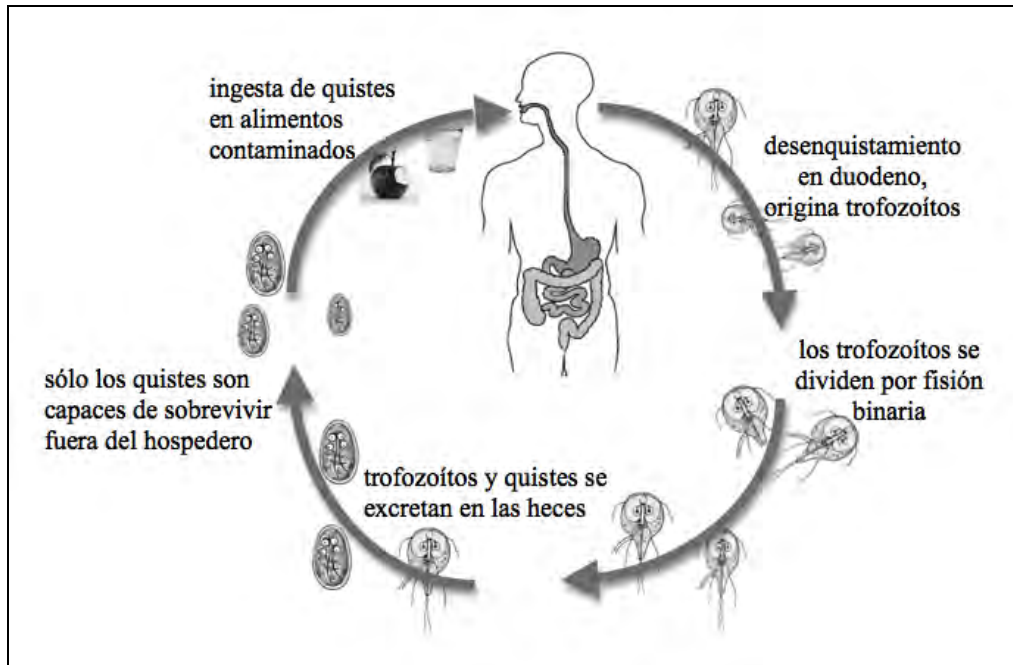


Figura 2. Ciclo de vida de *G. lamblia*. Una vez que el quiste entra al hospedero, éste se desenquista y se aloja en el duodeno. Posteriormente se dividen los trofozoítos. Algunos de ellos se enquistan y son excretados a través de las heces. Al ser nuevamente ingeridos por un hospedero se cierra el ciclo de vida de este organismo.

1.1.3 Evasión de *G. lamblia* al mecanismo de defensa del hospedero.

Una vez que este parásito se adhiere al duodeno, el sistema inmune del hospedero es estimulado, sin embargo, la respuesta es local debido a que el parásito no invade tejidos. A pesar de las eficientes y fuertes defensas del hospedero, no se ha demostrado que la infección provoque la liberación de enterotoxinas para protegerse (Smith y cols., 1982). Algunos reportes indican que parte de la patogénesis de este parásito involucra la liberación de proteasas de serina y cisteína, que actúan sobre la barrera epitelial del intestino, originando inflamación y una respuesta inmune en el hospedero (Ali y Nozaki, 2007). En la actualidad, no está completamente establecido cómo se induce la respuesta inmune, aunque estudios *in vitro* argumentan que los neutrófilos y monocitos humanos pueden interferir con la adherencia de los trofozoítos, por lo que se sugiere que el mecanismo de adherencia puede ser un blanco inmunológico de ataque (Crouch y cols., 1991). Además, se sabe que algunos péptidos antimicrobianos como defensinas y lactoferrinas poseen actividad anti*giardiasica in vitro* y pueden participar en la defensa contra *Giardia* (Eckmann, 2003). Se ha demostrado además, que el óxido nítrico (NO) inhibe el crecimiento, enquistamiento y desenquistamiento del parásito *in vitro*, cabe destacar que en modelos de epitelio intestinal humano, *G. lamblia* inhibe la producción de NO por el consumo de arginina (Eckmann y cols., 2000), sustrato crucial usado por la óxido nítrico sintasa epitelial para formar su producto.

Por otro lado, como organismo microaerófilo facultativo, este protozooario tiene capacidad limitada para neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS), utilizando enzimas como la NADPH oxidasa y NADPH peroxidasa. Las ROS pueden producirse por células epiteliales intestinales y se proponen como un factor importante en la inmunidad innata (Krause, 2004). En estudios *in vitro* se ha visto que los monocitos y macrófagos humanos fagocitan trofozoítos de *Giardia*, los cuales son posteriormente aniquilados por mecanismos oxidativos; sin embargo, la experiencia indica que se acumulan pocos macrófagos en la mucosa intestinal durante la infección (Hill y Pearson, 1987).

Algunos estudios indican que en modelo murino, después de la infección por *Giardia*, el hospedero lanza su ataque por medio de los linfocitos TCD4+ y TCD8+; aunque el papel de esas líneas celulares aún es incierto (Andersen y cols., 2006) y a pesar de haber respuesta inmune, *G. lamblia* la evade por el mecanismo tan eficiente que utiliza para eludir dicho sistema de defensa.

1.1.4 Variación antigénica como sistema de evasión de la respuesta inmune del hospedero contra el parásito.

Desde hace un par de décadas se describió que la superficie del trofozoíto de *Giardia* es el sitio de las interacciones principales con el hospedero. Los estudios han demostrado que la superficie de *Giardia* está cubierta con un grupo de proteínas variantes de superficie (VSPs); estas representan variación antigénica y son el mecanismo de evasión a la respuesta inmune del hospedero. Nash y su grupo en 1988 reportaron este fenómeno de variación antigénica en *Giardia*, algunas características son: *i*) de la totalidad del repertorio de epítomos (VSPs en este caso), sólo algunos son seleccionados y expresados en clonas, lo que sugiere la presencia de un conjunto favorecido de epítomos que tiene este organismo, *ii*) los repertorios de VSPs pueden diferir entre aislados, *iii*) el mismo epítomo detectado sobre la superficie de aislados independientes está presente en moléculas con diferentes masas moleculares (Nash y cols., 1988). Estos investigadores también demostraron que este tipo de proteínas puede expresarse espontáneamente sin embargo, se ha demostrado que aproximadamente cada 6 a 13 generaciones se expresan, tanto *in vitro* como *in vivo* (Nash y cols., 1987). Por ejemplo, una variante puede perderse espontáneamente ó en respuesta a selección por anticuerpos u otras condiciones fisiológicas (Nash y cols., 1991).

Con base en el mecanismo explicado, es comprensible cómo *Giardia* puede evadir el sistema inmunológico con el uso de VSPs, expresando y reprimiendo la expresión de estas proteínas, lo que finalmente permite evadir el sistema de defensa del hospedero.

Por otro lado, además del combate de la giardiasis a nivel biológico, se han desarrollado fármacos para combatirla, a continuación se mencionará brevemente los fármacos que se utilizan comúnmente como anti-giardíacos y algunas consecuencias del empleo de los mismos.

1.2 Tratamiento contra la giardiasis.

A pesar del reconocimiento de que *Giardia* es un patógeno del humano con importancia médica, existen pocos fármacos de uso común para combatirla. Comúnmente se emplean los derivados del nitroimidazol, como el tinidazol y secnidazol que son efectivos en una sola dosis (Rossignol, 2010).

1.2.1 Tratamiento con derivados del nitroimidazol.

El metronidazol, que proviene de la familia de los nitroimidazoles, fue de los primeros fármacos usados para combatir la giardiasis. Aunque desde 1955 se propuso como tratamiento para diversos parásitos, en *Giardia* se utilizó de manera formal hasta 1962. (Darbon y cols., 1962). Desde ese tiempo y hasta la fecha sigue siendo el tratamiento más solicitado, a pesar de las inconveniencias y efectos secundarios que ocasiona (ver más adelante). Originalmente, se identificó como buen antiparasitario aunque el mecanismo de acción no se identificó hasta tiempo después. Debido a su amplio espectro de acción, constante uso y a la aparición de organismos resistentes a este fármaco, en los últimos años se han realizado esfuerzos para demostrar cual es su mecanismo de acción.

Una vez que el metronidazol ingresa al parásito, la proteína ferredoxina en su forma reducida cede electrones al grupo nitro del metronidazol (Samuelson 1999), esta enzima funciona como aceptora de electrones de la piruvato:ferredoxin oxidoreductasa. Debido a la reducción del metronidazol en el interior de la célula, se genera un gradiente que favorece el transporte intracelular del metronidazol. Después que el grupo nitro se reduce, participa como aceptor de electrones terminal, lo que induce que éste grupo se una covalentemente al ADN y a proteínas (Müller 1983). Esto genera que este tipo de moléculas pierdan su integridad, con la subsecuente muerte del trofozoíto.

Por otro lado, también existen estudios sobre el metabolismo del metronidazol en humanos. Por ejemplo se sabe que se metaboliza principalmente en el hígado y se excreta por la orina (Lau y cols., 1992). Además, debido a su relativa inespecificidad, se ha demostrado que es agente mutagénico y algunos estudios en roedores indican efectos carcinogénicos (Chacko y Bhide, 1986); más aún, se sabe que este fármaco provoca daño genotóxico y citotóxico *in vitro* sobre linfocitos humanos de sangre periférica (López-Nigro y cols., 2003). Se ha reportado que a pesar de que el metronidazol es muy eficiente, existen cepas de *Giardia* resistentes a este compuesto (Uproft, 1998). En este sentido, algunos estudios sugieren que dicha resistencia se debe a la presencia de enzimas nitroreductasas. Por ejemplo, algunas bacterias como las del género *Bacterioides sp*, contienen enzimas denominadas nitroimidazol reductasas (NIMs) responsables de inactivar al nitroimidazol (Sóki y cols., 2006). Los genes que codifican a estas proteínas se localizan en cromosomas ó plásmidos y se ha demostrado que *Giardia* tiene enzimas análogas a las NIMs. (Pal y cols., 2009); por lo que, algunos

investigadores sugieren que el mecanismo de resistencia en *Giardia* es similar a lo reportado en *Bacterioides*.

1.2.2 Tratamiento con bencimidazoles.

En otros tratamientos contra la giardiasis también se han usado derivados del bencimidazol, como el albendazol y mebendazol (Katiyar y cols., 1994). A diferencia del metronidazol, estos compuestos se comenzaron a emplear a partir de 1986 (Zhong y cols., 1986). En relación al mecanismo de acción de los bencimidazoles, se sabe que ejercen su efecto tóxico sobre *Giardia* en parte debido a que se unen a la β -tubulina del citoesqueleto (Morgan y cols., 1993). Se ha reportado que la unión provoca la inhibición de la polimerización del citoesqueleto (Venkatesan, 1998). Esto conduce a un cambio ultraestructural importante que lleva a la pérdida de integridad del trofozoíto, finalizando en muerte celular. Al igual que el metronidazol, algunas desventajas de su uso son que se ha demostrado resistencia de *Giardia* hacia el albendazol inducida *in vitro* (Upcroft y cols., 1996). También se han reportado cepas de *Giardia* resistentes al albendazol.

Existen otros fármacos para combatir a *Giardia* como la nitazoxanida (Müller y cols., 2007) y paromomicina (Tomoko y Michael, 2003). Aunque también existen cepas resistentes a estos medicamentos (Müller y cols., 2008). Sin embargo las descritas anteriormente son las de mayor uso. Recientemente, se ha descrito la posibilidad de combatir a este organismo con el empleo de vacunas.

1.2.3 Perspectivas a futuro sobre el desarrollo de nuevas terapias anti-giardiasis.

En el 2009 se reportó la posibilidad de tratar la giardiasis utilizando vacunas contra los antígenos de superficie de este organismo. Como se mencionó anteriormente, la variación antigénica de superficie se considera un proceso importante en éste y otros parásitos, esto permite la evasión del sistema inmune del hospedero, lo que ocasiona en algunos casos infección crónica, a pesar de la continua respuesta inmune del hospedero. En *Giardia*, las VSPs contribuyen a evadir el sistema inmune y más explícitamente, se sabe que sólo una VSP del repertorio de más de 100 genes homólogos se expresa en la superficie de una población de trofozoítos a un tiempo dado (Nash, 1997). Algunos estudios consideran la posibilidad de emplear este mecanismo para desarrollar vacunas. La idea central implica que clonas de *Giardia* expresen todo su repertorio de VSPs, interrumpiendo artificialmente los componentes de la maquinaria del RNA de interferencia que posee para controlar la expresión de las VSPs. Utilizando este tipo de

clonas, los autores demostraron con un modelo de gerbos infectados que se protegían de infecciones subsecuentes. Esto permitió argumentar que es la primera evidencia experimental de que la variación antigénica es esencial para la sobrevivencia del parásito dentro del hospedero; que la interrupción artificial del mecanismo que controla las VSPs puede utilizarse para generar vacunas contra *Giardia* y otros patógenos (Rivero y cols., 2010).

Aunque los tratamientos actuales contra *Giardia* son eficientes y de buen nivel de selectividad, considerando lo expuesto, existe una tendencia a la resistencia de *Giardia* contra los fármacos de prescripción. Tal situación ha motivado la búsqueda de alternativas contra este organismo. Por lo anterior, este trabajo tiene como propósito caracterizar a una proteína perteneciente a una vía energética de *Giardia* como blanco potencial de compuestos anti*giardiasicos*; a continuación se expondrán los motivos de consideración.

1.3 La triosafosfato isomerasa de *G. lamblia* (GITIM) como blanco potencial para el diseño de compuestos anti*giardiasicos*.

La TIM es una enzima que es parte integral en la vía de la glucólisis, participa en la quinta reacción de un total de diez; lleva acabo la interconversión entre el gliceraldehído 3-fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (Rieder y cols., 1958). De estas dos moléculas, sólo el GAP continúa en la vía con la consecuente producción de dos moléculas de ATP. La TIM que interconvierte el DHAP restante a GAP, alimenta a la vía y se generan otras dos moléculas de ATP. Considerando esto último, en el balance final de consumo y producción de energía, se generan dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa consumida.

Debido a este balance energético, se ha sugerido que si la TIM se inactiva ó se elimina de un organismo anaerobio, la ganancia de ATP en la vía de la glucólisis sería de 2 moléculas, sin embargo dado que al inicio de esta vía se consumen 2 ATP's, se ha sugerido que globalmente habría un déficit energético (Desai y Miller, 2008); por tanto, un organismo que base la obtención de energía en esta vía tendría serios problemas para sobrevivir.

Con base en lo anterior y relacionándolo a *G. lamblia*, se sabe que este organismo produce ATP de forma importante a través de la glucólisis. Aunque presenta otras fuentes de energía como la vía de la arginina deshidrolasa (Edwards y cols., 1992), no se ha demostrado concluyentemente que sean su fuente principal.

La TIM ha sido ampliamente caracterizada en una gran cantidad de organismos, por ejemplo, se conoce la secuencia de aminoácidos de más de 650 especies (<http://www.uniprot.org>). Además, se ha logrado obtener la estructura cristalográfica de la TIM de más de 25 especies y en muchos casos se ha reportado en más de una conformación, en presencia y ausencia de ligando y, en presencia de otras moléculas de importancia biológica ó farmacológica (<http://www.pdb.org/pdb>). Se sabe que la forma funcionalmente biológica de la TIM es un dímero compuesto de dos subunidades idénticas de aproximadamente 250 residuos aminoáciles; cada subunidad tiene un sitio activo que actúa independientemente. El mecanismo catalítico se conoce de forma detallada (Wierenga y cols., 2010) y se han identificado los aminoácidos involucrados en su catálisis. La estructura de la TIM presenta el dominio denominado barril α/β ó barril TIM (Lolis y cols., 1990). Se compone de 8 hebras- β centrales y, hacia el exterior de la proteína, se localizan 8 α -hélices, como se esquematiza en la Figura 3, cada hebra- β se conecta a una α -hélice por medio de una asa.

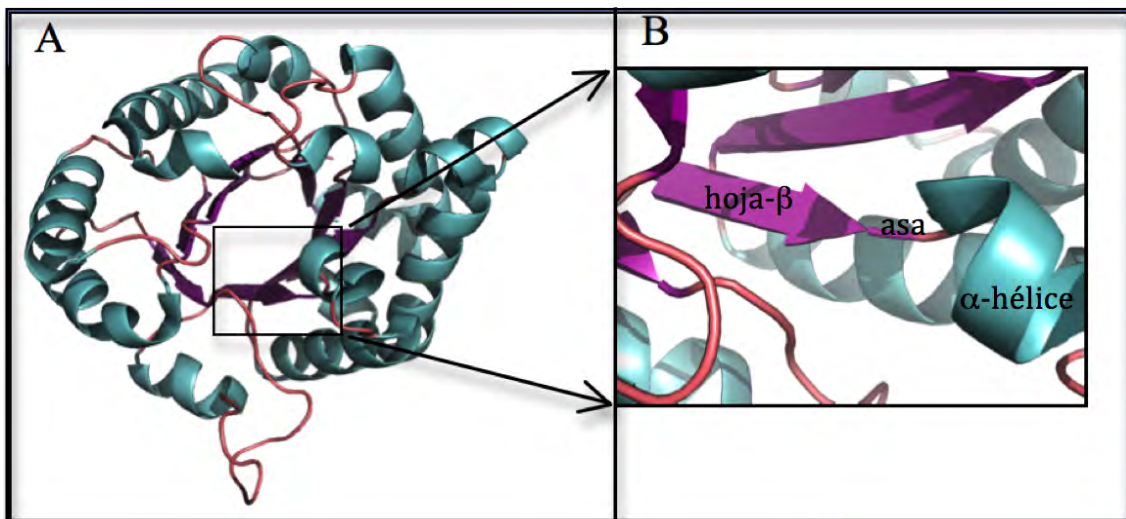


Figura 3. Estructura de la GITIM representada en listones. En el panel A se observan las α -hélices, hojas- β y asas. En el panel B, se observa una región ampliada de una α -hélice y hoja- β unidas por un asa. La figura se preparó con PyMOL (DeLano W. 2002).

Hacia el centro del barril se localizan los aminoácidos catalíticos de esta enzima. Desde hace algún tiempo, se sabe que los residuos que participan en la catálisis son la lisina, la histidina y el ácido glutámico, localizados para el caso de la GITIM en las posiciones 13, 96 y 164 respectivamente; se sabe que el Glu 164 actúa como nucleófilo catalítico, atrayendo al protón del sustrato para iniciar su isomerización. Por otra parte, en estudios cristalográficos de la enzima de levadura en complejo con fosfoglucohidroxamato, indican que la His 96 está unida por dos puentes de hidrógeno a la DHAP a través de los

oxígenos del grupo fosfato, con lo cual se sugiere que permite la protonación del oxígeno carbonílico del GAP, se dice que este residuo es el electrófilo que polariza el sustrato. En esos mismos estudios, se identifica al grupo ϵ amonio de la Lys 13 a distancia de puente de hidrógeno del oxígeno del grupo fosfato del sustrato (Jogl y cols., 2003). Además de los aminoácidos que llevan a cabo la catálisis, se ha identificado otra región importante de la TIM relacionada con la catálisis: el asa número seis ó asa catalítica. Se le denomina asa catalítica debido a que se cierra sobre el sitio activo, con el objetivo de mantener un núcleo hidrofóbico para el sustrato durante la isomerización. Lo anterior evita la formación del subproducto tóxico metilglioxal, que se genera cuando la reacción se lleva a cabo en disolución (Naila y cols., 2003).

Por otro lado, algunos reportes demostraron la importancia de las enzimas de la glucólisis como potenciales blancos antiparasitarios utilizando la tecnología del RNA de interferencia (RNAi). Por ejemplo, se ha demostrado que si se bloquea parcial ó completamente alguna de las enzimas de esta vía, se afecta significativamente al organismo en cuestión (Peter y cols., 2005; Ana y cols., 2010; Alexandra y cols., 2006; Zhang y cols., 2007). Por tanto, la presencia de las enzimas de la glucólisis es de vital importancia para la supervivencia de los organismos. Otro reporte interesante es el de Eissenthal y Cornish-Bowden en 1998, los investigadores realizaron un estudio teórico de la inhibición de las 10 enzimas presentes en la vía glucolítica. En su trabajo concluyeron que ningún inhibidor de tipo competitivo sería exitoso, aunque un inhibidor de tipo acompetitivo contra el transportador del piruvato podría tener posibilidades de éxito. Además, se señaló que un inactivador que no compitiera por el sitio activo de una enzima tendría mayores posibilidades de éxito. Lo anterior parece ser una regla, ya que precisamente los sitios activos de las enzimas son altamente conservados entre las especies; por lo que en principio, para considerar una molécula con potencial farmacológico, se deberían tomar en cuenta regiones distintas al sitio activo.

Pese a que todos los organismos contienen enzimas de la glucólisis y éstas presentan un alto grado de identidad y similitud, algunos autores las han propuesto como blanco potencial para la generación de antiparasitarios. Sin embargo, también se ha sugerido que es complicada la generación de moléculas inhibitorias, ya que si se inhibe ó inactiva a cualquiera de las enzimas del parásito, existe la posibilidad de afectar a la enzima homóloga del hospedero (Cornish-Bowden, 1986). Sin embargo, algunos autores argumentan que se pueden aprovechar las diferencias estructurales entre proteínas

homólogas del parásito y el hospedero con la intención de buscar regiones sensibles como probables blancos farmacológicos (Gómez-Puyou y cols., 1995). También se han reportado trabajos donde centran su atención en biomoléculas no compartidas ó exclusivas del parásito; en esos casos, la justificación es que cualquier región que se describa como blanco de acción farmacológica, potencialmente no se presentaría en las biomoléculas del hospedero (Jarroll y Sener, 2003). En cualquiera de los casos, la intención es aprovechar diferencias estructurales ó de propiedades físico-químicas de algunas zonas de biomoléculas para generar compuestos que tengan afinidad a esas regiones y que además logren afectar la función y/o estructura de la biomolécula deseada.

1.4 Otras posibilidades de biomoléculas como blanco de fármacos en *G. lamblia*.

Desde hace algunos años se han desarrollado gran cantidad de trabajos en *G. lamblia*, donde se describen moléculas que se proponen como blancos farmacológicos. Por ejemplo, la guanina fosforibosil-transferasa (GPRTasa), enzima importante que se encarga de convertir el nucleótido guanina, en guanina-mono-fosfato, se sabe que este parásito no sintetiza purinas y por tanto este nucleótido se debe de transportar hacia el interior de la *Giardia* desde el lumen intestinal del hospedero. Esta enzima presenta menos del 20% de identidad con la correspondiente del humano: hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRTasa) (Sommer y Wang, 1996). Se conoce la estructura cristalográfica de la GPRTasa en presencia de la immucilina GP, análogo en estado de transición del sustrato guanina-mono-fosfato; se ha demostrado que esta molécula es un potente inhibidor, por lo que estos investigadores proponen que se puede considerar a la GPRTasa como blanco para el diseño de compuestos anti-GPRTasa. Otras proteínas como la sintasa de la pared del quiste (Suk y cols., 2007) ó la cinasa 3-fosfoinositolido (Cox, 2006), también son considerados candidatos para inhibir su función y en consecuencia poder aniquilar a *Giardia*. Los investigadores de cada una de estas enzimas destacan su importancia y posibilidad de incluirlas en la lista de biomoléculas con potencial utilidad farmacológica. Nuestro grupo de trabajo está interesado en la GITIM como potencial blanco farmacológico, pero antes de abordarla en ese sentido, se describirá su importancia como blanco en otros organismos.

1.5 Antecedentes sobre la búsqueda de sitios blanco en la TIM.

Existe una gran cantidad de trabajos donde se ha demostrado que la TIM puede ser un buen blanco farmacológico (Ostoa-Saloma y cols., 1997; Rodríguez-Romero A. y cols., 2002, Velanker S. y cols., 1997). Se han sondeado regiones de esta enzima por medio de agentes derivatizantes que modifican química y específicamente cisteínas. Esencialmente, se intenta identificar zonas de la enzima por medio de los derivatizantes ó sondas que, mediante modificación química se perturbe su función y/o estructura. Esto ha sido ampliamente utilizado con gran éxito. Por ejemplo Gómez-Puyou y colaboradores evaluaron en 1995 a la TIM de *T. brucei* (TbTIM) como potencial blanco farmacológico. Emplearon el derivatizante de Cys y Met cloramina T, sobre las enzimas recombinantes de TbTIM y la TIM de conejo. Se observó que al exponerlas al derivatizante, se promovía la inactivación de ambas enzimas. Posteriormente, analizaron el contenido de Cys y Met e identificaron estos residuos aminoácidos en ambas proteínas; se encontró que el único residuo compartido era el de la posición 14 (Cys en TbTIM y Met en la TIM de conejo). Por tanto, se sugirió que la modificación química de la Cys 14 promovía la inactivación en TbTIM. En este mismo trabajo y para comprobar esta hipótesis, construyeron una mutante de TbTIM donde se sustituyó la Cys 14 por un residuo de Leu. Interesantemente, la enzima mutante presentó tendencia a la agregación y cinética alterada, lo que sugería fuertemente que esta posición es altamente sensible a sustitución aminoácil. Finalmente, evaluaron la actividad de las enzimas al derivatizante de Cys metil-metano tiosulfonato (MMTS), los resultados demostraron que la TIM de conejo fue prácticamente insensible a este compuesto, mientras que la TbTIM se inactivó totalmente, por lo que los autores sugirieron que la derivatización de la Cys 14 en TbTIM promovía su total inactivación. Así, de manera importante lograron identificar una región como probable blanco farmacológico, siendo esta estrategia altamente efectiva para identificar blancos de compuestos anti-TIM.

En otros trabajos con enzimas homólogas de algunos parásitos (Maithal K, y cols., 2002; Rodríguez-Romero A. y cols., 2002), se obtuvieron resultados similares al utilizar ese tipo de compuestos, en todos los casos las TIMs cuentan con una Cys en posición estructuralmente equivalente a la 14, por lo que el mecanismo de inactivación que sugieren estos autores es similar a la derivatización de la TbTIM.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo exploró la posibilidad de inactivar a la GITIM por medio de algunos derivatizantes de Cys ó también denominados sondas. A ese respecto, se trabajó con la GITIM recombinante, se caracterizaron sus principales

parámetros cinéticos y se probaron algunos derivatizantes de Cys en esta enzima. Es importante destacar que esta enzima tiene cinco residuos de Cys/subunidad, por lo que potencialmente era posible derivatizarla e inactivarla. Los ensayos demostraron que la GITIM se inactivó en presencia de los derivatizantes MMTS, 2-carboxietil-metano tiosulfonato (MTSCE) y el ácido ditiobis-nitrobenzónico (DTNB). En paralelo, se realizaron experimentos similares con la TIM recombinante de humano (HuTIM), análogamente a la GITIM, la HuTIM tiene cinco Cys/subunidad y en este caso los ensayos con los derivatizantes mostraron que esta enzima es 200 veces más resistente que la GITIM, la Figura 4 muestra los resultados de esos experimentos.

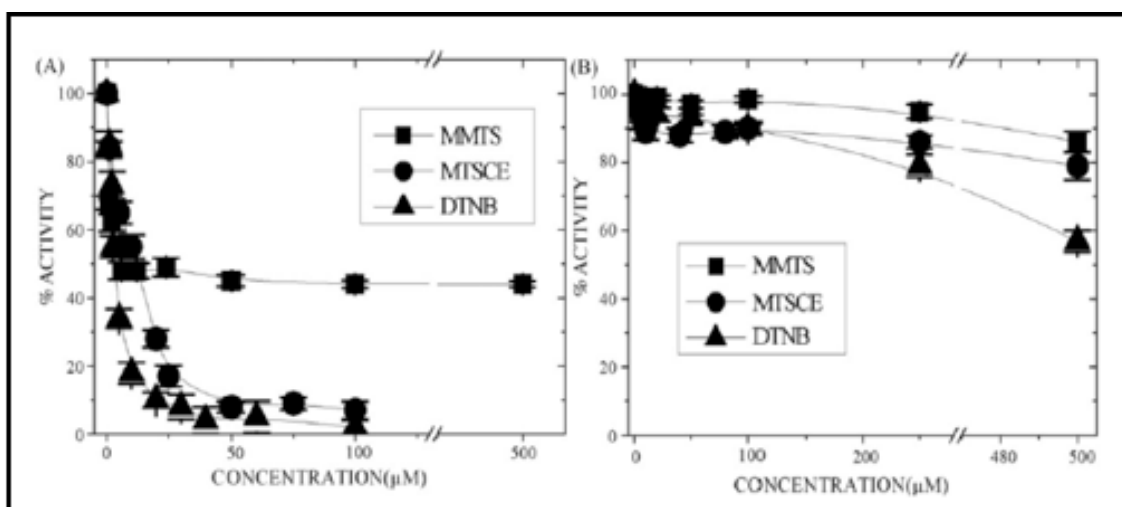


Figura 4. Derivatización en la GITIM (panel A) y HuTIM (panel B). Las enzimas se incubaron con cada uno de los derivatizantes mencionados en la grafica, a concentraciones crecientes durante 2 hr a 25 °C. Enseguida se tomaron alícuotas y se midió la actividad residual (Enríquez-Flores y cols., 2008).

Posteriormente se complementaron estos resultados cuantificando el número de Cys/subunidad derivatizadas obteniéndose de 1 y 4 para HuTIM y GITIM, respectivamente. Tomando en conjunto estos resultados, demostramos que la GITIM es sensible a la derivatización y se inactiva de forma específica de especie.

Con los estudios anteriormente descritos se demostró que los derivatizantes inactivan a la GITIM y en contraste la HuTIM es altamente resistente a dichos derivatizantes. Además, nuestros resultados también indican que el número de Cys relacionadas con la inactivación podrían ser de una hasta cuatro. Sin embargo no se identificó en la GITIM cuales son las Cys responsables de promover inactivación cuando estas son derivatizadas. Por lo que este trabajo incluye identificar la ó las Cys implicadas en la inactivación, así como la caracterización de los mecanismos de inactivación que se promueven, como consecuencia de la derivatización de las Cys en la GITIM.

2. HIPÓTESIS.

La caracterización funcional y estructural de los mecanismos de inactivación de la GITIM mediante la modificación de los residuos aminoácidos de la enzima, podremos conocer las potenciales zonas afectadas de la GITIM y proponer regiones blanco para el diseño de anti-giardíacos específicos.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Caracterizar funcional y estructuralmente la inactivación selectiva de la GITIM, dirigida al diseño de inhibidores altamente específicos.

3.2 Objetivos particulares.

- i. Determinar la secuencia de derivatización de las Cys por medio de espectrometría de masas.
- ii. Identificar los residuos de Cys relacionados con la inactivación de la GITIM silvestre y sus mutantes sencillas de Cys, al derivatizarse con compuestos sulfhidrilo.
- iii. Determinar las constantes de velocidad de inactivación de los compuestos derivatizantes: MTSCE y DTNB.
- iv. Determinar la K_D del 2-PG con la GITIM derivatizada y sin derivatizar, utilizando la fluorescencia intrínseca.
- v. Determinar los parámetros termodinámicos de la unión de 2-PG a la GITIM sin derivatizar y derivatizada, mediante calorimetría de titulación isotérmica.
- vi. Resolver la estructura cristalográfica de la GITIM derivatizada con los grupos derivatizantes de Cys: MMTS, MTSCE y DTNB.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 Clonación, mutagénesis y purificación de las enzimas.

En una publicación previa se describió detalladamente la metodología de la clonación y purificación de la GITIM (López-Velazquez y cols., 2004). Brevemente, la GITIM se subclonó al plásmido pET3a-HisTEVP, que introduce en su extremo amino terminal seis residuos de His (etiqueta de histidinas) y una secuencia de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco. Para obtener las mutantes sencillas de Cys, se empleó la técnica de mutagénesis dirigida por PCR. Se sintetizaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, oligonucleótidos mutagénicos para sustituir cada una de las 5 Cys de la GITIM por el residuo aminoacil Ala, de tal manera que las mutantes sencillas de GITIM serían la C14A, C127A, C202A, C222A y C228A. Una vez obtenidos los productos de PCR, cada uno de ellos fue clonado en el plásmido pET3a-HisTEVP. Para corroborar la fidelidad del gen y la mutación deseada se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, cada uno de los genes de la GITIM.

Después de corroborar lo anterior se transformaron con el plásmido pET3a-HisTEVP las bacterias *Escherichia coli* BL21(DE3)-pLys y se sobre-expresaron las enzimas. Estas se purificaron mediante cromatografía de afinidad por níquel. Posteriormente, las mutantes se incubaron en presencia de la proteasa del virus del tabaco, con el propósito de eliminar los residuos de aminoácido extra. Nuevamente se utilizó la columna de níquel para separar a la GITIM y eliminar la proteasa y aminoácidos extra, correspondientes a la etiqueta de histidina y sitio de reconocimiento de la proteasa. La pureza y eliminación de la etiqueta de His se corroboró por geles SDS-PAGE al 16 %.

4.2 Determinación del orden de derivatización de Cys en la GITIM.

Se prepararon 100 μ L de GITIM a 4.5 mg/mL resuspendida en amortiguador de 100 mM de trietanolamina, 10 mM de EDTA (amortiguador TE), se le adicionaron 6 M de hidrocloreuro de guanidina (HClGdn) y 50 mM de ditioneitol (DTT); ésto se incubó 2 h. a 25°C. Posteriormente se añadieron 300 mM de iodoacetamida y se continuó la incubación por 20 min. en condiciones de oscuridad, debido a que la iodoacetamida es fotosensible. En seguida se ultrafiltró la enzima 3 veces en tubos Amicon con paso de corte de 10 kDa para eliminar el exceso de iodoacetamida y DTT, así como para equilibrarla en 100 mM de bicarbonato de amonio pH 7.8, 0.02 % de NaN₃, suplementado con 2 M de Urea (amortiguador "A"). La concentración de la enzima se

determinó por su absorbancia a 280 nm como previamente se reportó (López-Velazquez y cols., 2004). Posteriormente, la GITIM se incubó con la proteasa V8, enzima de *Staphylococcus aureus* que corta exclusivamente en el extremo carboxilo de residuos de ácido aspártico y ácido glutámico; su especificidad aumenta si se resuspende en el amortiguador "A" cortando sólo en el extremo carboxilo de ácidos glutámicos (Sorensen y cols., 1991). Esta proteasa se seleccionó por dos razones: 1) teóricamente se pueden obtener péptidos que contengan sólo una Cys y 2) debido a que comercialmente se vende adherida a esferas de agarosa y se encuentra inmovilizada, su separación de la muestra es fácil, además de evitarse su autodigestión. Se describe de manera general el protocolo usado para realizar la proteólisis.

Se tomaron 15 μL de perlas con proteasa V8, que corresponden a 0.4 unidades de actividad de proteasa. Las perlas se centrifugaron a 1200 rpm 30 segundos, el botón obtenido se lavó 3 veces con el amortiguador "A" y al final se eliminó el sobrenadante. Este botón se resuspendió en 10 μL de una solución que contiene a la GITIM a 10 mg/mL previamente bloqueada con iodoacetamida y equilibrada en el mismo amortiguador. Paralelamente, se tomaron otros 10 μL de la suspensión con GITIM a la que no se le añadió proteasa V8 (tubo control). Ambas condiciones se incubaron a 37°C en agitación constante y durante 18 h. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1200 rpm por 30 segundos para separar las perlas con la proteasa V8 del digerido. El sobrenadante se recuperó y se aplicaron alícuotas a un gel SDS-PAGE tipo von Jagow al 16 %. Enseguida, se realizó la electroforesis con un voltaje inicial de 90 Volts, 30 min., posteriormente se aumentó a 150 Volts constantes por 2.5 h (Schägger, 1987). Después de estandarizar el método de digestión con proteasa, se derivatizaron las Cys de la GITIM incubándola en condiciones nativas con MMTS, MTSCE, DTNB ó N-etilmaleimida a distintas concentraciones. Se obtuvieron lotes de 0, 1, 2, 3 y 4 Cys/monómero modificadas con cada uno de los derivatizantes antes mencionados. Una fracción de muestra se utilizó para corroborar las Cys derivatizadas como sigue. La muestra (200 μg) se añadió a una mezcla con SDS al 5 % (p/V) y DTNB 1 mM disueltos en amortiguador TE. La cuantificación de Cys se monitoreó espectrofotométricamente con DTNB a 412 nm. El contenido de Cys se calculó con el coeficiente de absortividad $\epsilon_{412}=13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ del TNB generado (Silverstein, 1975) considerándose además el cambio de absorbancia producido por la adición de la proteína a la mezcla SDS-DTNB (blanco).

La fracción restante de GITIM derivatizada con cada sonda se utilizó para experimentos de proteólisis y espectrometría de masas. Los lotes se desnaturalizaron con 6 M de HClGdn y se incubaron con 100 mM de iodoacetamida 20 min. en oscuridad, enseguida se dializaron contra amortiguador "A" y se proteolizaron con proteasa V8 como ya se mencionó. La muestra digerida se utilizó para espectrometría de masas donde se identificaron péptidos de diferente masa molecular.

4.3 Determinación de los parámetros cinéticos.

Se determinó la K_m y V_{max} de la GITIM y sus mutantes midiendo las velocidades iniciales a concentraciones del sustrato gliceraldehído 3-fosfato (GAP), de 0.3 a 3 mM. Las curvas de saturación obtenidas se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, mediante cálculos de regresión no lineal. La k_{cat} se derivó de la V_{max} considerando un peso molecular de 27.7 kDa.

4.4 Ensayos espectroscópicos.

Brevemente, los ensayos de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-810. Se realizó un escaneo entre 200 a 260 nm a intervalos de 1 nm, a 25 °C con 100 µg/mL de enzima previamente dializada contra amortiguador de fosfato 25 mM pH 7.4.

La estabilidad térmica (Tm_{app}) de las proteínas se evaluó por el cambio en la señal de dicroísmo circular (DC) a 222 nm, en un intervalo de temperatura de 25 a 70 °C, incrementando 1°C/min. Las enzimas se mantuvieron en el amortiguador mencionado. Posteriormente, se calculó la Tm_{app} como previamente se reportó (Enríquez-Flores y cols., 2008).

Los ensayos de fluorescencia intrínseca se realizaron con un fluorómetro Perkin-Elmer LS-55, a 25 °C en amortiguador de trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4 (amortiguador TE), con 0.4 mg/mL de enzima. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm y los espectros de emisión de fluorescencia abarcaron de 310 a 500 nm. A todos los espectros de fluorescencia obtenidos se les restó la señal del amortiguador TE.

4.5 Inactivación y cuantificación de Cys derivatizadas en la GITIM y sus mutantes por medio de los derivatizantes MMTS, MTSCE y DTNB.

Los experimentos de inactivación en la GITIM y sus mutantes consistieron en incubar 0.2mg/mL de cada enzima (previamente equilibradas en amortiguador TE) en presencia de distintas concentraciones de los derivatizantes MMTS, MTSCE ó DTNB durante dos horas a 25°C. Posteriormente, se tomaron alícuotas y se midió la actividad residual (López-Velazquez y cols., 2004). Para la determinación de la constante de segundo orden (k_2) con los derivatizantes MTSCE ó DTNB, se incubaron a 25°C, 0.2 mg/mL de GITIM con concentraciones fijas de las sondas y a tiempos crecientes se tomó una alícuota y se midió la actividad residual. Posteriormente, se graficaron las actividades y los datos de cada concentración de derivatizante utilizada fueron ajustados a un modelo de decaimiento monoexponencial, de acuerdo a la ecuación 1.

$$A_R = A_0 e^{-kt} \dots\dots\dots \text{ecuación 1}$$

Donde A_R es la actividad residual al tiempo t , A_0 es la actividad al tiempo cero y k es la constante de inactivación de pseudo primer-orden.

La k_2 se calculó del regráfico de la constante de velocidad de primer orden a cada concentración del derivatizante.

Para determinar el número de Cys derivatizadas, se incubaron 300 μ g de GITIM ó de sus mutantes de Cys, con 100 μ M de MTSCE ó DTNB, en amortiguador TE durante 2 horas a 25°C. Al término de la incubación, la enzima se cargó a una columna con resina Sephadex G-25 y se filtró por centrifugación (Penefsky, 1977) con el propósito de eliminar el derivatizante que no reaccionó. Para preparar esta columna se empleó resina Sephadex G-25 fina (Amersham-Pharmacia), y se empacó en jeringas de 1 mL, las columnas se equilibraron con amortiguador TE y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 2 min. para compactarlas y secarlas. Las muestras de las enzimas (100 μ L) se añadieron a la columna y se centrifugaron durante 110 segundos a 3000 rpm. Enseguida se calculó la concentración de proteína a 280 nm. Con las enzimas derivatizadas ó sin derivatizar se calculó el contenido de Cys como previamente se describió (Enríquez-Flores y cols., 2008).

4.6 Experimentos de unión del 2-fosfoglicolato (2-PG) a la GITIM.

En la GITIM se puede determinar la afinidad de la enzima por el 2-PG monitoreando el cambio en la fluorescencia intrínseca, en respuesta a la adición de este ligando.

Brevemente, los espectros de fluorescencia se tomaron antes y después de adicionar 1 ó 2 μL de soluciones stock de 3 y 30 mM de 2-PG, respectivamente. El volumen añadido de las soluciones stock a la celda fue menor del 5 % del total, por lo que no influyeron significativamente en los espectros de emisión obtenidos (González-Mondragón y cols., 2004). Las enzimas GITIM y GITIM-C222A se incubaron en ausencia ó presencia de los derivatizantes MMTS ó MTSCE durante dos horas a 25°C. La reacción se detuvo cargando las enzimas en columnas con resina Sephadex G-25 y filtrándose por centrifugación (Penefsky, 1977). Se cuantificó la proteína a 280 nm como previamente se reportó (López-Velazquez 2004). Posteriormente, para los ensayos de fluorescencia intrínseca cada enzima fue excitada a 295 nm y se registró su espectro de emisión de 310 a 500 nm. En todos los ensayos se les restaron los espectros de emisión que sólo contenían el amortiguador suplementado con 2-PG. Para obtener la K_D , se graficó la máxima intensidad de fluorescencia a 332 nm para cada concentración de 2-PG y se ajustó a la ecuación 2.

$$y = (\alpha/2E_t)[(E_t + x + K_D) - \sqrt{(E_t + x + K_D)^2 - 4xE_t}] \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Donde $y = 1 - (F_i/F)$ (F_i , fluorescencia inicial; F , intensidad de fluorescencia a cada concentración de 2-PG), α es el cambio máximo de fluorescencia obtenida en concentración de ligando saturante, E_t representa la concentración de sitios de unión y x es la concentración de 2-PG (González-Mondragón y cols., 2004).

4.7 Calorimetría de titulación isotérmica de unión a 2-PG.

Los ensayos de calorimetría fueron realizados con un calorímetro de titulación isotérmica (ITC), utilizando 180 μM de GITIM sin derivatizar ó derivatizada con MMTS, en presencia de 3.3 mM de 2-PG. Las adiciones del ligando 2-PG fueron distribuidas en 20 a 30 inyecciones consecutivas a intervalos regulares entre 0 y 3.3 mM. A cada isoterma obtenida se les restaron inyecciones de amortiguador para eliminar el calor de dilución. Los valores de K_D , cambio en entalpía (ΔH) y estequiometría de unión (n) se determinaron por ajuste no lineal, de los datos de la titulación normalizada, usando un modelo con sitios de unión idénticos e independientes (Wiseman y cols., 1989).

4.8 Cristalización, derivatización, colecta de datos de difracción y determinación de la estructura de la GITIM.

Brevemente, la GITIM C202A se cristalizó utilizando la técnica de difusión en fase de vapor, en gota sedente. Se utilizaron cajas de cristalización de 48 pozos, cada pozo tiene dos reservorios, en el reservorio superior se colocaron 5 μL de enzima a 13 mg/mL disuelta en amortiguador TE, con 5 μL de solución cristalizante: 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1M Tris-HCl, pH 8.5 (Hampton Research); y en el reservorio inferior se adicionó 1 mL de la solución cristalizante. Posteriormente se selló la caja y se incubó a 18°C. Los cristales de proteína aparecieron después de 1 mes de incubación. Enseguida a los cristales se les aplicó la técnica de soaking ó "remojado" adicionando 20 mM, 5 mM y 2 mM de MMTS, MTSCE ó DTNB, respectivamente. Desafortunadamente no se obtuvieron buenos resultados en los cristales remojados con MTSCE ó DTNB; estos cristales se fragmentaron entre la primer y segunda hora de su remojado. En contraste, los cristales de la GITIM tratados con el derivatizante MMTS no se evidenció fractura por inspección visual, por lo que sólo se continuó la técnica de soaking con este derivatizante. Después de cinco días de emplear la técnica, los cristales se mezclaron con solución crioprotectora y se utilizaron para su difracción y posterior resolución. Las difracciones fueron colectadas a 113 K con un difractómetro Rigaku Raxis IIC con generador de ánodo rotatorio. Posteriormente fueron procesadas con XDS (Kabsch, 1993) y escaladas con SCALA (Evans, 2006). La estructura cristalográfica se resolvió por el método de remplazo molecular con el programa PHASER (McCoy y cols., 2007), usando las coordenadas de la estructura de la GITIM previamente reportada (Reyes-Vivas y cols., 2007) código PDB 2dp3. El afinamiento de la estructura se hizo con PHENIX (Adams y cols., 2010) y, para la construcción del modelo y corrección del mismo, se utilizó el programa COOT (Emsley y Cowtan, 2004). Las coordenadas atómicas y los factores de estructura fueron depositados en el RCSB Protein Data Bank (PDB) con el número de acceso 3PF3.

5. RESULTADOS.

5.1 Orden de derivatización de las Cys de la GITIM.

Dentro de los objetivos planteados en este proyecto, fue determinar en qué orden se derivatiza cada Cys, en un reporte previo demostramos que son 4 las Cys/subunidad que se derivatizan y, en consecuencia, la Cys 222 puede ocupar cualquier lugar en el orden de la modificación química. Para tratar de contestar esta pregunta, se empleó la proteólisis y espectrometría de masas. La Figura 5 muestra el resultado obtenido de la proteólisis.

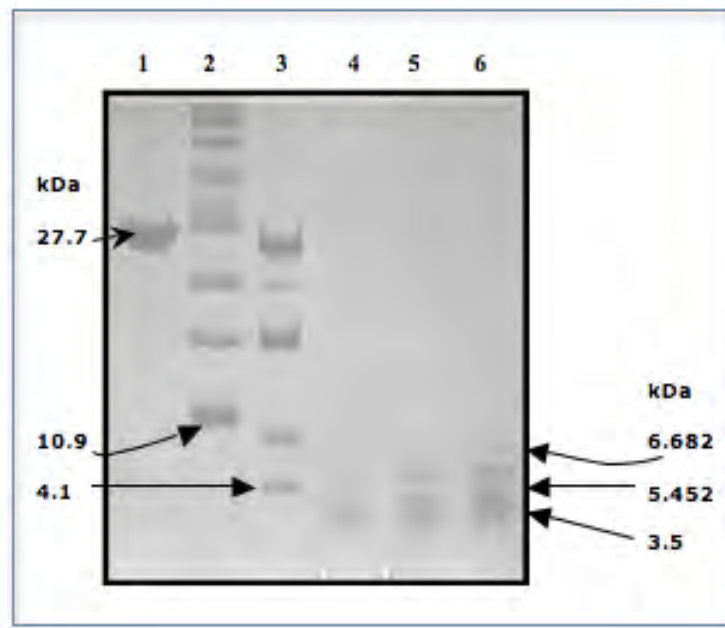


Figura 5. SDS-PAGE al 16 %. Carriles: (1) 9 µg de GITIM-iodoacetamida (control), (2) y (3) marcadores de peso molecular, (4), (5) y (6) aproximadamente 12, 20 y 30 µg de proteína proteolizada, respectivamente.

En la Figura 5, el carril 1 corresponde a la GITIM con iodoacetamida (control), sólo se observa una banda que corresponde al peso molecular del monómero. Los carriles 4 a 6 muestran distintas bandas de la proteólisis y las flechas señalan algunos pesos moleculares calculados de dichos fragmentos.

Por otra parte y con el propósito de calcular de forma teórica los péptidos que se obtendrían de la GITIM al digerirla con la proteasa V8, se utilizó el programa PeptideMass del servidor ExPASy (Wilkins y Williams, 1997). Este servidor generó una lista de los pesos moleculares correspondientes a cada péptido. En condiciones de una proteasa 100 % eficiente, los pesos moleculares de los fragmentos no rebasarían los 7.4 kDa. Mientras que con 1, 2 ó más errores en los cortes, se generarían péptidos de 8.1 y 8.6 kDa respectivamente. Por tanto de los resultados obtenidos y con este tipo de

tinción, que puede resolver hasta 0.5 µg de proteína (Diezel y cols., 1990), podemos inferir que la proteólisis presentó más del 90 % de eficiencia. Cabe hacer notar que en la Figura 5, de los carriles 4 a 6, la banda de mayor peso molecular corresponde a 6.68 kDa, que difiere del peso teórico calculado para el péptido mayor de 7.4 kDa. Posiblemente esto se debe a la capacidad resolutive del gel ó a la migración distorsionada de estas bandas debido al alto contenido de urea de estas muestras.

En la Figura 5 también se aprecian barridos de proteína menores a 3.5 kDa, posiblemente estén contenidos los péptidos teóricamente calculados para los fragmentos que tendrían en su secuencia las Cys (228, 222, 127 y 202) con 2.2, 2.0, 1.24 y 0.6 kDa, respectivamente. Con estos resultados avanzamos a la segunda etapa, que consistió en la identificación de los péptidos generados, utilizando para ello la espectrometría de masas. Desafortunadamente con los resultados obtenidos de espectrometría de masas, no pudimos identificar el orden de derivatización (datos no mostrados). Al ser una metodología no cuantitativa, los resultados que obtuvimos fueron variables respecto al enriquecimiento de péptidos conforme se derivatizaron Cys, específicamente, entre los péptidos que contenían las Cys 222 y 228. Sin embargo, como se mencionará en la discusión, para las Cys 202 y 14 se puede inferir con suficiente confianza su orden de derivatización, sin embargo para las Cys 222 y 228 no se obtuvo un dato sugerente de su orden de derivatización.

5.2 Parámetros cinéticos y estabilidad térmica de GITIM silvestre y sus mutantes.

La intención de construir mutantes sencillas de la GITIM fue evaluar su sensibilidad a los derivatizantes y con esto identificar la ó las regiones blanco de inactivación. Después de construir las mutantes de GITIM, se purificaron y se evaluaron los parámetros cinéticos de la GITIM silvestre y sus mutantes. Brevemente, se construyeron cinco mutantes en donde se sustituyó cada residuo de Cys por Ala (C14A, C127A, C202A, C222A y C228A). Una vez purificadas las enzimas silvestre y mutantes, se determinaron sus parámetros cinéticos con el propósito de valorar el grado de perturbación debida a la sustitución aminoacil, el Cuadro 2 muestra los resultados obtenidos.

GITIM	Km (mM)	k_{cat} (10^5 min^{-1})	$k_{cat}/K_m \times 10^5$ ($\text{min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)
Silvestre	0.78 ± 0.06	4.6 ± 0.16	5.9
C14A	0.4 ± 0.06	5 ± 0.16	12
C127A	0.36 ± 0.06	3.5 ± 0.1	9.7
C202A	0.8 ± 0.09	2.9 ± 0.14	3.6
C222A	1.8 ± 0.3	5 ± 0.4	2.8
C228A	0.25 ± 0.07	1.87 ± 0.19	7.5

Cuadro 2. Valores obtenidos de los parámetros cinéticos. Después de purificar las enzimas, se evaluaron sus principales parámetros cinéticos. Los resultados son el promedio de triplicados \pm desviación estándar. Esencialmente, los parámetros cinéticos son similares entre todas las enzimas, a excepción de la GITIM-C222A donde su Km fue del doble de la silvestre; sin embargo, los valores de la catálisis de esa enzima están en el mismo orden de magnitud. Por lo que esto indica una ligera pérdida en la afinidad por el sustrato, aunque a nivel de catálisis se mantuvo en valores normales.

Por otro lado y, con el propósito de conocer el grado de perturbación estructural debido a la mutación de Cys por Ala, se determinó el diámetro circular (DC) y la termoestabilidad seguidos por DC. Los espectros de DC de las enzimas mutantes fueron similares a la silvestre (Figura 6, panel A). Por tanto, globalmente a nivel de estructura secundaria, no se promovieron cambios importantes en las enzimas mutantes.

Los valores obtenidos de la temperatura media de desnaturalización térmica ó $T_{m_{app}}$ fueron similares entre las enzimas mutantes y la silvestre, a excepción de la GITIM-C127A, (Figura 6, panel B); esta enzima fue más sensible a la desnaturalización térmica disminuyendo en 5°C su termoestabilidad, lo cual es significativamente importante. A este respecto Cruces-Ángeles y colaboradores en 2011 reportaron que este residuo es estrictamente conservado, así como González-Mondragón y colaboradores en el 2004 indicaron que la Cys 126 de la TIM de *Saccharomyces cerevisiae*, equivalente a la Cys 127 de GITIM, está relacionada con el correcto plegamiento de esta enzima. Los autores sustituyeron este residuo por Ala ó Ser y monitorearon por desnaturalización térmica a esta mutante, observaron que su $T_{m_{app}}$ disminuyó significativamente. Por lo que nuestros resultados en la mutante GITIM-C127A son consistentes con estos reportes.

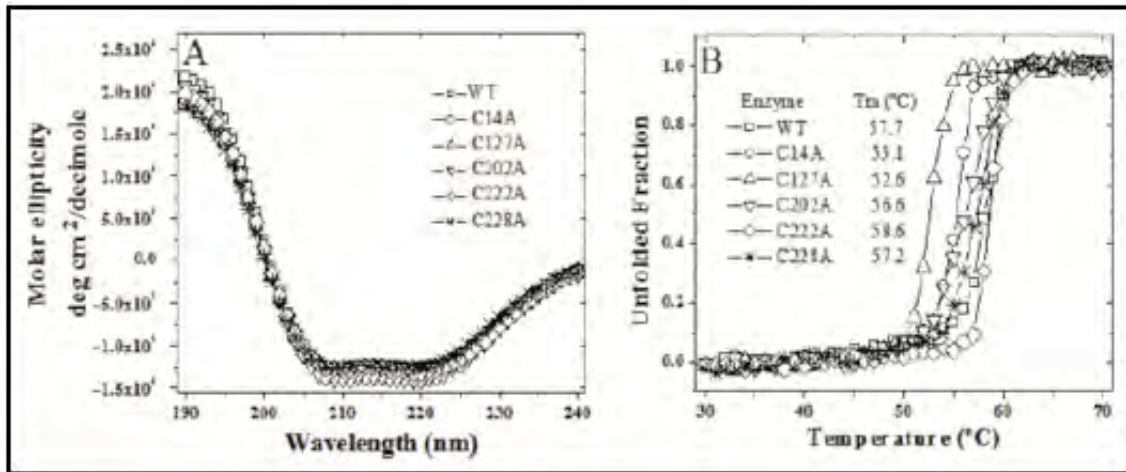


Figura 6. (A) Espectro de dicroísmo circular (DC) en uv lejano y (B) estabilidad térmica. Para los experimentos se emplearon 100 $\mu\text{g/mL}$ de la GITIM silvestre (\square), C14A (\circ), C127A (\triangle), C202A (∇), C222A (\star) y C228A (\ast). En los ensayos de DC las enzimas se escanearon de 190 a 240 nm, mientras que la estabilidad térmica fue seguida por la pérdida en la señal de DC a 222 nm en función de la temperatura. Los experimentos de DC fueron realizados a 25 °C y los de termoestabilidad se realizaron de 30 a 70 °C, con incremento en la temperatura de 1 °C/min. El recuadro del panel B muestra la $T_{m_{app}}$ de cada enzima.

Aunque la estabilidad global de la GITIM-C127A resultó alterada (Figura 6, panel B), sus parámetros cinéticos fueron similares a la GITIM silvestre. Por lo que tomando en conjunto estos valores, consideramos que en términos globales los parámetros cinéticos, la estructura secundaria y la conformación tridimensional de las enzimas mutantes fueron muy similares a la GITIM silvestre. Basándonos en estos parámetros de confianza, lo siguiente fue realizar los ensayos con las enzimas y los derivatizantes.

En los experimentos donde se incubaron las enzimas en presencia de los derivatizantes, casi todas se inactivaron de forma semejante a la GITIM silvestre. En contraste y muy interesantemente, la enzima GITIM-C222A fue excepción a la inactivación, en la Figura 7 se puede observar que esta enzima fue totalmente insensible, mientras que en la GITIM silvestre y el resto de las mutantes se promovió inactivación.

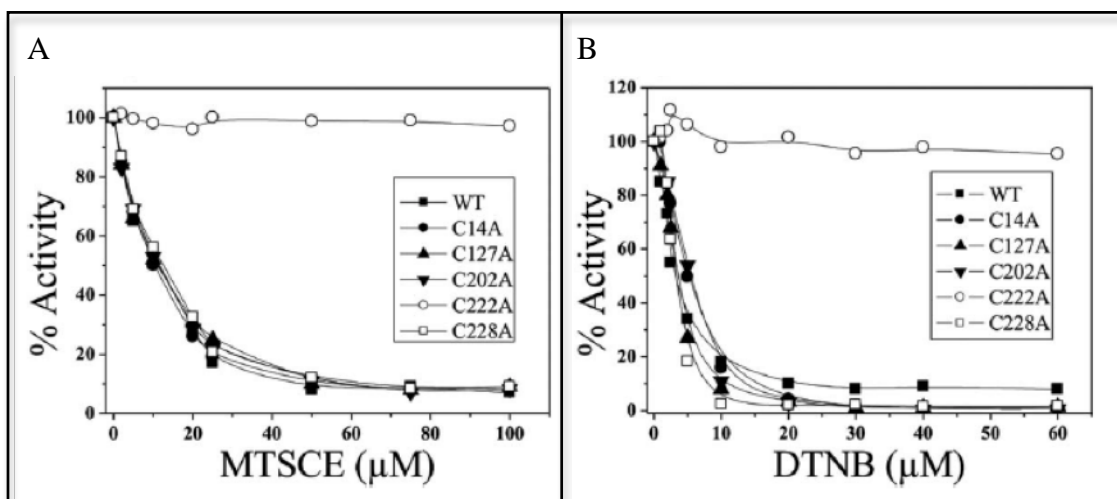


Figura 7. Inactivación de la GITIM silvestre y sus mutantes, por derivatización de Cys. La GITIM silvestre (■), C14A (●), C127A (▲), C202A (▼), C222A(O) y C228A (□), se incubaron durante 2 h a 25°C a las concentraciones mencionadas de MTSCE (A) ó DTNB (B). Después de la incubación se tomaron alícuotas de cada concentración y se les determinó la actividad residual. Las actividades son el porcentaje respecto al control sin derivatizante.

Estos resultados demuestran que si la Cys 222 no está presente, en la GITIM no se promueve su inactivación. Sin embargo es posible que el número de Cys derivatizadas sea diferente en cada una de las enzimas. Por tanto y para complementar estos ensayos, se cuantificó el número de Cys en condiciones de máxima inactivación, con el propósito de identificar si se habían derivatizado otras Cys en cada mutante y en el Cuadro 3 podemos ver los resultados.

GITIM	(% Inactivación en la GITIM)		Cys derivatizadas/ subunidad (MTSCE ó DTNB)
	MTSCE	DTNB	
Silvestre	97	100	3.94 ± 0.25
C14A	97	100	2.89 ± 0.16
C127A	97	100	3.92 ± 0.14
C202A	97	100	2.88 ± 0.27
C222A	0	0	2.91 ± 0.19
C228A	97	100	2.96 ± 0.1

Cuadro 3. Porcentaje de inactivación y cuantificación del número de Cys derivatizadas. Se reporta el máximo valor de inactivación y cuantas Cys se modificaron. Los experimentos se realizaron por triplicado. El renglón sombreado en gris, indica una diferencia significativa con respecto a los demás ensayos.

Los datos del Cuadro 3 muestran el efecto de los derivatizantes sobre las enzimas.

Todas tuvieron tres ó más residuos de Cys derivatizados, incluso la GITIM-C222A que es resistente al potente efecto inactivador promovido con los derivatizantes. Por tanto, aunque otras Cys diferentes a la Cys 222 se modifiquen químicamente, no se observa un efecto desfavorable sobre la actividad enzimática. Por el contrario, si se modifica químicamente la Cys 222 se promueve un efecto totalmente desfavorable sobre la actividad de la GITIM.

5.3 Constantes de velocidad de inactivación de la GITIM utilizando derivatizantes.

Con el objetivo de conocer la velocidad de reactividad de las Cys hacia los derivatizantes, se determinó la constante de velocidad de pseudoprimer orden ó k_1 . Es importante hacer notar que aunque la Cys 222 está cercana a la superficie de la enzima, tiene una exposición al solvente de 0.09% (Gerstein, 1992) calculada a partir de la estructura reportada en el PDB (código 2dp3), es decir, es poco accesible al solvente. Sin embargo, los ensayos de inactivación nos demuestran que este residuo se derivatiza y, por tanto, es accesible a las sondas. El objetivo de estos ensayos fue conocer la rapidez con que se inactiva la GITIM con los derivatizantes. Brevemente, incubando la GITIM en un curso temporal a varias concentraciones de los derivatizantes MTSCE ó DTNB, se observó que esta enzima disminuye su actividad como se ve en la Figura 8.

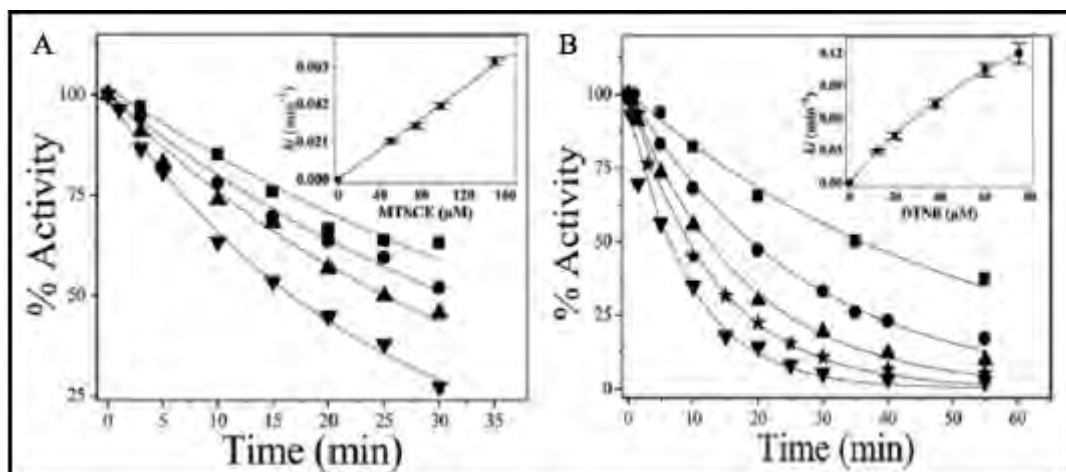


Figura 8. Determinación de la k_2 de la GITIM silvestre, por derivatización de Cys. La enzima fue incubada con 50 (■), 80 (●), 100 (▲) y 150 (▼) μM de MTSCE (panel A), ó 12.5 (■), 20 (●), 38 (▲), 60 (★) y 75 (▼) μM de DTNB (panel B). A los tiempos señalados se tomaron alícuotas de cada concentración y se midió la actividad residual. Las actividades fueron graficadas como porcentaje, donde el tiempo cero fue la máxima actividad. Las líneas corresponden al ajuste de los datos experimentales de la ecuación 1. Los recuadros de ambos paneles muestran el re-gráfico de las constantes de pseudoprimer orden vs la concentración de MTSCE ó DTNB.

En la Figura anterior se observa que tanto en la incubación con MTSCE (panel A), así

como en la incubación con DTNB (panel B), la GITIM disminuyó gradualmente la actividad con el tiempo. Como el comportamiento de cada trazo en ambos paneles corresponde a una caída de tipo monoexponencial, estos se ajustaron a la ecuación 1 previamente descrita (ver sección 4.5). A partir del ajuste se obtuvo la k_1 para cada trazo. Posteriormente este valor se graficó en función de la concentración del derivatizante para obtener la constante de velocidad de segundo orden (k_2), en la Figura 8 (recuadro superior paneles A y B) se ilustra el regráfico. Con MTSCE, el comportamiento de la k_1 en función de la concentración fue lineal y se obtuvo una k_2 de $7.0 \pm 0.16 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Por otra parte, a diferencia de la línea recta obtenida con el MTSCE, el regráfico de k_1 en función de la concentración de DTNB ajustó a una curva de tipo hiperbólico. A este respecto se ha reportado que este tipo de comportamientos representa la presencia de un intermediario enzima-derivatizante reversible, previo a la formación del complejo covalente de la enzima y el DTNB (Eyzaguirre, 1987); la k_2 calculada fue de $43.4 \pm 0.03 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

5.4 Fluorescencia Intrínseca de la GITIM.

Hemos demostrado con los resultados anteriores que un blanco para la inactivación de la GITIM es la Cys 222, sin embargo, el mecanismo por el cuál se lleva a cabo no queda claro. Al respecto en una publicación previa, algunos de nuestros resultados nos sugirieron una posibilidad para descifrar parte del mecanismo de inactivación; en dicho estudio se observó como la derivatización de la GITIM afectó la región catalítica (Enríquez-Flores y cols., 2008). En ese trabajo se evaluó la probable modificación en los parámetros cinéticos cuando la GITIM está al máximo de inactivación con los derivatizantes MMTS y MTSCE que producen un 50 y 97 % de inactivación respectivamente. En los resultados se demostró que con MMTS, el valor de la K_m se preservó, mientras que la k_{cat} disminuyó a la mitad respecto a la enzima sin derivatizar. En contraste, la derivatización con MTSCE aumentó 10 veces la K_m y disminuyó significativamente la k_{cat} . Cabe mencionar que estos parámetros cinéticos no se pudieron obtener en la enzima con DTNB, debido a que la inactivación es total y además se produce un efecto de disociación de la enzima (Enríquez-Flores y cols., 2008). Con esta evidencia sugerimos que la derivatización afecta a 2 niveles: la afinidad por el sustrato y la catálisis. Por tanto y, con la intención de probar esta hipótesis, se siguieron los cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca de la GITIM para determinar la constante de disociación (K_D) del análogo de sustrato 2-PG. Se ensayaron

3 condiciones en las enzimas GITIM silvestre y GITIM-C222A (mutante resistente a la inactivación promovida con las sondas): *i*) sin derivatizar, *ii*) derivatizadas con MMTS y *iii*) derivatizadas con MTSCE. Primero se registró el espectro de emisión de fluorescencia de las enzimas entre 310 a 500 nm, excitando a 295 nm y en ausencia de 2-PG. Posteriormente, se adicionaron concentraciones crecientes del 2-PG y se registraron los espectros de emisión, en la Figura 9 se observan los resultados.

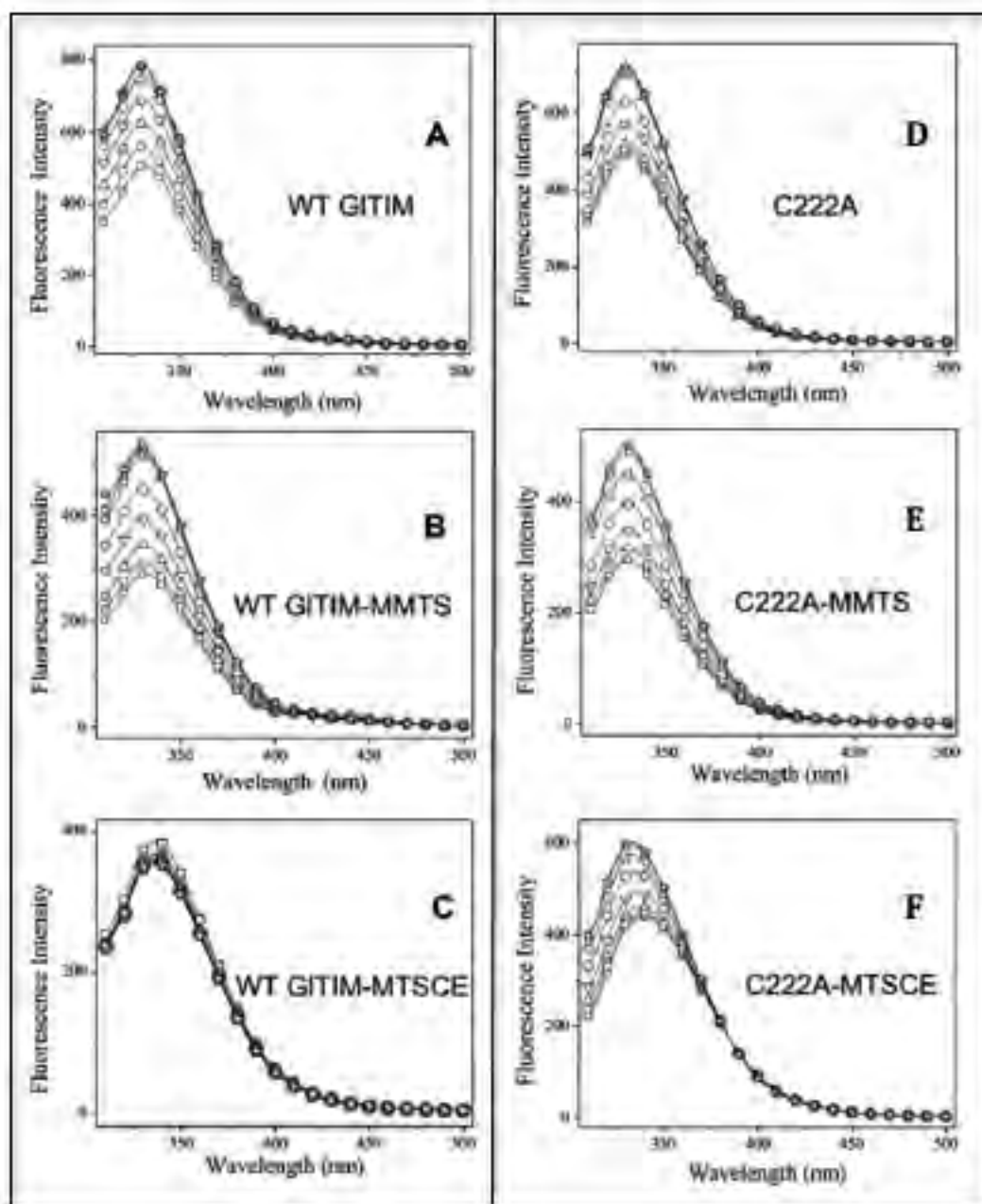


Figura 9. Espectros de emisión de fluorescencia, de la titulación con 2-PG en la GITIM silvestre (A-C) y la GITIM C222A (E-G), en sus formas sin derivatizar, derivatizada con MMTS ó con MTSCE. Las condiciones experimentales se describen en material y métodos. Para mayor claridad sólo se graficaron algunas concentraciones de 2-PG: 0 μM (\square), 20 μM (\circ), 50 μM (\triangle), 100 μM (∇), 2000 μM (\diamond), 500 μM (\triangleleft), 800 μM (\triangleright) y 1000 μM (\star).

Como se muestra, la Figura 9 (paneles A y B), en los espectros de emisión de fluorescencia, la señal máxima fue aumentando conforme se adicionaron concentraciones crecientes del 2-PG. Es decir, la presencia de este ligando promueve en la GITIM silvestre y la GITIM-MMTS el aumento en la intensidad de su fluorescencia. La GITIM tiene 4 residuos de triptofano (Trp), previamente se reportó que en condiciones nativas y sin ligando, algunos de estos residuos están apagados (no emiten fluorescencia como respuesta a una señal de excitación a 290 nm), sin embargo si la enzima se desnaturaliza en presencia de SDS, la intensidad máxima en los espectros de emisión de fluorescencia aumenta significativamente (Hernández-Alcántara y cols., 2008). Nuestros resultados demuestran que la GITIM nativa y la derivatizada con MMTS en presencia del 2-PG, la señal de fluorescencia aumenta significativamente al añadir concentraciones crecientes del ligando, hasta llegar a un máximo de saturación, donde ya no hubo incremento en dicha señal. En contraste en el panel C de la Figura 9, los espectros de emisión de fluorescencia de la GITIM silvestre derivatizada con MTSCE, no se modificaron significativamente al adicionar el ligando. Esta enzima tiene una actividad de 3 % en relación a la silvestre y como reportamos previamente, sus parámetros cinéticos están alterados significativamente (Enríquez-Flores y cols., 2008). Por tanto y tomando en conjunto estos resultados, sugerimos que la enzima derivatizada con MTSCE es incapaz de unir al ligando.

Por otra parte en la Figura 9 (paneles D, E y F), se observa que los espectros de emisión de fluorescencia de la GITIM-C222A aumentaron su intensidad al adicionar 2-PG. Interesantemente a diferencia de la GITIM silvestre derivatizada con MTSCE, en la GITIM-C222A derivatizada con la misma sonda, los espectros de emisión de fluorescencia incrementaron su señal conforme se adicionó el ligando (Figura 9, panel F). Por lo que aunque se derivatizen otras Cys en esta enzima, la enzima responde a la adición del ligando aumentando su señal de fluorescencia en cada espectro, mostrando un comportamiento similar a la silvestre. Finalmente, en todos los casos la intensidad máxima de los espectros de emisión de fluorescencia, se registró a 332 nm; excepto la GITIM-C222A derivatizada con MTSCE (panel F), donde la intensidad máxima se recorrió 4 nm hacia el rojo, sin embargo conforme se añadió el 2-PG este valor se normalizó llegando a 332 nm.

Con estos resultados, se tomó el valor máximo de intensidad de fluorescencia de cada espectro de emisión, se normalizaron las intensidades y se graficaron en función de la concentración del 2-PG, Figura 10.

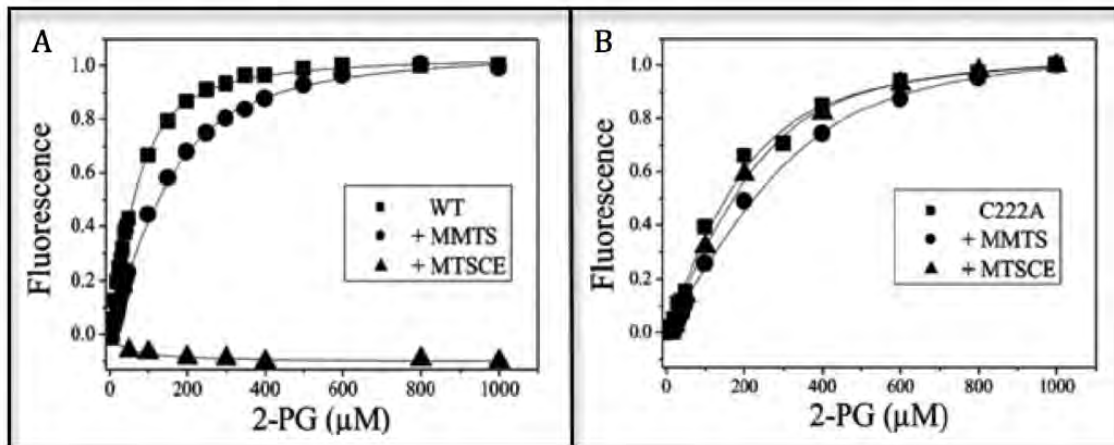


Figura 10. Titulación fluorométrica de la unión de 2-PG a la GITIM silvestre y a la GITIM C222A. Se tomaron los valores de máxima intensidad de fluorescencia de cada espectro de la Fig. 9 y se graficaron vs la concentración de 2-PG; panel A GITIM silvestre, panel B GITIM C222A. Los trazos corresponden al ajuste de los datos a la ecuación 2 (excepto la GITIM silvestre +MTSCE, panel A).

En la Figura 10, se observa en el panel A, que tanto la GITIM silvestre sin derivatizar como la derivatizada con MMTS, la señal máxima de fluorescencia de cada espectro fue incrementándose rápidamente conforme se añadió el 2-PG, hasta llegar a un punto de saturación, donde ya no hubo respuesta por parte de las enzimas. En contraste, en la enzima derivatizada con MTSCE no se obtuvo respuesta en la señal de la fluorescencia, en ninguna de las concentraciones usadas del ligando. En el panel B de la Figura 10 se observa el comportamiento en el aumento de la fluorescencia de la GITIM-C222A. En esa enzima a diferencia de la silvestre, en las 3 condiciones se incrementó la señal de fluorescencia conforme se fue titulando el 2-PG, hasta llegar a un máximo de saturación de la señal. Así, en la GITIM C222A derivatizada con MTSCE (sonda que afecta significativamente la región catalítica en la GITIM silvestre), hay incremento en la señal de fluorescencia en presencia del 2-PG.

Posteriormente los trazos de la Figura 10 se ajustaron a la ecuación 2 (ver sección 4.6) para obtener la K_D , el Cuadro 4 indica el valor calculado para cada enzima.

ENZIMA	K_D (μM)
GITIM silvestre	27.2 ± 3.9
+ MMTS	57.8 ± 9.6
+ MTSCE	NA*
GITIM-C222A	52.0 ± 8.2
+ MMTS	70.4 ± 6.5
+ MTSCE	61.7 ± 6.8

Cuadro 4. K_D de la GITIM y su mutante GITIM-C222A. Las GITIM se incubaron solas ó en presencia del inactivador. Los resultados son un promedio de 3 experimentos \pm desviación estándar. NA* no se ajustó a la ecuación.

Como se observa en el Cuadro 4, la K_D de la GITIM silvestre fue de 27 μM , mientras que el valor de la K_D de esta enzima derivatizada con MMTS se incrementó al doble, por tanto se sugiere que la afinidad disminuyó ligeramente en esta condición. Con MTSCE no se registró cambio en la fluorescencia y, por tanto, no se logró ajustar a la ecuación 2; Por lo que se sugiere que en esa condición es probable que la enzima no pueda unir el 2-PG. En contraste, la GITIM-C222A tuvo una K_D de 52 μM , este valor es el doble que el valor obtenido en la GITIM silvestre. A ese respecto, es probable que la mutación de Cys por Ala haya producido ese ligero incremento por lo que la enzima tiene una ligera menor afinidad por el ligando que la silvestre; este resultado es consistente con lo obtenido en los parámetros catalíticos (Cuadro 2), donde la K_m de esta enzima aumentó al doble. En esta misma mutante pero derivatizada con MMTS, se incrementó el valor de su K_D aunque fue mínima la variación. Muy notablemente y a diferencia de la GITIM silvestre, la GITIM-C222A derivatizada con MTSCE la señal de fluorescencia incrementó en respuesta a la adición de 2-PG, hasta llegar a la saturación. La K_D obtenida fue ligeramente mayor que su correspondiente control. Por tanto sugerimos que la GITIM-C222A derivatizada con MTSCE sigue uniéndose al 2-PG, a pesar de estar derivatizada en residuos de Cys diferentes a la 222 (Cuadro 3).

5.5 Calorimetría de titulación isotérmica en la GITIM.

Basándonos en los resultados anteriores, sugerimos que al derivatizar la GITIM en la Cys 222, se altera significativamente la afinidad por su sustrato. Sin embargo, los

parámetros de K_D obtenidos por fluorescencia son valores que provienen de una observación indirecta y existe la posibilidad de que no represente con precisión el fenómeno que se describe. Por lo anterior y con la intención de evaluar directamente la K_D , se realizaron ensayos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Esta técnica mide de forma directa la liberación ó absorción de calor producido por la unión de un ligando por su enzima.

Evaluamos los parámetros termodinámicos en la GITIM silvestre sin derivatizar y derivatizada con MMTS ó MTSCE; el ITC detectó el calor liberado al adicionar el 2-PG en dos de las tres condiciones de enzima (Figura 11 paneles A, B respectivamente). Así, tanto en la enzima sin derivatizar como en la derivatizada con MMTS, se indujo liberación de calor con la adición del ligando, ambas con isothermas similares. En contraste y de manera muy interesantemente, en la derivatizada con MTSCE se obtuvieron isothermas planas, por lo que no se promovieron cambios de calor detectables en esta condición experimental (Figura 11 panel C).

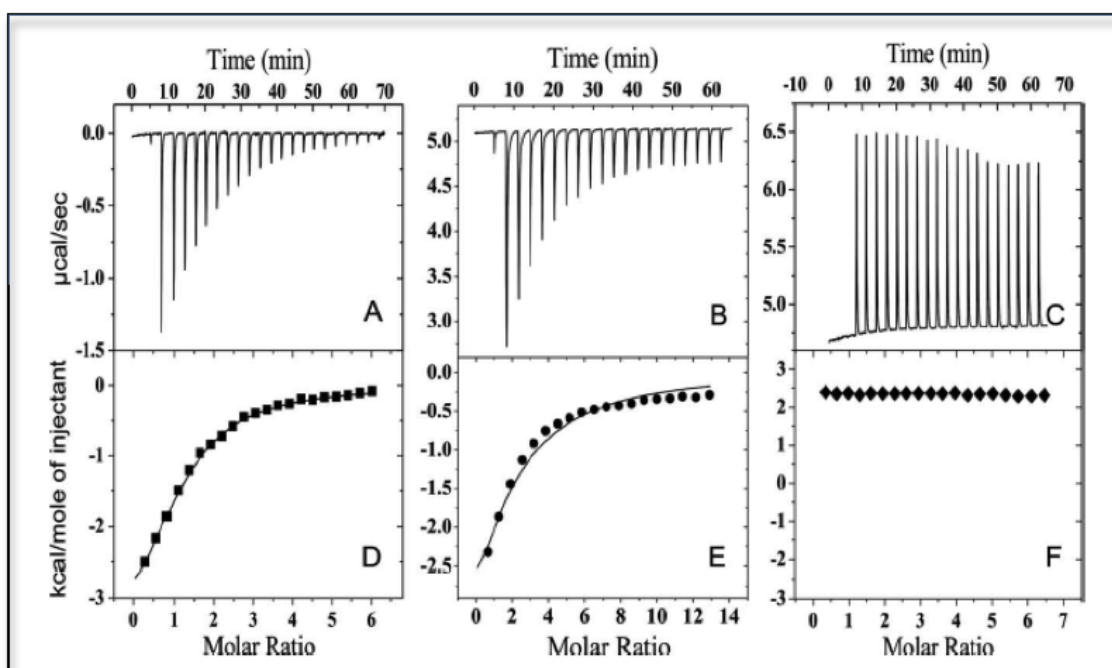


Figura 11. Calorimetría de titulación isotérmica para la unión de 2-PG a la GITIM silvestre. Los termogramas corresponden a la unión del 2-PG a la enzimas sin derivatizar (panel A), derivatizada con MMTS (panel B) ó derivatizada con MTSCE (panel C). Titulación isotérmica obtenida de los termogramas: no derivatizada (panel C), derivatizada con MMTS (panel E), derivatizada con MTSCE (panel F). El calor de dilución fue sustraído en todos los casos y los datos fueron ajustados a un modelo de 1 ligando por subunidad (González-Mondragón y cols., 2004).

El cambio de calor registrado en el termograma fue disminuyendo a medida que incrementó la concentración de 2-PG, los paneles D, E y F de la Figura 11 muestran las

isotermas de unión, después de sustraerles el calor de dilución. Los trazos de los paneles D y E corresponden al ajuste de los datos, mientras que en el panel F no hubo liberación de calor y en consecuencia los datos no fueron ajustados. El Cuadro 5 muestra los valores termodinámicos obtenidos a partir de los datos calorimétricos.

GLTIM	No. de sitios	K_D (μM)	ΔH (kcal mol^{-1})	$-T\Delta S$ (kcal mol^{-1})	ΔG (kcal mol^{-1})
- MMTS	0.91 ± 0.04	53	-7.41 ± 0.15	1.48	-5.93
+ MMTS	0.9 ± 0.01	80	-9.2 ± 0.23	3.6	-5.6

Cuadro 5. Parámetros termodinámicos obtenidos del ITC. Los valores son el promedio de 2 experimentos independientes. Estos parámetros fueron calculados como se describió previamente.

Como se puede observar en el Cuadro anterior, la K_D de calorimetría fue de $53 \mu\text{M}$ a diferencia de la obtenida por fluorescencia que fue de $27 \mu\text{M}$, sin embargo cuando está derivatizada con MMTS este valor aumentó ligeramente a $80 \mu\text{M}$. Por tanto como lo demuestra la calorimetría en estas condiciones la enzima sigue uniéndose al ligando. En la condición con MTSCE no se registró liberación de calor; por lo que no hubo unión entre el ligando y la enzima. Así, con base en lo anteriormente expuesto, se demuestra que la derivatización en la GITIM con MTSCE se induce la pérdida total de la afinidad por el 2-PG.

5.6 Estructura cristalográfica de la mutante GITIM-C202A derivatizada con MMTS.

Con el objetivo de obtener información a nivel atómico de los mecanismos de inactivación por derivatización de la Cys 222 de la GITIM, se cristalizó la GITIM-C202A en presencia de los derivatizantes de Cys MMTS, MTSCE y DTNB. Esta mutante se empleó debido a que la sustitución aminoácil permite tener únicamente especies diméricas (Reyes-Vivas y cols., 2007). En los ensayos se consideró cristalizar a esta enzima con los derivatizantes más potentes para inactivar a la GITIM: MTSCE ó DTNB, compuestos que disminuyen la actividad en un 97 y 100 %, respectivamente. Desafortunadamente y a pesar de varios intentos, no se lograron obtener co-cristales. Otra estrategia empleada fue cristalizar la enzima y posteriormente añadir los derivatizantes a los cristales formados (técnica denominada soaking). Los intentos con MTSCE y DTNB provocaron la fragmentación de dichos cristales impidiendo su preparación para experimentos de difracción. En contraste, los cristales que se les

adicionó MMTS no presentaron fragmentación, permitiendo su uso para experimentos de difracción. Después de coleccionar los datos de difracción, estos se procesaron; se construyó el modelo y se refinó la estructura cristalográfica como se mencionó previamente, el Cuadro 6 resume los valores obtenidos de la estructura resuelta.

Parámetro	GITIM-C202A-MMTS
Grupo espacial	I222
Moléculas por unidad asimétrica	1
Dimensiones de la celda	a = 56.37, b = 102.88, c = 118.91
Resolución Å	2.1
Completeness	96.7 %
R _{work} (%)	18.35
R _{free} (%)	21.1
Factor B promedio Å ²	32.38
Gráfica de Ramachandran	Permitidas 99.1 % No permitidas 0.9 %

Cuadro 6. Resumen de los parámetros estadísticos de la estructura cristalográfica de GITIM MMTS 3PF3.

Una vez refinada la estructura de la GITIM-C202A con MMTS que se resolvió a 2.1 Å, se realizó un alineamiento estructural (Sumathi y cols., 2006) contra la GITIM-C202A código PDB: 2DP3, con el propósito de compararlas geoméricamente. Se calculó la raíz de la desviación cuadrática media del carbono alfa (RMSD) obteniendo una RMSD de 0.37 Å; por lo que globalmente a nivel de la cadena principal no se observaron diferencias significativas, Figura 12.

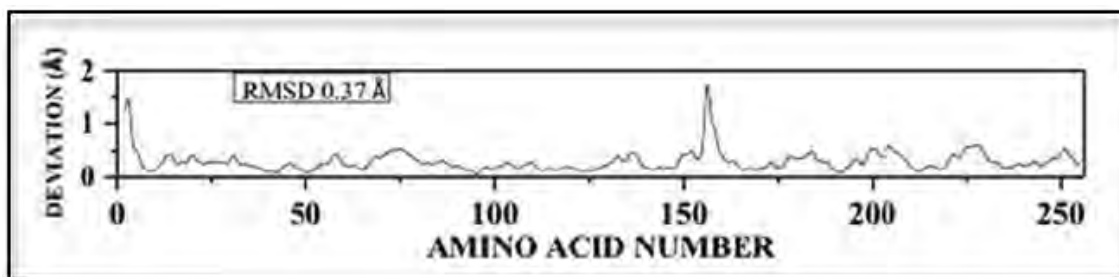


Figura 12. Gráfica del RMSD del C α de la superposición entre las estructuras cristalográficas GITIM (2DP3) y GITIM MMTS (3PF3).

Por otro lado, en la estructura cristalográfica se identificaron a las Cys 14, 222 y 228

con densidad electrónica correspondiente a un aducto tiometilo (S-CH₃). Sin embargo la Cys 127 no presentó densidad electrónica de ese aducto.

Haciendo un intento por identificar regiones específicas de la enzima que hubieran sido modificadas en esta estructura, se revisaron las distancias que hay entre los residuos de aminoácido cercanos a la Cys 222. Sin embargo, no se identificó variación que pudiera explicar los parámetros cinéticos alterados en esta enzima. Cabe recordar que, de las sondas aquí mencionadas, sólo con el MMTS se afecta marginalmente dicha afinidad, mientras que con el MTSCE y DTNB se inactiva la GITIM casi y totalmente respectivamente. Aunado a lo anterior, la estructura cristalográfica revela la presencia de una molécula de sulfato en la región catalítica; el asa 6 (también denominada asa "catalítica") se identificó en conformación cerrada. Al respecto, se ha documentado que en presencia de ligando, en la TIM se favorece la conformación cerrada del asa 6 (Kursula y cols., 2004), compactando la conformación nativa, por lo que probablemente en esas condiciones los cambios promovidos por la derivatización con MMTS, se ocultaron.

En contraste, se identificaron algunos cambios importantes en la periferia de la Cys 14 derivatizada, particularmente en el asa 3 (residuos aminoácidos Asn 66 a Ser 80) que rodea a la Cys y que pertenece a la subunidad adyacente, (monómero construido por simetría cristalográfica con COOT (Emsley y Cowtan, 2004). Esta Cys derivatizada se localizó orientada hacia los residuos Tyr 68, Leu 69, y Glu 70 de dicha asa 3 Figura 13.

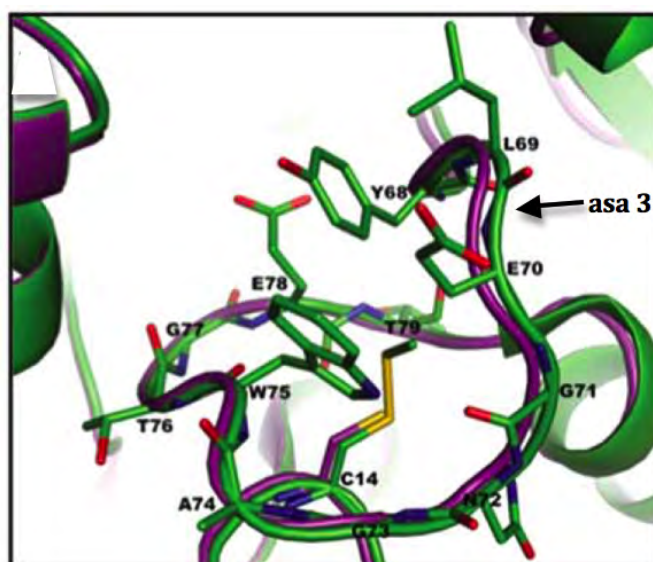


Figura 13. Representación en listones de los aminoácidos que están a 5 Å a la redonda de la Cys 14 derivatizada. Se superpusieron las estructuras 2DP3 (morado) vs 3PF3 (verde) y se construyó por simetría cristalográfica la subunidad complementaria donde se representa el asa 3 y sus aminoácidos. La figura se preparó con PyMOL.

Es importante mencionar que esta región aumentó su volumen en presencia de la Cys 14 derivatizada. Lo anterior se evidenció al determinar las dimensiones de la cavidad al interior del asa 3 (Dundas y cols., 2006), las cuales fueron de 94.7 \AA^3 y 122.7 \AA^3 , en la GITIM sin derivatizar (PDB 2DP3) y derivatizada (PDB 3PF3), respectivamente.

6 DISCUSIÓN.

6.1 Orden de derivatización de las Cys en la GITIM.

Nuestros datos de proteólisis y visualización en geles SDS-PAGE indicaron que se obtuvieron péptidos de distinto peso molecular, dentro de los cuales potencialmente podríamos identificar los que llevan en su secuencia de aminoácidos las Cys 222 ó 228. Sin embargo, con los resultados de espectrometría de masas no se pudo definir el enriquecimiento de estos péptidos en relación a la cuantificación de Cys, por lo que fue imposible identificar el orden de derivatización para las Cys 222 y 228.

No obstante se puede mencionar que de las cinco Cys, la 202 es la más expuesta al solvente (40 % de accesibilidad al solvente), además contribuye a la formación de oligómeros mayores al dímero por formación de puente disulfuro con otra Cys 202 (Reyes-Vivas y cols., 2007). Con base en lo anterior, sugerimos que la Cys 202 es la primera en derivatizarse con las sondas empleadas. Por otro lado, experimentos para demostrar la disociación de la GITIM con el DTNB indicaron que sólo al derivatizarse la cuarta Cys se lograba su disociación. Sin embargo, en la mutante sencilla GITIM-C14A este efecto no se observó a pesar de derivatizarla exhaustivamente (Reyes-Vivas y cols., 2007); por tanto, es necesaria la modificación química de esta Cys para lograr disociar a la enzima; este efecto se obtiene sólo hasta derivatizar la cuarta Cys. Por tanto, estos datos indican que la cuarta Cys en derivatizarse es la 14. En conclusión, en el orden de derivatización la primera y la cuarta son las Cys 202 y 14, respectivamente. De las Cys 222 y 228, queda sin aclarar su orden de modificación. A este respecto es recomendable el empleo de una metodología cuantitativa, capaz de enriquecer las poblaciones de péptidos sin derivatizar y derivatizados, provenientes de la proteólisis de la GITIM. Una posibilidad es la técnica de ionización por electrospray, que se utiliza en la espectrometría de masas. La ventaja de emplear esta técnica es que se puede acoplar a la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), por lo que sería posible cuantificar el enriquecimiento de los péptidos y en consecuencia cual de las Cys es la segunda y tercera en derivatizarse.

6.2 La Cys 222 de GITIM es un buen blanco farmacológico.

La derivatización de Cys es una herramienta útil para identificar en las proteínas regiones para el diseño de compuestos con potencial farmacológico. Previamente, algunos investigadores propusieron a la interfaz de TIM's de parásitos como TbTIM, TcTIM, la TIM de *Leishmania mexicana* (LmTIM) ó la TIM de *Entamoeba histolytica* (EhTIM) (Gómez-Puyou y cols., 1995; Ostoa-Saloma y cols., 1997; Garza-Ramos y cols., 1997; Rodríguez-Romero y cols., 2002), como potenciales blancos para el diseño de fármacos. Basándose en el uso de derivatizantes, se ha identificado a la Cys 14 localizada en la región de contacto entre las 2 subunidades que conforman la unidad dimérica funcional. Interesantemente, y en contraste a dichas publicaciones, nuestros resultados son el primer reporte donde se demuestra que el blanco de compuestos en la GITIM es la región de la Cys 222; aunque este residuo se localiza a 20 Å de la zona catalítica, cuando se aloja un tiocarboxietilo (MTSCE) ó tionitro benzoato (DTNB) se transmite un efecto fuertemente desfavorable hacia el sitio catalítico disminuyendo su afinidad y catálisis. También demostramos que, a pesar de que otras Cys se tioalquilan, sólo la derivatización de la Cys 222 produce el efecto de inactivación. A diferencia de la TbTIM, TcTIM, LmTIM y EhTIM donde la derivatización de la Cys 14 inactiva y después disocia, nuestros resultados indican que en la GITIM, el DTNB primero se ajusta a la región que rodea a la Cys 222 y, posteriormente, se tioalquila transmitiendo un cambio conformacional local que induce la inactivación de la enzima. Adicionalmente, si se expone por más tiempo, esta sonda también accede a la Cys 14, provocando disociación de la enzima (Enríquez-Flores y cols., 2008); sin embargo, éste es un evento posterior a la inactivación. Cabe mencionar que otros trabajos también demostraron que aunque se derivatizen otras Cys, por ejemplo, en TcTIM las Cys 117 y potencialmente la 40 (Garza-Ramos y cols., 1998), sólo la modificación química de la Cys 14 conduce a la pérdida de la actividad y disociación de la enzima. Por tanto, el derivatizar cualquier residuo de Cys en las TIM's no garantiza inactivación y/o desestabilización estructural.

Por otro lado, es importante mencionar que en ensayos con la HuTIM se demostró que es casi 200 veces más resistente a los derivatizantes que la GITIM. Para el caso de la HuTIM, probablemente la Cys 217 es el blanco de los derivatizantes (Garza-Ramos y cols., 1996); es importante mencionar que este residuo aminoacil es estructuralmente equivalente a la Cys 222 de GITIM. Por tanto, nuestros datos indican que la región de la Cys 222 es un potencial blanco farmacológico específico de especie.

6.3 La derivatización de la Cys 222 de GITIM perturba la unión de su ligando.

Algunos estudios que explican cómo se estabiliza en la TIM su sustrato, postulan que el grupo fosfato del GAP realiza funciones de anclaje molecular (Christophe y cols., 1992). Cuando este sustrato se coloca en el sitio catalítico, se llevan a cabo interacciones débiles pero importantes con la enzima. Por ejemplo, se ha reportado para la TIM de *Plasmodium falciparum* que interaccionan el O-gama de la Ser 211 con el O1 del fosfato del GAP (Parthasarathy y cols., 2003). En otro trabajo realizado sobre la estructura cristalográfica de la TbTIM, se reportó que el N de la Ser 211 forma un puente de hidrógeno con el O del grupo fosfato del GAP (Noble y cols., 1993). Además de estas interacciones, existen otras donde intervienen moléculas de agua, (Kursula y cols., 2004) que median contactos entre los oxígenos del grupo fosfato del ligando y cadenas laterales de aminoácidos.

En la estructura de la GITIM-C202A derivatizada con MMTS y, debido a que reveló una molécula de sulfato en la región catalítica, se revisaron todos los contactos con el grupo fosfato. Dichos contactos se mantienen en condiciones similares a los reportes de otras TIM's. Además la presencia de sulfato en esta región, como ya se mencionó puede estar compactando la estructura de la proteína, por lo que los cambios que pudiera haber ocasionado el MMTS, se ocultaron debido a dicha compactación. Por tanto, sería de utilidad resolver la estructura de esta enzima derivatizada con MMTS en ausencia de sulfatos.

Entonces ¿cómo se relaciona la derivatización de la Cys 222 y la alteración del sitio catalítico? En un trabajo realizado por Reyes-Vivas y colaboradores (2007) se propuso cuáles podrían ser las perturbaciones cuando se altera el medio ambiente de la Cys 222. En ese trabajo, se planteó la posibilidad de que las Cys 222 y 228 de la GITIM formaran un puente disulfuro intracatenario. Los datos experimentales que apoyaban esta hipótesis eran que después de un tiempo de almacenamiento, la actividad de la GITIM disminuía un 50% y el número de Cys libres se reducía a 3 por subunidad, perdiéndose 2 Cys. Cuando se adicionaba DTT al medio, la actividad y número de Cys se mantenían normales. Al revisar la estructura cristalográfica (PDB 2DP3) se observó que las Cys 222 y 228 están relativamente cercanas y se sugirió que posiblemente ambas formaran un puente disulfuro. Por lo que se aprovechó esta estructura cristalográfica y se realizó una dinámica molecular con el propósito de evidenciar probables cambios promovidos por la formación de dicho puente disulfuro y que explicaran la modificación de los parámetros cinéticos en la enzima con 3 Cys/subunidad. La dinámica molecular reveló

que la Ser 216 se desplazó 4.6 Å de su posición original causando pérdida de puentes de hidrógeno con residuos del asa catalítica. Además, aminoácidos adyacentes pertenecientes al motivo altamente conservado Tyr-Gly-Gly-Ser, también se afectaron con la formación del puente entre ambas Cys. Es importante mencionar que se ha reportado que dicho motivo participa activamente en la fijación del sustrato (Wang Y. y cols., 2009). La dinámica molecular sugirió que al perturbarse estructuralmente la región de la Cys 222, se afectarían regiones vecinas estructuralmente que interactúan con el sustrato, provocando la modificación de la arquitectura del sitio catalítico.

Con base en lo expuesto anteriormente y a lo demostrado en este trabajo, proponemos que la derivatización de la Cys 222 por las sondas fuertemente inactivantes: el MTSCE ó DTNB, se promueven modificaciones estructurales importantes en el motivo conservado Tyr-Gly-Gly-Ser que participa en la fijación del sustrato.

Por otro lado, nuestros datos de fluorescencia intrínseca sugieren que la GITIM pierde completamente la afinidad por el sustrato al derivatizarse con MTSCE, mientras que con MMTS el cambio de afinidad es mínimo. En concordancia, los experimentos de ITC también mostraron que el MTSCE conduce a la pérdida de la afinidad por el sustrato, mientras que con MMTS la perturbación es marginal. Una explicación de las diferencias de inactivación entre los derivatizantes puede ser la diferencia en el tamaño de los aductos que se generan en la Cys 222, ó bien, la carga que presentan éstos, ó ambos (Enríquez-Flores y cols., 2008). En principio, el hecho de que se acomode en la cavidad cercana a la Cys 222 una molécula de tamaño relativamente "pequeño" y además neutra (MMTS), afectaría en menor magnitud que si se aloja otra de mayores dimensiones y con carga neta negativa ó positiva (MTSCE ó DTNB).

6.4 La estructura cristalográfica de GITIM-MMTS evidenció cambios importantes en la Cys 14.

En la revisión detallada de la estructura cristalográfica de la GITIM-MMTS y comparada con la nativa (PBD 2DP3) no se identificaron diferencias estructurales importantes entre ambas estructuras cristalográficas, que nos ayudaran a explicar el mecanismo de inactivación. Probablemente debido a que sólo se adicionan 43 Å³ (por el MMTS) dimensiones relativamente pequeñas, y a la presencia de sulfato en el sitio catalítico.

A este respecto y con el propósito de obtener las estructuras cristalográficas de las sondas de mayores dimensiones y con carga negativa, se remojaron cristales de la

GITIM C202A con las sondas MTSCE y DTNB. Sin embargo, a pesar de múltiples intentos, no se tuvo éxito en este objetivo y en todos los casos los cristales se fragmentaron después de pocas horas de añadir el derivatizante. Además, esos experimentos se realizaron a concentraciones saturantes y muy probablemente se derivatizó más de una Cys, por lo que modificar tanto la 222 como otras Cys, podría afectar en mayor magnitud la estructura de la GITIM.

Por otra parte, aunque en la estructura de la GITIM-MMTS no se evidenciaron cambios en la región de las Cys 222 y 228, si se identificaron algunas diferencias en la región de la Cys 14. Como ya se mencionó, esta Cys se identificó con densidad electrónica que corresponde al aducto del MMTS (grupo tiometilo). Interesantemente la cavidad que se forma en la estructura sin derivatizar es de 94.7 \AA^3 , mientras que en la derivatizada es de 122.7 \AA^3 . Por tanto esta cavidad tolera la presencia de un grupo de estas dimensiones. Por el contrario en la TbTIM, TcTIM, LmTIM y la EhTIM que tienen cavidades de menores dimensiones, se ha demostrado que al derivatizarse con MMTS se produce su disociación e inactivación (Gómez-Puyou y cols., 1995; Ostoa-Saloma y cols., 1997; Garza-Ramos y cols., 1997; Rodríguez-Romero y cols., 2002). Además, hemos demostrado que la GITIM no se disocia al derivatizar su Cys 14 con MMTS ó MTSCE (Enríquez-Flores y cols., 2008). Por tanto lo anterior nos indica que el asa 3 de la GITIM presenta gran flexibilidad conformacional para lograr acomodar un volumen extra de 43 a 85 \AA^3 sin provocar su disociación.

7. CONCLUSIONES.

En conclusión, los resultados expuestos representan una oportunidad de considerar un blanco farmacológico en *Giardia*, donde se caracteriza una enzima de considerable importancia biológica y médica.

Se describe un nuevo mecanismo para inactivar a la GITIM que involucra la perturbación de la afinidad por el sustrato, como una consecuencia de la derivatización de la Cys 222.

El medio-ambiente que rodea este residuo tiene características estructurales diferenciales que pueden ser explotadas para el diseño de compuestos especie-específicos con potencial farmacológico.

Probablemente el mecanismo de inactivación promovido por los derivatizantes sea a través del motivo conservado Tyr-Gly-Gly-Ser.

Aunque la Cys 222 tolera un grupo tioalquil de 43 \AA^3 (MMTS) donde se modifica

marginalmente la catálisis, la adición de grupos mayores a esas dimensiones y con carga negativa ó positiva, provoca fuertes cambios en la capacidad de la enzima de unir su sustrato.

La cavidad de la Cys 14 es flexible y tolera grupos de 43 a 85 Å³ con carga neta positiva, sin disociarse (MMTS y MTSCE respectivamente), a diferencia de las TIMs de algunos parásitos donde la adición de 43 Å³ a esta Cys provoca su disociación.

Una aproximación a la posibilidad de descifrar el mecanismo molecular de inactivación, es sustituir la Cys 222 por otros residuos de aminoácidos que "imiten" la derivatización y, en consecuencia sus efectos en la GITIM.

Actualmente se está trabajando en ese objetivo y en esta tesis se adiciona un anexo de dicho manuscrito (ver más adelante).

8. PERSPECTIVAS.

Con la identificación de la región de la Cys 222 de la GITIM como potencial blanco farmacológico, se pueden modelar (aprovechando su estructura cristalográfica) moléculas que sean afines a la zona y sintetizar compuestos derivados de dichos modelajes.

Considerando que en la GITIM se promueve inactivación diferencial con los derivatizantes MMTS, MTSCE y DTNB; se puede explorar con mutaciones en la posición 222 por distintos aminoácidos, los efectos de adicionar volumen, polaridad, carga neta negativa o positiva.

Alguno fármacos que derivatizan Cys puedan utilizarse en la GITIM y comprobar su efecto en la enzima silvestre, así como en las mutantes utilizadas en este trabajo. En ese, sentido el omeprazol que es un fármaco ampliamente utilizado para controlar la gastritis humana sería un buen candidato anti-GITIM.

9. REFERENCIAS

Álvarez T, Alfonso L, Gómez AH. 1994. Extracto de *Giardia lamblia* (giardina) su mecanismo inmunológico. *Allergol Et Immunopathol*; **22**: 155-60.

Ali SA, Hill DR. *Giardia intestinalis*. 2003. *Curr Opin Infect Dis*.**16**: 453-460.

Ortega Y. y Adam R. D. 1997. *Clin Infect Dis*. **25**: 545-549.

Quevedo, F. Michaine, S. Gonzáles, S. 1990. Actualización de enfermedades transmitidas por alimentos. Washington, D.C.; OPS. 25p.

Botero, D. y Restrepo, M. 1998. Giardiasis. *Parasitosis humana*, 3ra. ed., Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas, pp. 61-67.

SINAVE 2005, SSA. SINAVE 2005:

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/sinave/index.html>

Cedillo-Rivera R, Leal Y, Yépez-Mulia L, Gomez-Delgado A, Ortega-Pierres G, Tapia-Conyer R, Muñoz O. 2009. Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. **80**: 6-10.

Quihui-Cota L, Astiazarán-García H, Valencia M, Morales-Figueroa G, Lopez-Mata MA, Vázquez Ortiz F. 2008. Impact of *Giardia intestinalis* on vitamin a status in schoolchildren from northwest Mexico. *Int J Vitam Nutr Res*. **78**: 51-56.

Upcroft J, Upcroft P. 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol Today*; **9**: 187–190.

Zaat JO, Mank T, Assendelft WJ. 2000. Drugs for treating giardiasis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD000217.

Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev*. **14**: 447-475.

Jiménez-García LF, Zavala G, Chávez-Munguía B, Ramos-Godínez M, López-Velázquez G, Segura-Valdez M, Montañez C, Hehl A, Argüello-García R, Ortega-Pierres G. 2008. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *Int J Parasitol.* **38**: 1297-1304.

Tovar J, León-Avila G, Sánchez L, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernandez M, Müller M, Lucocq J. 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature.* **426**: 172-176.

Martínez, M. 1982. Las parasitosis humanas. *Manual de Parasitología Médica*. 2da. ed., México: Prensa Médica Mexicana, PMMSA, pp. 15-23.

Brandonisio, O. Waterborne transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Parassitología*. 2006. Italia: Universidad de Roma y *Periódico oficial de la sociedad Aitaliana de parasitología*, 48, **1-2**: 91-94.

Quinn, C. 1986. Síndrome intestinal del homosexual. *Tribuna Médica.* **41**: 7-10.

Katarina R, Daniel P, David R, Emma R, y Staffan G. Svärd. 2006. *Giardia* immunity an update. *TRENDS Parasitol.* **22**: 211-217.

Pope-Delatorre H, Das S, Irwin LN. 2005. Uptake of [3H]-gangliosides by an intestinal protozoan, *Giardia lamblia*. *Parasitol Res.* **96**: 102-106.

Buret, A, Gall D, Olson M. 1991. Growth activities of enzymes in the small intestine and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. *Parasitol, Res.* **77**: 109-114.

Farthing, J. 1983. *Giardia lamblia*. Mecanismos de colonización y patogénesis en la enfermedad diarreica. *Revista de Infectología Mexicana*, México, no. 2, pp. 79-74.

Jarroll, E. L., Macechko, P. T., Steimle, P. A., Bulik, D., Karr, C. D., van Keulen, H., Paget, T. A., Gerwig, G., Kamerling, J., Vliegenthart, J., y Erlandsen, S. 2001. Regulation of carbohydrate metabolism during *Giardia* encystment. *J Eukaryot*

Microbiol **48**: 22-26.

Smith P, Gillin F, Spira W, Nash T. 1982. Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. *Gastroenterology* **83**: 797–803.

Ali V, y Nozaki T. 2007. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. 2007. *Clin Microbiol Rev.* **20**: 164-187.

Crouch, A. A., W. K. Seow, L. M. Whitman, S. E. Smith, and Y. H. Thong. 1991. Inhibition of adherence of *Giardia intestinalis* by human neutrophils and monocytes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**: 375–379.

Eckmann, L. 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol.* **25**: 259–270.

Eckmann L, Laurent F, Langford T, Hetsko M, Smith J, Kagnoff M, Gillin F. 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J. Immunol.* **164**: 1478–1487.

Krause, K.H. 2004. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *J. Infect. Dis.* **57**: S28–S29.

Hill, D. y Pearson, R. 1987. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* **55**: 3155–3161.

Andersen Yolanda S, Frances D, Gillin, y Lars Eckmann. 2006. Adaptive Immunity-Dependent Intestinal Hypermotility Contributes to Host Defense against *Giardia* spp. *Infect and Immun.* **74**: 2473-2476.

Nash T, Aggarwal A, Adam R, Conrad J, Merritt J 1998. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J Immunol.* **141**: 636-41.

Nash T, Herrington D, Losonsky G, Levine M. 1997. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* **156**: 974–984.

Nash T, Merritt J, Conrad J. 1991. Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infect. Immun.* **59**: 133413–40.

Rossignol J. 2010. Cryptosporidium and *Giardia*: Treatment options and prospects for new drugs. *Exp Parasitol.* **124**: 45-53.

Darbon A. Portal, A. Girier L., Pantin J. Leclaire, C., 1962. Traitement de la giardiase (lamblia) par le métronidazole. *Presse Médicale.* **70**: 15–16.

Samuelson, J. 1999. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**: 1533–1541.

Müller, M. 1983. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery* **93**: 165–171.

Lau, A, Lam, N, Piscitelli, S, Wilkes L, Danzinger, L. 1992. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole antiinfectives. *Clinical Pharmacokinetics* **23**: 328–364.

Chacko M, Bhide S. 1986. Carcinogenicity, perinatal carcinogenicity and teratogenicity of low dose metronidazole (MNZ) in Swiss mice. *J Cancer Res Clin Oncol.* **112**:135-140.

López Nigro M, Palermo A, Mudry M, Carballo M. 2003. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. *Toxicol In Vitro.* **17**: 35-40.

Upcroft P. 1998. Drug resistance in *Giardia*: clinical versus laboratory isolates. *Drug Resist Updat.* **1**: 166-8.

Sóki J, Gal M, Brazier J, Rotimi V, Urbán E, Nagy E, Duerden B. 2006. Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in Bacteroides strains. *J Antimicrob Chemother.* **57**: 212–220.

Pal D, Banerjee S, Cui J, Schwartz A, Ghosh S, Samuelson J. 2009. *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* Enzymes Activate Metronidazole (Nitroreductases) and Inactivate Metronidazole Nitroimidazole Reductases. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**: 458-464.

Katiyar S, Gordon V, McLaughlin G, Edlind T. 1994. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**: 2086-2090.

Zhong, H, Cao, J, Rosssignol, J, Feng, M, Hu, R, Gan, S, Tan, W. 1986. Albendazole in nematode, cestode, trematode and protozoan (*Giardia*) infections. *Chinese Medical Journal.* **99**: 912–915.

Morgan, U, J. Reynoldson, y R. C. Thompson. 1993. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 328–331.

Venkatesan, P. 1998 Albendazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**: 145–147.

Upcroft, J., R. Mitchell, N. Chen, y P. Upcroft. 1996. Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in beta-tubulin. *Microb. Drug Resist.* **2**: 303–308.

Müller, J, Wastling, J, Sanderson, S, Müller N, Hemphill, A. 2007a. A novel nitroreductase, GINR1, interacts with nitazoxanide and other thiazolides. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 1979–1986.

Tomoko, M, Michael, A. 2003. *Giardia*: recent progress in chemistry and drug development. *Current Pharmaceutical Design* **9**: 841–855.

Müller J, Ley S, Felger I, Hemphill A, Müller N. 2008. Identification of differentially expressed genes in a *Giardia lamblia* WB C6 clone resistant to nitazoxanide and metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* **62**: 72-82.

Nash, T.E. 1997. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Phil Trans . Soc Lond B.* **352**: 1369–1375.

Rivero F, Saura A, Prucca C, Carranza P, Torri A, Lujan H. 2010. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite. *Vaccine. Nat Med.* **16**: 551-557.

Rieder S, Rose I. 1958. The Mechanism of the Triosephosphate Isomerase Reaction. *J Biol Chem.* **234**: 1007-1010.

Desai K, Miller B. 2008. A metabolic bypass of the triosephosphate isomerase reaction. *Biochem.* **47**: 7983-7985.

Edwards M, Schofield P, O'Sullivan W, Costello M. 1992. Arginine metabolism during culture of *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol.* **53** (1-2): 7-103.

Wierenga R, Kapetaniou E, Venkatesan R. 2010. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cell Mol Life Sci.* **67**: 3961-3982.

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

Jogl G, Rozovsky S, McDermott A, Tong L. 2003. Optimal alignment for enzymatic proton transfer: structure of the Michaelis complex of triosephosphate isomerase at 1.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100** : 43-50.

Naila A, Sinan B, Nikolaos K, Roya B, Margit H, Klára B, Susan H, y Paul J. 2003. Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochim Biophys Acta.* **1639**: 121-32.

Peter S. Kessler y Marilyn Parsons. 2005. Probing the role of compartmentation of glycolysis in procyclic form *Trypanosoma brucei*: RNA interference studies of PEX14, hexokinase y phosphofruktokinase. *J Biol Chem.* **280**: 9030-9036.

Ana Judith, Paul A, Michels y Véronique H. 2010. Genetic validation of aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as drug targets in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **169**: 50-54.

Alexandra R, Tim Y, y Alistair J. 2006. Effects of depleting the essential central metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase on the growth and viability of *Candida albicans*: implications for antifungal drug target discovery. *Eukaryot Cell.* **5**: 1371-1377.

Zhang Y, Shen W, Rao Z, Fang H, y Zhuge J. 2007. Deletion of the CgTPI gene encoding triosephosphate isomerase of *Candida glycerinogenes* inhibits the biosynthesis of glycerol. *Curr Microbiol.* **55**: 147-151.

Robert Eissenthal y Athel Cornish-Bowden. 1998. Prospects for Antiparasitic Drugs. The case of *Trypanosoma brucei*, the causative agent of african sleeping sickness. *J Biol Chem.* **273**: 5500–5505.

Cornish-Bowden A. 1986. Why is uncompetitive inhibition so rare? A possible explanation, with implications for the design of drugs and pesticides. *FEBS Lett.* **203**: 3-6.

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

Jarroll E, Sener K. 2003. Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. *Drug Resist Updat.* **6**: 239-246.

Sommer J, Ma H, Wang C. 1996. Cloning, expression and characterization of an unusual guanine phosphoribosyltransferase from *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **78**: 185-193.

Suk; Dae-Hwan, Rejman D, Dykstra, C, Pohl R, Pankiewicz W, Patterson E. 2007. Phosphonoxins: Rational design and discovery of a potent nucleotide anti-*Giardia* agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**: 2811-2816.

Cox, S, Giezen M, Tarr S, Tovar J. 2006. Evidence from bioinformatics, expression and inhibition studies of phosphoinositide-3 kinase signalling in *Giardia intestinalis*. *BMC Microbiol.* **18**: 6-45.

Ostoa-Saloma P., Garza-Ramos G., Ramírez J., Becker I., Berzunza M., Landa A., Gomez-Puyou A., Tuena De Gómez-Puyou M., Pérez-Montfort R. 1997. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem.* **244**: 700-705.

Rodríguez-Romero A, Hernández-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Kornhauser A, Fernández-Velasco D. 2002 Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J Mol Biol.* **322**: 669-675.

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

Maithal K, Ravindra G, Balaram H, Balaram P. 2002. Inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by chemical modification of an interface cysteine. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of differential cysteine reactivities. *J Biol Chem.* **277**: 25106-25114.

Enríquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernandez-Alcántara G, De la Mora-De la Mora I, Gutiérrez-Castellón P, Carvajal K, López-Velazquez G, Reyes-Vivas H. 2008. Species-specific inhibition of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Mol Biochem Parasitol.* **157**: 179-186.

López-Velázquez G, Molina-Ortiz D, Cabrera N, Hernández-Alcántara G, Peon-Peralta J, Yépez-Mulia L, Pérez-Montfort R, Reyes-Vivas H. 2004. An unusual triosephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins*. **55**: 824-34.

Schägger H, von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. **166**: 368-379.

Sørensen S, Sørensen T, Breddam K. 1991. Fragmentation of proteins by *S. aureus* strain V8 protease. Ammonium bicarbonate strongly inhibits the enzyme but does not improve the selectivity for glutamic acid. *FEBS Lett*. **294**: 195-197.

Silverstein R. 1975. The determination of the molar extinction coefficient of reduced DTNB. *Anal Biochem*. **63**: 281-282.

Penefsky H. 1977. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*. **252**: 2891-2899.

González-Mondragón E, Zubillaga R, Saavedra E, Chánez-Cárdenas M, Pérez-Montfort R, Hernández-Arana A. 2004. Conserved cysteine 126 in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochem* **43**: 3255-3263.

Wiseman T, Williston S, Brandts J, Lin L. 1989. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem*. **179**: 131-137.

Kabsch W. 1993. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Appl. Cryst*. **26**: 795-800.

Evans, P. 2006. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **62**: 72-82.

McCoy A, Grosse-Kunstleve R, Adams P, Winn M, Storoni L, y Read R. 2007. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*. **40**: 658-674.

Reyes-Vivas H., Diaz, A., Peon, J., Mendoza-Hernandez, G., Hernandez-Alcántara, G., De la Mora-De la Mora, I., Enríquez-Flores, S., Dominguez-Ramirez, L., y López-Velázquez, G. 2007. Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *J Mol Biol.* **365**: 752-763.

Adams P, Afonine P, Bunkóczi G, Chen, V, Davis W, Echols N, Headd J, Hung L-W, Kapral G, Grosse-Kunstleve R, McCoy A, Moriarty N, Oeffner R, Read R, Richardson D, Richardson J, Terwilliger T, y Zwart P. 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst. D* **66**: 213-221.

Emsley P, y Cowtan K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **60**: 2126-2132.

Wilkins M, Williams K. 1997. Cross-species protein identification using amino acid composition, peptide mass fingerprinting, isoelectric point and molecular mass: a theoretical evaluation. *J Theor Biol.* **186**: 7-15.

Diezel W, Kopperschläger G, Hofmann E. 1972. An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Analytical Biochemistry.* **48**: 617–620.

Cruces-Ángeles M, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Reyes-López C, Hernández-Arana A. 2011. Thermodynamic and Kinetic Destabilization of Triosephosphate Isomerase Resulting from the Mutation of Conserved and Non-conserved Cysteines. *Protein Pept Lett.* **18**: 1290-1298.

Gerstein M. 1992. A Resolution-Sensitive Procedure for Comparing Protein Surfaces and its Application to the Comparison of Antigen-Combining Sites. *Acta Cryst. A* **48**: 271-276.

Eyzaguirre J. 1987. Chemical Modifications of Enzymes: Active Site Studies. John Wiley & Sons. 187 pp.

Hernández-Alcántara G, Rodríguez-Romero A, Reyes-Vivas H, Peon J, Cabrera N, Ortiz C, Enríquez-Flores S, De la Mora-De la Mora I, López-Velázquez G. 2008. Unraveling the mechanisms of tryptophan fluorescence quenching in the triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia*. *Biochim Biophys Acta*. **1784**: 1493-1500.

Reyes-Vivas H, Diaz A, Peon J, Mendoza-Hernandez G, Hernandez-Alcantara G, De la Mora-De la Mora I, Enriquez-Flores S, Dominguez-Ramirez L, Lopez-Velazquez G. 2007. Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *J Mol Biol*. **365**: 752-763.

Sumathi K, Ananthalakshmi P, Roshan MN, Sekar K. 2006. 3dSS: 3D structural superposition. *Nucleic Acids Res*. **34**: 128-132.

Kursula I, Salin M, Sun J, Norledge V, Haapalainen A, Sampson N, y Wierenga R. 2004. Understanding protein lids: structural analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Protein Eng Des Sel*. **17**: 375-382.

Dundas J, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y, Liang J. 2006. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Res*. **34**: 116-118.

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

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

Garza-Ramos G, Pérez-Montfort R, Rojo-Domínguez A, de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. 1996. Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of

nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *Eur J Biochem.* **241**: 114-120.

Christophe L, Verlinde C, Witmans C, Tjaard Pijning, Kor H. Kalk, Wim G, Hol Mia Callens y Fred R. 1992. Structure of the complex between trypanosomal triosephosphate isomerase and N-hydroxy-4-phosphono-butanamide: binding at the active site despite an "open" flexible loop conformation. *Protein Sci.* **12**: 1578-1584.

Parthasarathy S, Eaazhisai K, Balaram H, Balaram P, Murthy MR. 2003. Structure of *Plasmodium falciparum* triose-phosphate isomerase-2-phosphoglycerate complex at 1.1-A resolution. *J Biol Chem.* **278**: 52461-52470.

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

Wang Y, Berlow R, Loria J. 2009. Role of loop-loop interactions in coordinating motions and enzymatic function in triosephosphate isomerase. *Biochem.* **48**: 4548-4556.

ARTICULO PUBLICADO

Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: A study for antiparasitic drug design

Sergio Enríquez-Flores,¹ Adela Rodríguez-Romero,² Gloria Hernández-Alcántara,¹ Jesús Oria-Hernández,¹ Pedro Gutiérrez-Castrellón,¹ Gerardo Pérez-Hernández,³ Ignacio de la Mora-de la Mora,¹ Adriana Castillo-Villanueva,¹ Itzhel García-Torres,¹ Sara T. Méndez,¹ Saúl Gómez-Manzo,¹ Angélica Torres-Arroyo,¹ Gabriel López-Velázquez,^{1*} and Horacio Reyes-Vivas^{1*}

¹ Laboratorio de Bioquímica-Genética, Torre de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, 04530, México, D.F

² Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F

³ Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana Cuajimalpa, 01120, México, D.F

ABSTRACT

Giardiasis, the most prevalent intestinal parasitosis in humans, is caused by *Giardia lamblia*. Current drug therapies have adverse effects on the host, and resistant strains against these drugs have been reported, demonstrating an urgent need to design more specific anti-giardiasis drugs. ATP production in *G. lamblia* depends mainly on glycolysis; therefore, all enzymes of this pathway have been proposed as potential drug targets. We previously demonstrated that the glycolytic enzyme triosephosphate isomerase from *G. lamblia* (GITIM), could be completely inactivated by low micromolar concentrations of thiol-reactive compounds, whereas, in the same conditions, the activity of human TIM (HuTIM) was almost unaltered. We found that the chemical modification (derivatization) of at least one Cys, of the five Cys residues per monomer in GITIM, causes this inactivation. In this study, structural and functional studies were performed to describe the molecular mechanism of GITIM inactivation by thiol-reactive compounds. We found that the Cys222 derivatization is responsible for GITIM inactivation; this information is relevant because HuTIM has a Cys residue in an equivalent position (Cys217). GITIM inactivation is associated with a decrease in ligand affinity, which affects the entropic component of ligand binding. In summary, this work describes a mechanism of inactivation that has not been previously reported for TIMs from other parasites and furthermore, we show that the difference in reactivity between the Cys222 in GITIM and the Cys217 in HuTIM, indicates that the surrounding environment of each Cys residue has unique structural differences that can be exploited to design specific anti-giardiasis drugs.

Proteins 2011; 00:000–000.
© 2011 Wiley-Liss, Inc.

Key words: triosephosphate isomerase; TIM; *Giardia*; drug design; cysteine derivatization; calorimetry; X-ray crystallography.

INTRODUCTION

Giardia lamblia, the causative agent of giardiasis, is a protozoan with worldwide distribution, which causes ~ 200 million symptomatic cases per year and mainly affects pediatric and immunocompromised persons.¹ Clinical manifestations of acute giardiasis range from asymptomatic carriage to abdominal pain, vomit, and diarrhea, and chronic infection can progress to malabsorption syndrome caused by intestinal damage.² Pharmacotherapy against giardiasis involves the use of compounds derived from nitroimidazoles and benzimidazoles³; however, there are reservations concerning the application of these compounds, because of the side effects in the host and the emergence of resistant strains to these drugs.^{3–5} It is clear that new approaches capable of generating highly specific anti-giardiasis drugs are required, and thus, multiple efforts to find new anti-giardiasis compounds are currently in progress.^{3,6,7}

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México); Grant numbers: 104841, 62321 and 106126

*Correspondence to: Horacio Reyes-Vivas, Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, México, D.F. CP 04530. E-mail: hreyesvivas@yahoo.com.mx or Gabriel López-Velázquez, Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, México, D.F. CP 04530. E-mail: glv_1999@yahoo.com.

Received 9 December 2010; Revised 17 May 2011; Accepted 27 May 2011

Published online 16 June 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/prot.23100

We have previously proposed that key enzymes, involved in the energetic metabolic pathways of *G. lamblia*, can be used as targets for drug design.^{8,9} *G. lamblia* employs glycolysis as its main pathway for ATP production¹⁰; therefore, blocking this pathway could result in an energy deficit that might impair the survival of this parasite. Triosephosphate isomerase (TIM) has been considered as a potential target for drug design in several parasites.^{11–13} It has been catalytically and structurally characterized in different organisms, including *Homo sapiens*¹⁴ and human pathogens, such as *G. lamblia*.⁸ Recently, we reported complete and selective inactivation of *G. lamblia* TIM (GITIM) by chemical modification of Cys residues with thiol-reactive compounds (i.e., by the derivatization of these amino acid residues).¹⁵ We found that the derivatization of at least one of the five Cys residues in GITIM, presumably Cys222 or Cys228, was involved in the inactivation of the enzyme; however, the cysteine residue responsible for this inactivation could not be completely ascertained.

Inactivation of GITIM is achieved by local structure perturbation without dimer dissociation, which suggests a possible communication between the region of the derivatized Cys that affects the activity and the catalytic site. The mechanism involved in this inactivation is quite different from that reported for TIMs of other species; in the latter, the derivatization of the interfacial Cys induces dissociation of the dimers and consequently, inactivation.^{12,13,16}

In this study, experiments involving mutagenesis, enzyme kinetics, fluorescence, calorimetry, and protein structure were performed to precisely describe the mechanism of GITIM inactivation by thiol reagents. The results of our mutagenesis studies indicate that Cys222 is the derivatization target that produces total enzyme inactivation. The kinetic and fluorescence experiments show that the inactivation of GITIM achieved by Cys222 derivatization is caused by the perturbation of the affinity for the substrate. Additionally, isothermal calorimetric studies showed that derivatization of Cys222 mainly altered the entropic component for the binding of the ligand 2-phosphoglycolate (2-PG). Finally, the crystal structure of mutant C202A GITIM derivatized with the thiol reagent methylmethane thiosulfonate (MMTS), was solved and confirmed that the Cys residues at positions 14, 222, and 228 were chemically modified, whereas the Cys127 was unaltered.

Our results describe a novel mechanism for the inactivation of GITIM by chemical modification of a non-interfacial Cys residue and we also identified the region surrounding Cys222 as a suitable surface target for the design of molecular compounds with anti-giardiasis activity of high specificity.

MATERIAL AND METHODS

General procedures

All reagents were of analytical grade. Protein concentrations were determined, either by the bicinchoninic acid method,¹⁷ or by absorbance at 280 nm for pure GITIM ($\epsilon_{280} = 26,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁸ The enzymatic activity of GITIM was measured in the direction of D-glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) to dihydroxyacetone phosphate (DHAP) at 25°C, using a coupled spectrophotometric assay, by following the oxidation of NADH at 340 nm.¹⁵ The standard reaction mixture contained 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, pH 7.4, 1 mM GAP, 0.2 mM NADH, and 0.9 units of α -glycerol-3-phosphate dehydrogenase, and the assay was initiated by the addition of 5 ng of GITIM per mL to the reaction mixture. For the determination of kinetic constants, GAP concentrations ranging from 0.4 to 3.5 mM, were used for the determination of the initial velocity and the data were adjusted to the Michaelis-Menten model using non-linear regression calculations. Recombinant His-tagged tobacco etch virus protease (TEVP) was expressed and purified as described by Rodríguez-Almazán *et al.*¹⁸

Site directed mutagenesis of GITIM

Previously isolated *gltim* gene⁸ was sub-cloned into a modified pET-3a plasmid (pET-HisTEVP), which introduced a (His)₆-tag and a tobacco etch virus protease recognition sequence at the amino-terminus of the protein (Supporting Information). Five desired Cys to Ala mutations, at positions 14, 127, 202, 222, and 228, were constructed by site directed mutagenesis.¹⁹ The corresponding mutagenic oligonucleotides were as follows: C14A, Fwd: 5'-GTAACCTCAAGGCTAACGGC-3' and Rev: 5'-GCCGTTAGCCTTGAAGTTAC-3'; C127A, Fwd: 5'-GGT CATCTTCGCTGTCGG-3' and Rev: 5'-CCGACAGCGAAGATGACC-3'; C202A, Fwd: 5'-GGAGAAGGTTGCTGCCG-3', and Rev: 5'-CGGCAGCAACCTTCTCC-3'; C222A, Fwd: 5'-GGAAGCAACGCTGAGAAGC-3', and Rev: 5'-GCTTCTCAGCGTTGCTTCC-3'; and C228A, Fwd: 5'-CCAGGCTCCGAATATTGAC-3', and Rev: 5'-GTCAATATTCGAGCCTGG-3'. Amplification conditions were reproduced as reported.²⁰ For all mutants, the wild-type gene was first cloned into the pET-HisTEVP plasmid and used as template. Successful mutagenesis was confirmed by DNA sequencing.

GITIM expression and purification

Wild-type (WT) GITIM or the mutants were expressed and purified following the same procedure. Cell culture and protein expression were performed as previously reported,¹⁵ with some modifications. Briefly, BL21(DE3)-

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México); Grant numbers: 104841, 62321 and 106126

*Correspondence to: .

pLysS cells containing the pET-HisTEVP-TIM plasmid (WT GITIM or mutants) were grown at 37°C in LB medium plus 100 mg L⁻¹ ampicillin until an OD_{600nm} of 0.6 was reached. Expression was induced overnight with 0.4 mM isopropyl β-D-galactopyranoside at 30°C. Protein purification was performed using immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) with a Profinity Ni²⁺-charged resin (Biorad). Transformed cells expressing (His)₆-tagged GITIM were harvested by centrifugation and resuspended in lysis buffer containing 50 mM Tris (pH 8.0), 50 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.1% NaN₃. Cells were maintained at 4°C, disrupted by sonication and centrifuged at 9000 RPM for 30 min. The supernatant was added to the IMAC column, previously equilibrated with lysis buffer (without PMSF), and washed with 10 column volumes of the same buffer. Adsorbed protein was eluted with lysis buffer containing 250 mM imidazole and concentrated to ~ 1 mL with Amicon Ultra filters (Millipore). The protein was precipitated with 75% saturated ammonium sulfate and centrifuged at 12,000 RPM and 4°C for 20 min. The supernatant was discarded and the pellet was suspended in 50 mM Tris (pH 8.0), 0.5 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol (TEVP buffer). To remove the His-tag from GITIM, the enzyme was incubated for 17 h at room temperature with TEVP at a molar ratio of 30:1 (TIM:TEVP). Both the non-cleaved GITIM and TEVP were removed by an additional IMAC step, performed using a batch modality. As indicated by SDS-PAGE analysis, the purity of the sample was higher than 95% and typical yields were ~ 50 mg per liter of culture. Proteins were stored in 100 mM triethanolamine and 10 mM EDTA, pH 7.4 (TE buffer). Alternatively, the proteins were precipitated with 75% saturated ammonium sulfate and maintained at 4°C until use.

Structural spectroscopic studies

Circular dichroism assays were performed using a Jasco J-810 spectropolarimeter, equipped with a Peltier-thermostated cell holder, in a cell with a path length of 0.1 cm. Spectral scans were carried out at 25°C, using a protein concentration of 100 μg mL⁻¹, with samples previously dialyzed against 25 mM phosphate at pH 7.4, and were performed at 1 nm intervals from 200 to 260 nm. To evaluate the thermal stability of WT GITIM or the mutants, protein unfolding was measured as the change in the circular dichroism signal, at 222 nm, as a function of the temperature. The temperature scanning experiments were performed from 25°C to 70°C with an increase of 1°C min⁻¹. In all cases, the spectra of the samples without protein were subtracted from those that contained the enzyme. The fraction of apparent denatured protein was calculated as previously described.¹⁵

Fluorescence experiments were performed using a Perkin-Elmer LS55 spectrofluorometer at 25°C and a protein concentration of 500 μg mL⁻¹. The intrinsic fluorescence of the enzymes was determined at an excitation wavelength of 295 nm and the emission spectra was recorded from 310 to 500 nm using 13.2 and 3.6 nm excitation and emission slits, respectively. Each spectrum was the average of five scans. The spectra of blanks were subtracted from those containing protein.

Inactivation of GITIM by chemical modification of cysteine residues

The sulfhydryl reagents methylmethane thiosulfonate (MMTS), 2-carboxyethyl methanethiosulfonate (MTSCE), and 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were prepared immediately before use. The WT GITIM inactivation assays were performed at a protein concentration of 0.2 mg mL⁻¹ (7.2 nM) in TE buffer at 25°C. Pseudo first-order inactivation rate constants were obtained at MTSCE concentrations ranging from 50 to 150 μM, whereas the concentration for DTNB varied from 12.5 to 75 μM. At the times indicated in Figure 1(A,B), aliquots were removed from the samples and assayed for residual activity in the standard reaction mixture. Data were adjusted to a monoexponential decay model,

$$A_R = A_0 e^{-kt} \quad (1)$$

where A_R is the residual activity at time t , A_0 is the activity at time 0, and k is the pseudo first-order inactivation rate constant. The second-order MTSCE inactivation rate constant was calculated from the slope of the linear plot of the pseudo first-order inactivation constant versus the concentration of MTSCE. For DTNB, the apparent second-order inactivation rate constant was calculated from the hyperbolic plot of the pseudo first-order inactivation rate constant versus the concentration of DTNB. Data were adjusted to the equation $k = k_{MI} \times [DTNB]/K_{0.5} + [DTNB]$, where k_{MI} is the maximal inactivation rate constant achieved at DTNB saturation, whereas $K_{0.5}$ is the concentration of DTNB that gave 1/2 k_{MI} . The $k_{MI}/K_{0.5}$ ratio was considered as the apparent second-order inactivation rate constant. The number of free GITIM cysteine residues was calculated as follows: 0.2 mg mL⁻¹ of enzyme, WT GITIM, or single cysteine mutants, were incubated at 25°C in TE buffer at the concentrations of sulfhydryl reagents indicated in Figure 1(C,D). After 2 h, aliquots were withdrawn from the samples and assayed for residual activity in the standard reaction mixture, and the free cysteine content was determined in the remaining sample according to the Ellman method, as previously reported.¹⁵

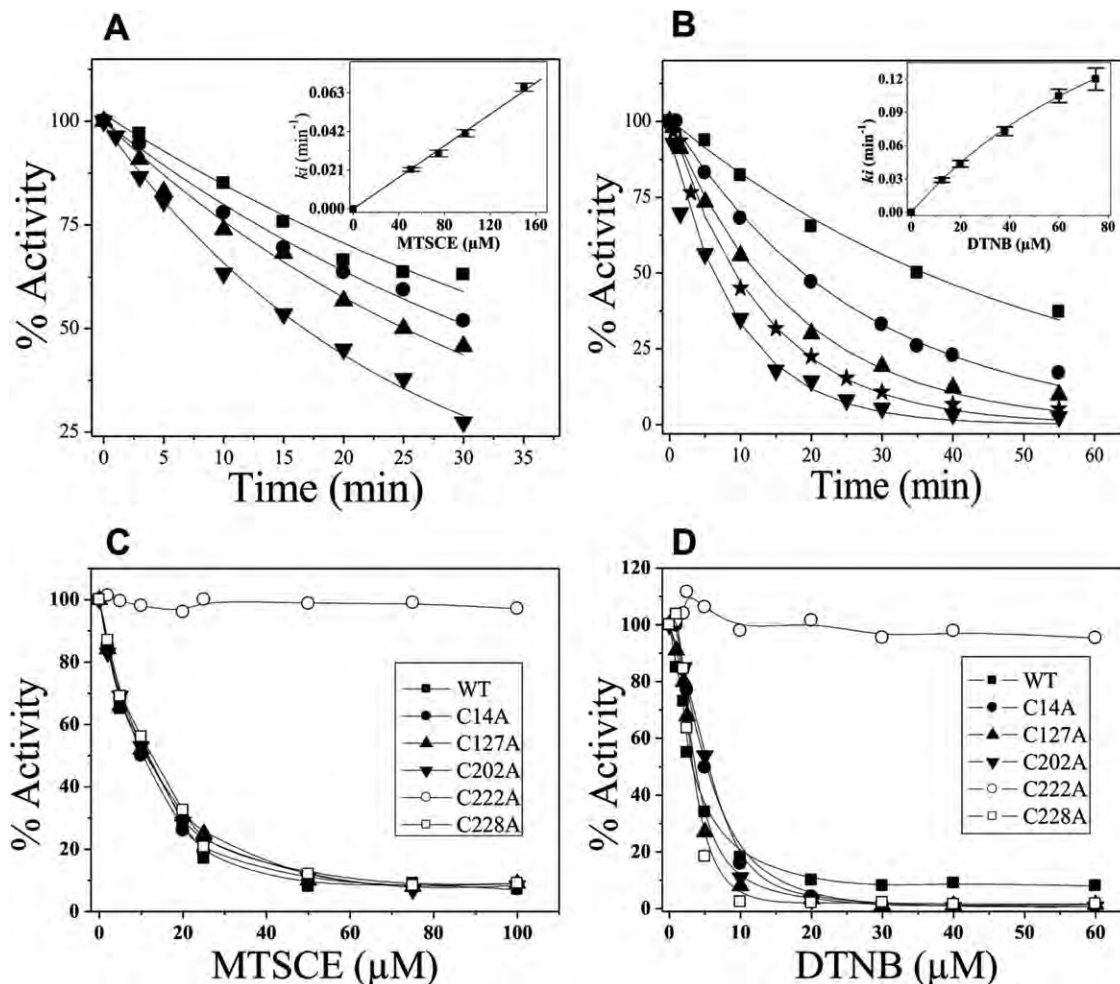


Figure 1

Inactivation of WT GITIM or the single cysteine mutants by chemical modification of cysteine residues. WT GITIM was incubated with 50 (■), 80 (●), 100 (▲), and 150 (▼) μM MTSCE (A), or 12.5 (■), 20 (●), 38 (▲), 60 (★), and 75 (▼) μM DTNB (B). At the indicated times, aliquots were withdrawn and assayed for residual activity; lines represent the fit of experimental data to Eq. (1). The insets show the replots of pseudo first-order inactivation rate constants versus the concentration of MTSCE (A) or DTNB (B). WT GITIM (■), C14A (●), C127A (▲), C202A (▼), C222A (○), and C228A (□) were incubated at 25°C at the indicated concentrations of MTSCE (C) or DTNB (D). After 2 h, aliquots were withdrawn and assayed for residual activity. In both experiments, the enzymes were stable in the absence of sulfhydryl reagents during the incubation time.

Determination of the affinity of GITIM for 2-PG

The change in intrinsic fluorescence of GITIM, in response to the addition of 2-PG, was used to evaluate the affinity of modified or unmodified WT and the C222A mutant enzymes. We selected 2-PG because this is a well-studied transition-state analog with micromolar affinity for several TIMs.²¹ Titrations of unmodified proteins were performed at concentrations ranging from 0.5 μM to 1 mM by adding successive microliter aliquots of a concentrated 2-PG solution. The final volume added to the fluorescence cell was always <5% of the final volume. For the modified GITIM, 1 mL of the WT or C222A mu-

tant enzymes was incubated at 2 mg mL⁻¹ for 2 h at 25°C with 5 mM MMTS or MTCSE. After this time, free sulfhydryl reagents were removed by column filtration (using 1 mL of Sephadex G-25 previously equilibrated in TE buffer). After elution, the protein concentration and the residual activity were determined, and titration with 2-PG was performed as indicated. The maximal fluorescence intensity of each spectrum at 332 nm was normalized and plotted *versus* the concentration of 2-PG. The ligand dissociation constant (K_D) was calculated by fitting the data to non-linear regression calculations with the equation

$$y = (\alpha/2E_t)[(E_t + x + K_D) - \sqrt{(E_t + x + K_D)^2 - 4xE_t}] \quad (2)$$

where $y = 1 - (F_i/F)$ (F_i , initial fluorescence; F , fluorescence intensity at each 2-PG concentration), α is the maximal fluorescence change attained at the saturating concentration of ligand, E_t represents the concentration of binding sites, and x is the concentration of 2-PG.²² The free energy change of ligand binding was calculated from the fluorescence data [$\Delta G(\text{flr})$] using the values for K_D in the standard thermodynamic relation:

$$\Delta G(\text{flr}) = -RT \ln K_D \quad (3)$$

Isothermal titration calorimetry of 2-PG binding

The thermodynamic parameters of 2-PG binding to GITIM were obtained by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) using a high-precision iTC200 calorimeter (MicroCal). The assays were performed at 25°C with a protein concentration of 180 μM in TE buffer. The 2-PG concentration in the syringe was 3.3 mM, and the titration schedule consisted of 20–30 consecutive 1 μL injections, with 2.4 min intervals between each application. To determine the heats of ligand dilution, experimental titrations were performed using buffer without protein in the reaction cell and the calculated values were subtracted from the experimental trace isotherm. The K_D , the enthalpy change (ΔH), and the binding stoichiometry (n) values were determined by non-linear fitting of the normalized titration data using a model with identical and independent binding sites.²³

Crystallization, data collection, and structure determination of C202A GITIM derivatized with MMTS

The C202A GITIM was crystallized using the hanging drop vapor-diffusion technique at 18°C. The best crystals were obtained by mixing equal volumes of a protein solution at a concentration of 13.0 mg mL⁻¹ in TE buffer and the precipitant solution, which contained 2M (NH₄)₂SO₄, 0.1M Tris-HCl, pH 8.5 (Hampton Research). Long, thick prisms with an orthorhombic I222 space group were obtained in 1 month. When the crystals reached a length of 0.7 mm, we began changing the mother liquor by extracting 0.5 μL and subsequently adding 0.5 μL of a solution with MMTS (20 mM MMTS in TE buffer); thus, the final MMTS concentration inside the drop was 1 mM after each application. Under these conditions, the hydrolysis rate constant of MMTS was 0.02 min⁻¹, with a half-life of 34.6 min (data not shown). The addition of MMTS to the crystal was

Table I

Kinetic and Stability Constants of WT GITIM and the Single Cysteine Mutants

GITIM	K_m (mM)	k_{cat} (10 ⁵ min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)	$T_{\text{m,app}}$ (°C)
WT ⁹	0.78 ± 0.06	4.6 ± 0.16	5.9 × 10 ⁵	57.5
C14A	0.4 ± 0.06	5 ± 0.16	12 × 10 ⁵	55.1
C127A	0.36 ± 0.06	3.5 ± 0.1	9.7 × 10 ⁵	52.6
C202A ⁸	0.8 ± 0.09	2.9 ± 0.14	3.6 × 10 ⁵	56.6
C222A ⁸	1.8 ± 0.3	5 ± 0.4	2.8 × 10 ⁵	58.6
C228A ⁸	0.25 ± 0.07	1.87 ± 0.19	7.5 × 10 ⁵	57.2

The kinetic constants were obtained for the reaction in the direction of GAP to DHAP. Initial velocity data at GAP concentrations ranging from 0.4 to 3.5 mM were fitted to the Michaelis-Menten equation and the k_{cat} per dimer is reported. The values are the average of three independent experiments (± standard errors). $T_{\text{m,app}}$ values were obtained from circular dichroism temperature scan experiments from 25 to 70°C (1°C min⁻¹); the unfolding of proteins was monitored by the molar ellipticity change measured at 222 nm. The values are the average of two independent assays.

repeated every day for 5 days, after which, diffraction data were collected.

The diffraction data from the C202A GITIM crystals, soaked with MMTS, were obtained using a Raxis II-C image-plate detector mounted on a Rigaku rotating anode generator (Cu K α , $\lambda = 1.5416 \text{ \AA}$) at 100 K. Diffraction images were processed and scaled using XDS²⁴ and SCALA,²⁵ respectively. The summary of data collection and processing is given in Table III.

The monomeric structure in the asymmetric unit was solved by molecular replacement using the program Phaser²⁶ and the C202A GITIM coordinates previously obtained (PDB entry code 2DP3). Refinement was conducted in Phenix²⁷ and model building and correction procedures were performed using COOT²⁸ and σ A-weighted $2F_0 - F_c$ and $F_0 - F_c$ maps. A test set that contained 10% of the reflections was reserved for cross-validation. Water molecules were added to the model near the end of refinement by a search procedure that is based on peaks observed in the difference maps and bond-distance criteria. PROCHECK²⁹ was used for the analysis of the model stereochemistry and validation. The figures were prepared with PyMOL.³⁰

The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the RSCB Protein Data Bank (PDB) with the accession number 3PF3.

RESULTS

Kinetic parameters and thermal stability of GITIM

Five point mutants, with an Ala replacing each Cys residue (C14A, C127A, C202A, C222A, and C228A), were constructed and their kinetic parameters were determined (Table I). The values of the K_m for mutants C14A, C127A, and C228A were one-half that of WT GITIM, whereas for C222A GITIM was two-fold higher; the k_{cat}

for C228A was also one-half that of the WT enzyme. There were no significant differences in all the other kinetic parameters. Circular dichroism spectra were recorded to evaluate the secondary structure of the enzymes (Supporting Information) and there were no significant differences between the WT enzyme and the mutants. Additionally, the stability of the mutants was determined following their thermal denaturation. With the exception of the C127A GITIM, in which the $T_{m,app}$ value decreased 5°C, the $T_{m,app}$ of the rest of the mutants were similar to that of WT GITIM, suggesting similar structural stabilities (Table I). Collectively, these data indicate that the overall structure of WT GITIM and its mutants, are similar.

Inactivation of WT GITIM and its mutants by thiol-reactive compounds

Previously, we showed that the derivatization of a non-interfacial Cys in GITIM promotes subtle conformational changes that induce total enzyme inactivation, without perturbing the global 3D structure.¹⁵ In this study, we evaluated the kinetics of enzyme inactivation produced by Cys derivatization with thiol-reactive compounds, to improve our understanding of the mechanism of GITIM inactivation. The results show that the kinetics of inactivation using different concentrations of either MTSCE or DTNB, decays following a monoexponential function [Fig. 1(A,B), respectively]; however, the plots of the first-order rate constant versus thiol-reactive compound concentrations, showed different patterns. The data with MTSCE fit onto a straight-line with a second-order rate constant value of $7.1 \pm 0.16 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [Fig. 1(A), inset]. In contrast, the DTNB data fit onto a hyperbolic curve [Fig. 1(B), inset]. This behavior points to the presence of a reversible intermediary complex before the formation of the irreversibly inactivated enzyme.³¹ Thus, an apparent second-order rate constant value of $43.4 \pm 0.03 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ was calculated for DTNB, as described in the Material and Methods section.

We previously found that inactivation of GITIM is mediated by derivatization of Cys222 or Cys228, or both; however, the Cys residue responsible for the inactivation remained undetermined.¹⁵ We tested the susceptibility to inactivation with MTSCE or DTNB of the single Cys GITIM mutants, to identify which Cys residues produce this inactivation [Fig. 1(C,D), respectively]. The results show that, in the presence of MTSCE, four mutants, C14A, C127A, C202A, and C228A exhibited a susceptibility similar to that of WT GITIM [Fig. 1(C)]. Only the C222A GITIM was completely resistant to the effects of MTSCE. The behavior of the mutants was similar when exposed to DTNB: only the C222A GITIM remained completely resistant, but the rest of the GITIM mutants lost their catalytic activities [Fig. 1(D)]. These data indi-

cate that the derivatization of Cys222 is responsible for the inactivation of GITIM.

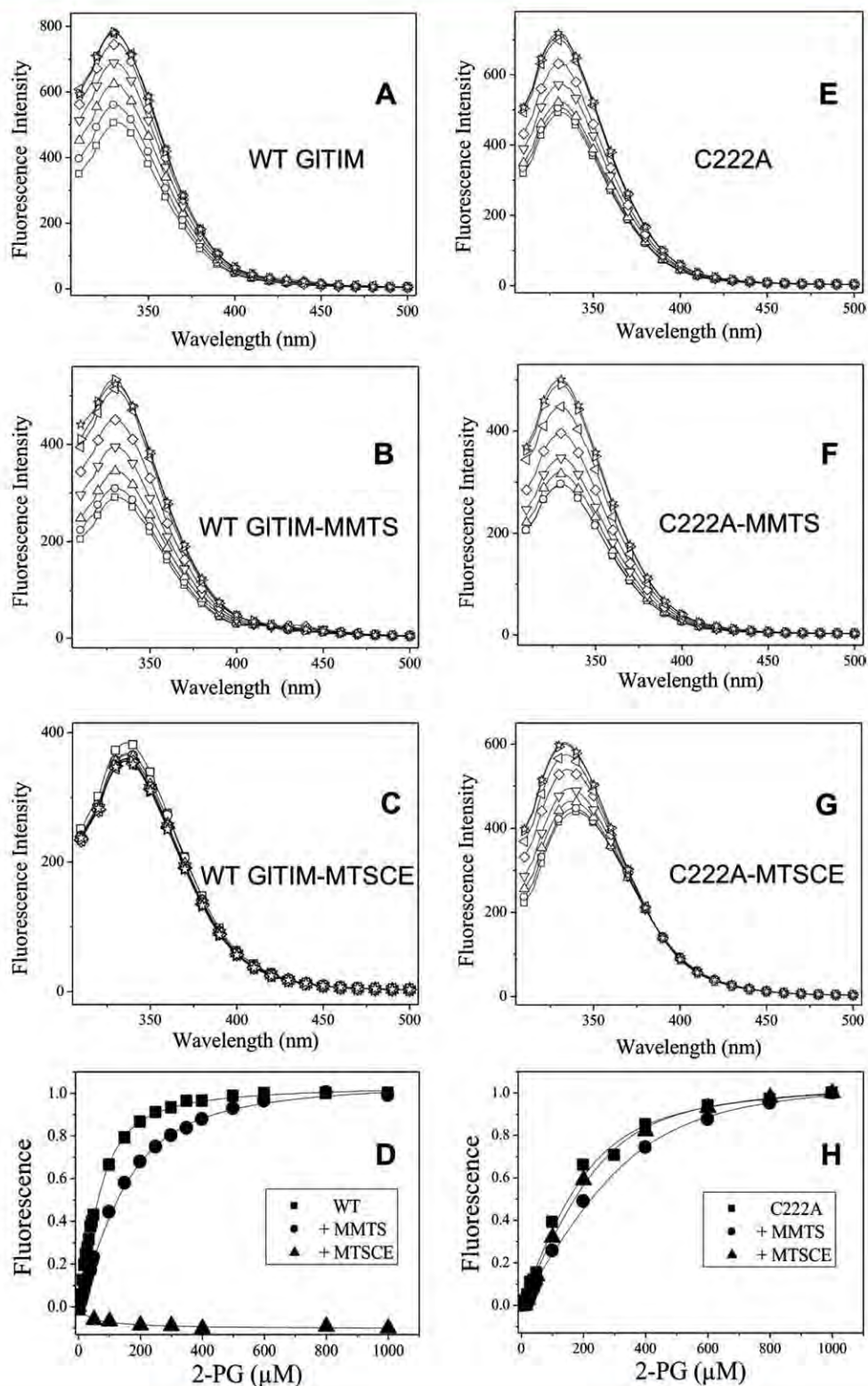
To confirm the role of Cys222 as a unique target that promotes GITIM inactivation, we determined the reactivity of the four remaining Cys residues in the C222A GITIM. The results showed that after the enzyme was incubated with 100 μM of MTSCE or DTNB for 2 h, the number of free Cys dropped to one per subunit, indicating that three Cys residues had been derivatized. These results led us to the conclusion that, although other Cys residues are modified chemically, it is the derivatization of Cys222 that is exclusively responsible for the total inactivation of GITIM.

The derivatization of Cys222 decreases the affinity GITIM for the substrate analog 2-PG

We previously evaluated the effect of derivatization of the Cys on the kinetic parameters of GITIM. Although derivatization with MMTS increased the K_m two-fold, without modification of the k_{cat} , derivatization with MTSCE increased the K_m 10-fold and significantly decreased the k_{cat} .¹⁵ Our data suggested that the thiol-reactive compounds affect the enzyme at two possible levels: substrate affinity and catalysis. To gain insight into the mechanism of the inactivation process, we evaluated the effect of Cys derivatization upon the binding of the substrate analog 2-PG, by following the changes of the intrinsic fluorescence signal of GITIM in response to the addition of this ligand. Figure 2 shows that the fluorescence emission spectra from unmodified WT GITIM was intensified as the 2-PG concentrations were increased, with a limit in the intensity change at ligand-saturating concentrations [Fig. 2(A)]. The emission spectra from WT GITIM derivatized with MMTS showed a reduction in fluorescence intensity with respect to unmodified WT GITIM; however, when the derivatized enzyme was exposed to different 2-PG concentrations, there was also an increase in the fluorescence intensity [Fig. 2(B)]. WT GITIM derivatized with MTSCE exhibited a different behavior: it was exposed to different 2-PG concentrations and its intrinsic fluorescence intensity did not change [Fig. 2(C)].

Fluorescence emission spectra analyses were also performed using the C222A GITIM. For all conditions, including those unmodified or modified with MMTS or MTSCE, the presence of 2-PG increased the fluorescence intensity of the enzyme [Fig. 2(E–G)]. It is noted that, the derivatization of the C222A GITIM with MTSCE promoted a maximal fluorescence wavelength emission that had a red shift of 4 nm [Fig. 2(G)]; however, this effect was lost when the 2-PG concentration was increased in the experiments.

From these data, the maximal fluorescence intensity values for each spectrum was calculated, normalized, and

**Figure 2**

Fluorometric titration of 2-PG binding to WT GITIM or to the C222A GITIM. Fluorescence emission spectra of WT GITIM (A–C) and the C222A GITIM (E–G) in the unmodified, MMTS derivatized, and MTSCE derivatized forms of the enzymes. The experimental conditions are described in the Materials and Methods section. For clarity, only some of the representative concentrations of 2-PG were plotted: 0 μM (\square), 20 μM (\circ), 50 μM (\triangle), 100 μM (∇), 200 μM (\diamond), 500 μM (\triangleleft), 800 μM (\triangleright), and 1000 μM (*). From these graphics, the maximal fluorescence intensity values were taken and plotted as a function of 2-PG concentration: WT GITIM (D) or the C222A GITIM (H) illustrate the unmodified (\blacksquare), MMTS derivatized (\bullet), and MTSCE derivatized (\blacktriangle) forms of the enzymes.

Table II

Fluorometric and Calorimetric Parameters for 2-PG Binding to Unmodified and MMTS Derivatized WT GITIM

WT GITIM	No. of sites	$K_D(\text{flr})$ (μM)	$K_D(\text{cal})$ (μM)	ΔH (cal) (kcal mol^{-1})	$-T\Delta S$ (cal) (kcal mol^{-1})	ΔG (flr) (kcal mol^{-1})	ΔG (cal) (kcal mol^{-1})
-MMTS	0.91 ± 0.04	26.4 ± 2.6	53	-7.41 ± 0.15	1.48	-6.3	-5.93
+MMTS	0.9 ± 0.01	57.8 ± 4.7	80	-9.2 ± 0.23	3.6	-5.86	-5.6

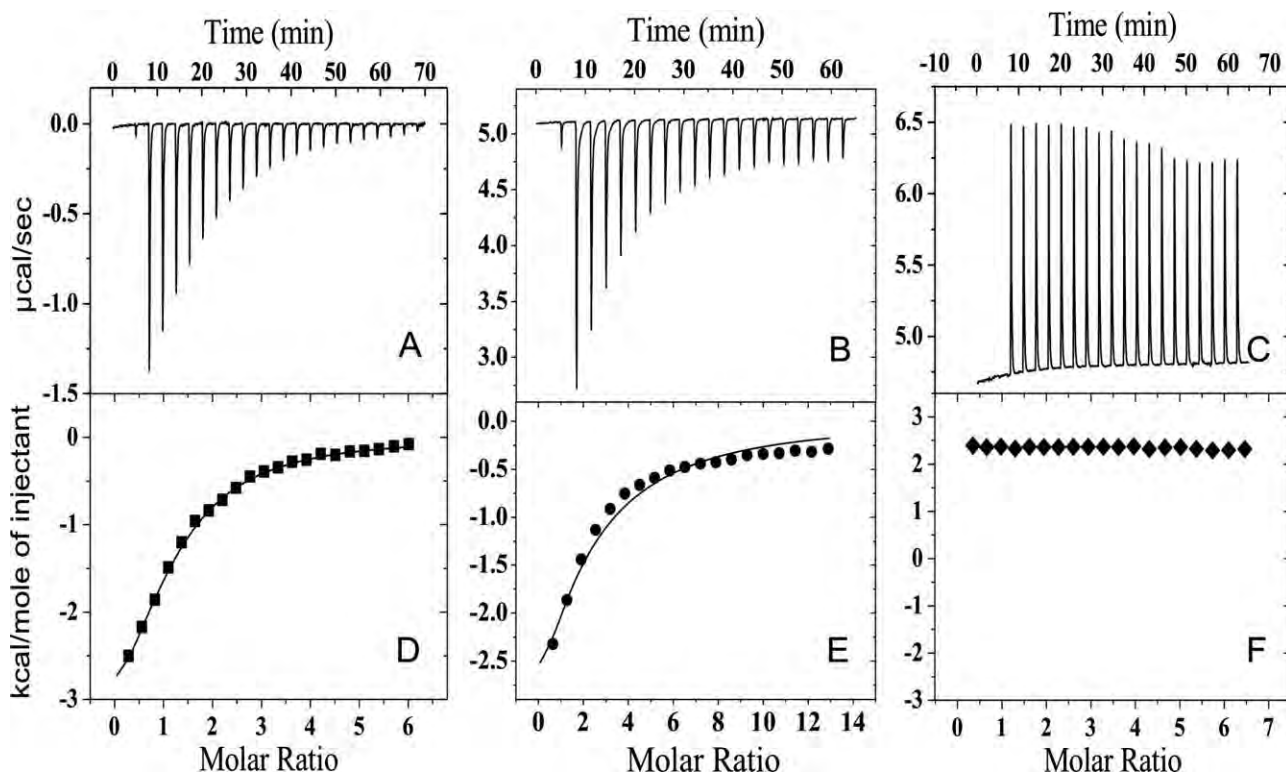
The K_D values obtained from the fluorescence experiments (flr) were calculated from the data in Figure 2 and fitted by non-linear regression according to Eq. (2). $\Delta G(\text{flr})$ was calculated using the K_D values according to Eq. (3). The thermodynamic parameters (cal) were calculated as previously described.²¹ The values are the average of two independent experiments (\pm standard errors).

plotted against the concentration of 2-PG. Figure 2(D) confirms that the derivatization of WT GITIM with MMTS induced a curve shift towards higher concentrations of 2-PG when compared with the plot of the unmodified WT GITIM. When the intensities of WT GITIM derivatized with MTSCE were plotted as a function of the concentration of 2-PG, it was found that the change in fluorescence signal was abolished. These data indicate that Cys derivatization with thiol-reactive compounds, in particular MTSCE, decreased the affinity of WT GITIM for its ligand.

A plot of maximal fluorescence intensities as a function of the concentration of 2-PG was also performed with the data for the C222A GITIM [Fig. 2(H)]. As

expected, the graphs clearly showed that the mutant conserved the affinity for 2-PG, even when the enzyme was previously derivatized with both MMTS and MTSCE. Thus, these data confirm that the derivatization of Cys222 in GITIM is exclusively responsible for the decrease in the affinity for the ligand.

The values of the K_D for the GITIM-2PG complex were calculated from the data in Figure 2 (Table II). While the K_D for the unmodified WT GITIM correlates with the value reported by kinetic approaches ($\sim 25 \mu\text{M}$),²¹ the K_D of the derivatized WT GITIM with MMTS was two-fold higher. The K_D value of the enzyme derivatized with MTSCE was not determined because the changes in intrinsic fluorescence were lost. The K_D was

**Figure 3**

Isothermal titration calorimetry for the binding of 2-PG to WT GITIM. Thermograms of 2-PG binding to the unmodified (A), MMTS derivatized (B), or MTSCE derivatized (C) forms of enzyme. In all conditions, the final enzyme concentration was 4 mg mL^{-1} . Isothermal titration obtained from the thermograms of unmodified (D), MMTS derivatized (E), or MTSCE derivatized enzymes (F). The heat dilution was subtracted in all cases and the data were fitted to a one ligand per subunit model.²²

52 μM for the C222A GITIM and was twice that of WT GITIM; such a decrease in affinity correlates with the change in the K_m value for GAP (Table I). The values for the K_D of the C222A GITIM, treated with either MMTS or MTSCE, respectively were 1.3- and 1.2-fold higher, when compared to the unmodified C222A GITIM. Thus, despite having three derivatized Cys residues, the affinity of the modified C222A GITIM for 2-PG did not change significantly.

Calorimetric 2-PG binding parameters of WT GITIM

To obtain further insight into the effect of derivatizing Cys on the affinity of GITIM for 2-PG, the thermodynamic parameters of 2-PG binding to WT GITIM, and derivatized WT GITIM, were explored using ITC. Figure 3(A) shows that the reaction of 2-PG binding to WT GITIM is exothermic. The change in the heat recorded in the thermogram decreased as the 2-PG concentration progressively increased in the reaction cell. Figure 3(D) shows the isothermal binding after subtracting the dilution heat. In this case, the solid line corresponds to a model with a best-fit that relates to the binding of one ligand per acceptor subunit. When WT GITIM was derivatized with MMTS, the binding of 2-PG to the enzyme was also exothermic [Fig. 3(B)]. The isothermal binding also fitted well to the model of one ligand per subunit [Fig. 3(E)]. In contrast, successive injections of 2-PG into WT GITIM derivatized with MTSCE did not promote detectable heat changes in the ITC instrument [Fig. 3(C,F)]. This indicates that the derivatization of WT GITIM with MTSCE induces a total loss in ligand affinity. Hence, taking the kinetic, calorimetric and the intrinsic fluorescence data together, it is clear that the derivatization of Cys222 by a negatively charged bulky thiol compound like MTSCE (or DTNB), induces a drastic perturbation of the binding affinity of WT GITIM for its substrates.

Table II summarizes the thermodynamic parameters obtained from fits of the isothermal binding data. The K_D value obtained by ITC for the unmodified WT GITIM was two-fold higher than the value obtained by fluorometric titration, and the K_D value obtained by ITC for the derivatized enzyme with MMTS was 1.4-fold higher than the value obtained by fluorescence. Such differences between calorimetric and fluorometric data have also been observed in studies of yeast TIM²² and may be due to the higher concentrations of both GITIM and 2-PG, used during the calorimetric experiments, a condition that may induce the loss of an ideal binding interaction.

The binding reaction of 2-PG with WT GITIM, in both the unmodified and MMTS derivatized enzymes, produced a negative ΔH at 25°C. In addition, the $T\Delta S$ value was 2.4-fold higher in derivatized WT GITIM. The

Table III

Data Collection and Structure Refinement Statistics for MMTS-C202A GITIM

Data collection	
Space group	I222
Cell dimensions (Å)	<i>a</i> = 56.37 <i>b</i> = 102.88 <i>c</i> = 118.91
Unique reflections ^a	22,165 (1297)
Resolution limit (Å)	50.2–2.1
R^b_{merge}	0.051 (0.26)
Multiplicity	3.0 (2.9)
Completeness (%)	96.7 (90.8)
$I/\sigma(I)$	9.8 (2.8)
Refinement statistics	
R^c/R_{free} (%)	18.35/21.1
No. of atoms of	
Protein/solvent/	2011/129
Glycerol/sulfate/Ca	30/10/1
Average <i>B</i> value (Å ²)	32.38
RMSD from ideality	
Bond length (Å)	0.009
Bond angle (°)	1.042
Ramachandran plot (%)	
Allowed regions	99.1
Disallowed	0.9

^aValues in parentheses correspond to the last resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_j \sum_h (|I_{jh} - \langle I_h \rangle|) / \sum_j \sum_h (\langle I_h \rangle)$, where *h* is the unique reflection index, I_{jh} is the intensity of the symmetry-related reflection, and $\langle I_h \rangle$ is the mean intensity.

^c $R = \sum_h |F_o|_h - |F_c|_h| / \sum_h |F_o|_h$ for all reflections, where F_o and F_c are observed and calculated structure factors, respectively, and *h* defines unique reflections. R_{free} was calculated similarly to the test reflections, randomly selected, and excluded from the refinement.

addition of 2-PG to the derivatized enzyme with MTSCE did not promote a change in heat; consequently, its thermodynamic analysis could not be performed. Taking the data together, it suggests that the loss of affinity induced by derivatization could be due to local perturbations of the structure that surrounds Cys222 and not to global conformational changes in GITIM.

Overall structure of the MMTS adduct of C202A GITIM

To investigate possible conformational changes induced by Cys derivatization that affect ligand binding, we attempted to obtain the structure of GITIM derivatized with the thiol-reactive compounds. We used the C202A GITIM for the crystallographic studies because this mutant exclusively forms a dimeric species⁸ that yields a homogeneous sample and rapid crystallization of the enzyme. After obtaining the enzyme crystals, they were soaked in solutions containing MMTS, MTSCE or DTNB to derivatize their Cys residues. The soaking of crystals in solutions of MTSCE or DTNB induced crystal cracking in a few hours; therefore, they were not appropriate for data collection. In contrast, a crystal soaked with MMTS was able to diffract, allowing us to solve the structure of the modified enzyme at a resolution of 2.2 Å. The data-collection and refinement statistics are shown in Table

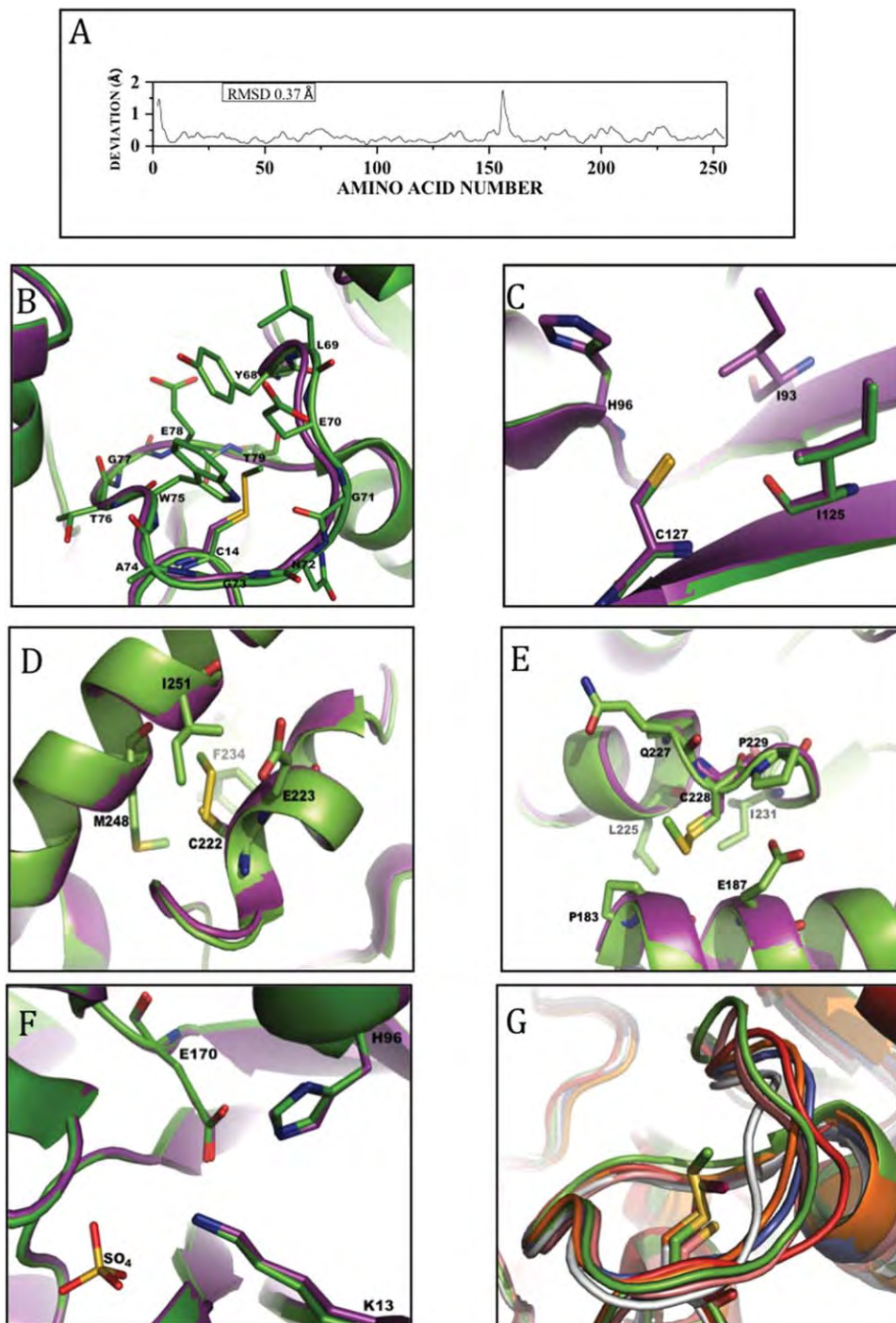


Figure 4

Structure of the MMTS-C202A GITIM. Measurement of the deviation from the C^α distances between the C202A GITIM (2DP3) and the MMTS-C202A GITIM (3PF3) after the optimal superposition of all equivalent C^α pairs⁴³ (A). Ribbon representation of the neighborhoods at 5 Å of Cys14 (B), Cys127 (C), Cys222 (D), and Cys228 (E) from the structures of the C202A GITIM (violet) and the MMTS-C202A GITIM (green). A close-up of the catalytic site from the C202A GITIM (violet) and the MMTS-C202A GITIM (green) structures (F). Superposition of Loop 3 region from the MMTS-C202A GITIM (green), TbtTIM (blue), TcTIM (orange), EhTIM (gray), PftTIM (brown), and HuTIM (red) (G). The side chains are represented as sticks. The figures were prepared using the PyMOL program.³⁰

III. The structure of the MMTS-C202A GITIM (3PF3) closely resembles that of WT GITIM (2DP3), with a maximal value of RMS deviation for the C^α atoms of 0.37 Å [Fig. 4(A)].

Table IV

Properties of the Cavity Region in Loop 3 Containing the Interfacial Cys Residues for TIMs of Several Different Parasites

Protein	PDB code	Volume (Å ³)	Number of residues of Loop 3	Effect of interfacial Cys derivatization with MMTS	Ref.
C202A GITIM	2DP3	94.7	16	No dissociation/No inactivation	8,15
MMTS-C202A GITIM	3PF3	122.7	16	No dissociation/No inactivation	15 and this study
PfTIM	1YDV	97.2	16	N.D.	13
EhTIM	1M6J	76.9	15	Dissociation/Inactivation	12
LmTIM	1AMK	74.4	15	Dissociation/Inactivation	39,44
TbTIM	5TIM	68.3	15	Dissociation/Inactivation	40,44
TcTIM	1TCD	68	15	Dissociation/Inactivation	41,44

The cavity volumes in the Loop 3 were generated *in silico* by removing the B subunit of TIM and using the A subunit in all cases. The CASTp server (Computed Atlas of Surface Topography of Proteins) was used to calculate the volume values of the cavities.⁴²

The structure of the MMTS-C202A GITIM showed that the Cys residue at position 14 clearly displayed an additional electron density corresponding to a thioalkyl group [i.e., —S—CH₃; Fig. 4(B)]. Electron density maps showed only one conformation for Cys14; therefore, the thioalkyl group is bound with full occupancy (data not shown). The thioalkyl was oriented toward the region of the residues Tyr68, Leu69, and Glu70 in Loop 3 of the adjacent subunit. Interestingly, it appears that this region creates a space to accommodate the thioalkyl group without clashes [Fig. 4(B)]. The overlap of Loop 3 between the structures of the unmodified and derivatized enzymes did not allow a clear identification of conformational changes induced by the thioalkyl group. However, when we determined the dimension of the cavity formed inside the Loop 3 (Asn66 to Ser80), after the adjacent monomer had been removed *in silico*,³² the cavity volume in the unmodified enzyme amounted to 94.7 Å³, while this value was increased to 122.7 Å³ in the MMTS-C202A GITIM (Table IV). Hence, the introduction of a thioalkyl group on the sulfur atom of Cys14 generated a distortion of the interfacial loop.

Respect to Cys127, the electron density for the thioalkyl group over the sulfur atom was absent [Fig. 4(C)]; even considering that, for crystallization conditions, the C202A GITIM was exposed for 35 min to MMTS concentrations ranging from 1 to 0.5 mM during five days. An explanation for this result may be that Cys127 reacts poorly with thiol-reactive compounds; consequently, the MMTS concentrations to which the crystal of enzyme was exposed were insufficient for derivatization. These results correlate with our previous biochemical data indicating that, of the five Cys residues present in each subunit of WT GITIM, one was not available for derivatization by thiol-reactive compounds.¹⁵

The thioalkyl Cys residue at position 222 was located in a hydrophobic pocket [Fig. 4(D)], whereas the thioalkyl group on Cys228 was oriented toward the solvent [Fig. 4(E)]. The overlap of unmodified GITIM and the MMTS-C202A GITIM surprisingly showed that there were no significant conformational rearrangements in any of the Cys residues. Likewise, there were no appreci-

able conformational differences between the catalytic sites of either structure [Fig. 4(F)]. Additionally, a sulfate molecule was found in the phosphate-binding site of the structure of the MMTS-C202A GITIM and Loop 6 was found in the closed conformation. The sulfate interactions detected in this structure are equivalent to those observed in the crystal structure of the *Trypanosoma brucei* TIM (TbTIM) with sulfate.^{32,33}

DISCUSSION

The GITIM Cys222 is a specific target for drug design

This study describes the Cys222 residue of GITIM as a novel target for the inactivation of this parasite enzyme. The proposal of Cys222 as a target is supported by three main points: (i) The derivatization of Cys222 with MTSCE or DTNB induces complete enzyme inactivation, (ii) the inactivation assays with the single Cys mutants indicated that C222A GITIM was completely resistant to inactivation, even though three of its four Cys residues were derivatized [Fig. 1(C,D)], and (iii) the assays with HuTIM indicated that it is 200-fold less reactive to thiol-reactive compounds than GITIM. This last point is especially relevant, since HuTIM also has a Cys residue in the equivalent position of Cys222 in GITIM.¹⁵

Although TIM has been previously proposed as a plausible target for rational drug design, the specific target region proposed in this report has not been described in the TIMs from other parasites. For instance, the interfacial Cys residues in TbTIM, *T. cruzi* TIM (TcTIM), *Leishmania mexicana* (LmTIM),¹⁶ *Entamoeba histolytica* TIM (EhTIM),¹² and *Plasmodium falciparum* TIM (PfTIM)¹³ have been proposed as targets, since their derivatization induces total enzyme inactivation. GITIM also has the interfacial Cys; however, its derivatization did not induce inactivation.¹⁵

The mechanism of inactivation of GITIM by derivatization of Cys222 involves ligand binding perturbation

The analysis of the titration of the reaction of 2-PG with GITIM using fluorometry indicated that the derivatization of Cys222 significantly decreased the affinity for the ligand [Fig. 2(D)]. The level of affinity perturbation seems to correlate with the size and polarity of the thiol-reactive compounds, that is: MMTS, a small and neutral compound, increased the K_D two-fold, whereas MTSCE, a bulky and negative compound, completely prevented the binding of 2-PG to the enzyme. The data from the ITC confirm these results: the derivatization of Cys222 with MMTS induced minor perturbations on the energy of the binding reaction. The $\Delta G(\text{cal})$ values of untreated and derivatized WT GITIM were $-5.93 \text{ kcal mol}^{-1}$ and $-5.6 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectively. In addition, we observed that its entropy value was 2.43-fold higher than that for unmodified WT GITIM (Table II). This increase could be attributed to two general reasons: (i) perturbation of weak intermolecular interactions that decrease the order in the ligand binding region³⁴ inducing an increase in the value of the K_D or (ii) perturbation of the properties of the structural water molecules in the derivatized WT GITIM. Further analyses are needed to clarify the origin of such differences. For the experiments of derivatization with MTSCE, the determination of thermodynamic parameters was not achieved because the binding of 2-PG to the enzyme was totally abolished.

To compare the reactivity of GITIM with the reactivity of TIMs from other parasites, using a thiol-reactive compound, we compared the rate constants of inactivation by derivatization with DTNB. The value of the second-order rate constant for GITIM is 1.8-fold higher than the value for TcTIM and 290-fold higher than the value for TbTIM.³⁶ In addition, the kinetics of inactivation of GITIM with DTNB showed a hyperbolic behavior, indicating that the region surrounding Cys222 operates as a recognition site that initially binds to DTNB, prior to reacting covalently with the Cys. Hence, Cys222 shows the highest reactivity with thiol-reactive compounds, and selectivity in the binding to distinct molecules.

Structural data of the MMTS-C202A GITIM

The derivatization of the C202A GITIM with MMTS did not show any apparent conformational changes in the regions surrounding Cys222 and Cys228. Because the biochemical data of the derivatization of Cys222 showed that MMTS reduced the k_{cat} value by half¹⁵ and produced a two-fold increase in the K_D value for 2-PG (Table II), it was reasonable to expect some conformational changes in the region surrounding this residue, and around the catalytic site. In this regard, it has been previously reported that the presence of ligands in the catalytic sites of TbTIM and TcTIM, affect the reactivity of

their interfacial Cys residues to thiol-reactive compounds.³⁵ The second-order rate constants for the derivatization of their interfacial Cys are diminished in the presence of 2-PG.³⁶ This suggests that occupancy of the catalytic site may promote an increase in the structural stability of TIM, which protects it from derivatization. In this context, the C202A GITIM was crystallized in the presence of 2M ammonium sulfate, which has been identified as a ligand for TIMs in other species, with a K_i value of around 5 mM.³⁷ Hence, the generation of contacts between the sulfate molecule and the catalytic pocket of the MMTS-C202A GITIM may produce the stabilization of this region and the preservation of its catalytically competent conformation. Consequently, conformational perturbations are not observed. Attempts are currently being performed to make crystals of the MMTS-C202A GITIM in the absence of ligands.

Although the crystal structure did not provide insight into the molecular mechanism of inactivation by the derivatization of Cys222, it was instructive to analyze the derivatized Cys14. The thioalkyl group of this residue fits inside Loop 3, and induces subtle local perturbations without enzyme inactivation.¹⁵ As previously mentioned, this interfacial Cys has been identified as a potential target for TbTIM, TcTIM, and EhTIM,^{12,13,16} and their derivatization with MMTS induces dimer dissociation and total inactivation. Thus, a logical question that arises is: Why is GITIM not inactivated or dissociated,¹⁵ (this study) as a result of Cys14 derivatization with MMTS or MTSCE? The crystal structure shows that the Cys14 thioalkyl moiety (i.e., $-\text{S}-\text{CH}_3$, equivalent to 35 \AA^3) is oriented toward the hydrophobic pocket of Loop 3 from the adjacent subunit that surrounds this Cys [Fig. 4(B)]. No steric hindrance or clashes were observed inside this region; however, the analysis of a virtual cavity formed inside Loop 3, when the adjacent subunit is removed, showed that the volume of this hole increased by 28 \AA^3 (Table IV). Hence, it seems that the Loop 3 of GITIM exhibits enough conformational flexibility to accommodate the thioalkyl, or even the thiocarboxyethyl moiety (62 \AA^3) from MTSCE, without dimer dissociation. The ability of Loop 3 to accommodate Cys14 adducts of distinct sizes is probably provided by an additional residue in GITIM: Asn 72, which makes this region longer than those observed in TbTIM, TcTIM, and EhTIM [Table IV and Fig. 4(G)]. Moreover, there is a clear correlation between the length of Loop 3, the cavity volume, and the derivatization effect of the interfacial Cys. The TIMs for which MMTS promotes dissociation and complete inactivation all have a Loop 3 region with 15 residues and the volume of their cavities ranges between 68 and 77 \AA^3 . In contrast, Loop 3 of GITIM has 16 residues and a cavity volume of 95 \AA^3 , where derivatization of Cys14 with MMTS did not induce dissociation¹⁵ or inactivation [Table IV and Fig. 4(G)]. Loop 3 of PfTIM also has 16 residues and a cavity volume of 97 \AA^3 and, although there

are no data of derivatization with MMTS, the effect of amino acid substitutions of its interfacial Cys were recently reported.³⁸ Two PFTIM mutants, C13D and C13E, respectively, showed a 7.4-fold and 3.3-fold decrease in their k_{cat} ; however, they were able to retain their dimeric structure at protein concentrations above of 1.25 μ M.³⁸ Hence, it seems that Loop 3 of PFTIM also has the capacity to accommodate extra volumes. Finally, HuTIM naturally has a Met instead of a Cys in the interfacial region [Fig. 4(G)], adding an extra volume of 38 \AA^3 and its Loop 3 also contains 16 residues with a cavity volume of 130 \AA^3 (PDB code 2JK2). This enzyme exhibits very high dimer stability.¹⁸

CONCLUDING REMARKS

In conclusion, this study describes a novel mechanism for GITIM inactivation that involves the perturbation of the substrate affinity as a consequence of the derivatization of Cys222, which is distant from the catalytic site. The structural environment that surrounds this residue has unique structural properties that can be exploited as a candidate surface target for designing highly specific anti-giardiasis compounds with low adverse effects for the host. Docking studies are now in progress to obtain lead molecules that can bind with high specificity to the region surrounding Cys222.

ACKNOWLEDGMENTS

S.E.F. was the recipient of a fellowship from CONA-CyT. This work is part of the Ph.D. thesis of S.E.F. for the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. The authors thank Dr. Ruy Perez-Montfort for careful revision of the manuscript.

REFERENCES

1. Thompson RC. Giardiasis as re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000;30:1259–1267.
2. Müller N, von Allmen N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol* 2005;35:1339–1347.
3. Upcroft JA, Dunn LA, Wright JM, Benakli K, Upcroft P, Vanelle P. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:344–347.
4. Lindmark DG, Muller M. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 1976;10:476–482.
5. Argüello-García R, Cruz-Soto M, Romero-Montoya L, Ortega-Pierres G. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:711–721.
6. Suk DH, Rejman D, Dykstra CC, Pohl R, Pankiewicz KW, Patterson SE. Phosphonoxins: rational design and discovery of a potent nucleotide anti-Giardia agent. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17:2811–2816.
7. Torres-Gómez H, Hernández-Núñez E, León-Rivera I, Guerrero-Alvarez J, Cedillo-Rivera R, Moo-Puc R, Argotte-Ramos R, Rodríguez-Gutiérrez Mdel C, Chan-Bacab MJ, Navarrete-Vázquez G. Design, synthesis and *in vitro* antiprotozoal activity of benzimidazole-pentamidine hybrids. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:3147–3151.
8. Reyes-Vivas H, Diaz A, Peon J, Mendoza-Hernandez G, Hernandez-Alcantara G, De la Mora-De la Mora I, Enriquez-Flores S, Dominguez-Ramirez L, Lopez-Velazquez G. Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *J Mol Biol* 2007;365:752–763.
9. López-Velázquez G, Molina-Ortiz D, Cabrera N, Hernández-Alcántara G, Peon-Peralta J, Yépez-Mulia L, Pérez-Montfort R, Reyes-Vivas H. An unusual triosephosphate isomerase from the early divergent Eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins* 2004;55:824–834.
10. Schofield PJ, Edwards MR, Kranz P. Glucose metabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol* 1991;45:39–47.
11. Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramirez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou, Pérez-Montfort R. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem* 1997;244:700–705.
12. Rodríguez-Romero A, Hernández-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Kornhauser A, Fernández-Velasco DA. Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J Mol Biol* 2002;322:669–675.
13. Velanker SS, Ray SS, Gokhale RS, Suma S, Balaram H, Baralam P, Murthy MR. Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* 1997;5:751–761.
14. Mande SC, Mainfroid V, Kalk KH, Goraj K, Martial JA, Hol WG. Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 \AA resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Sci* 1994;3:810–821.
15. Enriquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernandez-Alcantara G, De la Mora-De la Mora I, Gutierrez-Castrellon P, Carvajal K, Lopez-Velazquez G, Reyes-Vivas H. Species-specific inhibition of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Mol Biochem Parasitol* 2008;157:179–186.
16. Gao XG, Garza-Ramos G, Saavedra-Lira E, Cabrera N, De Gómez-Puyou MT, Perez-Montfort R, Gómez-Puyou A. Reactivation of triosephosphate isomerase from three trypanosomatids and human: effect of suramin. *Biochem J* 1998;332:91–96.
17. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76–85.
18. Rodríguez-Almazán C, Arreola R, Rodríguez-Larrea D, Aguirre-López B, de Gómez-Puyou MT, Pérez-Montfort R, Costas M, Gómez Poyou A, Torres-Larios A. Structural basis of triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *J Biol Chem* 2008;283:23254–23263.
19. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-Directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 1989;77:51–59.
20. Hernández-Alcántara G, Rodríguez-Romero A, Reyes-Vivas H, Peon J, Cabrera N, Ortiz C, Enriquez-Flores S, De la Mora-De la Mora I, López-Velázquez G. Unraveling the mechanisms of tryptophan fluorescence quenching in the triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia*. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784:1493–1500.
21. Hartman FC, LaMuraglia GM, Tomozawa Y, Wolfenden R. The influence of pH on the interaction of inhibitors with triosephosphate isomerase and determination of the pKa of the active-site carboxyl group. *Biochemistry* 1975;14:5274–5279.
22. González-Mondragón E, Zubillaga RA, Saavedra E, Cháñez-Cárdenas ME, Pérez-Montfort R, Hernández-Arana A. Conserved cysteine 126 in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity

- but for proper folding and stability. *Biochemistry* 2004;43:3255–3263.
23. Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 1989;179:131–137.
 24. Kabsch W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst* 1993;26:795–800.
 25. Collaborative Computational Project Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50:760–763.
 26. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 2007;40:658–674.
 27. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:213–221.
 28. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:2126–2132.
 29. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 1993;26:283–291.
 30. DeLano WL. The PyMOL molecular graphics system. Palo Alto, CA: DeLano Scientific; 2002. Available at: <http://www.pymol.org>.
 31. Cardemil E. Kinetics of the chemical modification of enzymes. In: Eyzaguirre J, editor. *Chemical modification of enzymes: active site studies*. New York: John Wiley and Sons; 1987. pp 23–34.
 32. Noble ME, Verlinde CL, Groendijk H, Kalk KH, Wierenga RK, Hol WG. Crystallographic and molecular modeling studies on trypanosomal triosephosphate isomerase: a critical assessment of the predicted and observed structures of the complex with 2-phosphoglycerate. *J Med Chem* 1991;34:2709–2718.
 33. Noble ME, Wierenga RK, Lambeir AM, Opperdoes FR, Thunnissen AM, Kalk KH, Groendijk H, Hol WG. The adaptability of the active site of trypanosomal triosephosphate isomerase as observed in the crystal structures of three different complexes. *Proteins* 1991;10:50–69.
 34. Dunitz JD. Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem Biol* 1995;2:709–712.
 35. Pérez-Montfort R, Garza-Ramos G, Alcántara GH, Reyes-Vivas H, Gao XG, Maldonado E, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A. 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 dimmer interface. *Biochemistry* 1999;38:4114–4120.
 36. Reyes-Vivas H, Hernández-Alcantara G, López-Velazquez G, Cabrera N, Pérez-Montfort R, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A. Factors that control the reactivity of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry* 2001;40:3134–3140.
 37. Lambeir AM, Opperdoes FR, Wierenga RK. Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. A comparison with the rabbit muscle and yeast enzymes. *Eur J Biochem* 1987;168:69–74.
 38. Banerjee M, Balaran H, Joshi NV, Balaran P. Engineered dimer interface mutants of triosephosphate isomerase: role of inter-subunit interactions in enzyme function and stability. *Protein Eng Des Sel* 2011;24:463–472.
 39. Williams JC, Zeelen JP, Neubauer G, Vriend G, Backmann J, Michels PA, Lambeir AM, Wierenga RK. Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng* 1999;12:243–250.
 40. Wierenga RK, Noble ME, Vriend G, Nauche S, Hol WG. Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J Mol Biol* 1991;220:995–1015.
 41. Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R. Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J Mol Biol* 1998;283:193–203.
 42. Dundas J, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y, Liang J. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Res* 2006;34:W116–W118.
 43. Russell RB, Barton GJ. Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins* 1992;14:309–323.
 44. Garza-Ramos G, Cabrera N, Saavedra-Lira E, Tuena de Gómez-Puyou M, Ostoa-Saloma P, Pérez-Montfort R, Gómez-Puyou A. Sulfhydryl reagents susceptibility in proteins with high sequence similarity-triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur J Biochem* 1998;253:684–691.
 45. Stols L, Gu M, Dieckman L, Raffin R, Collart FR, Donnelly MI. A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site. *Protein Expr Purif* 2002;25:8–15.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Construction of pET-HisTEVP expression vector.

The commercial pET-3a expression vector (Novagene) was used as template to generate a new vector that incorporates a (His)₆-tag sequence and the tobacco etch virus protease (TEVP) recognition site at the 5'-end [45]; the construction was named pET-HisTEVP. The pET-HisTEVP vector allows cloning target genes into the *NdeI*-*BamHI* restriction sites. A portion of the leader sequence-encoding region of pET-3a from vector was replaced with a nucleotide linker that encoded the new leader sequence of the (His)₆-tag and the TEVP recognition site (Fig. S1).

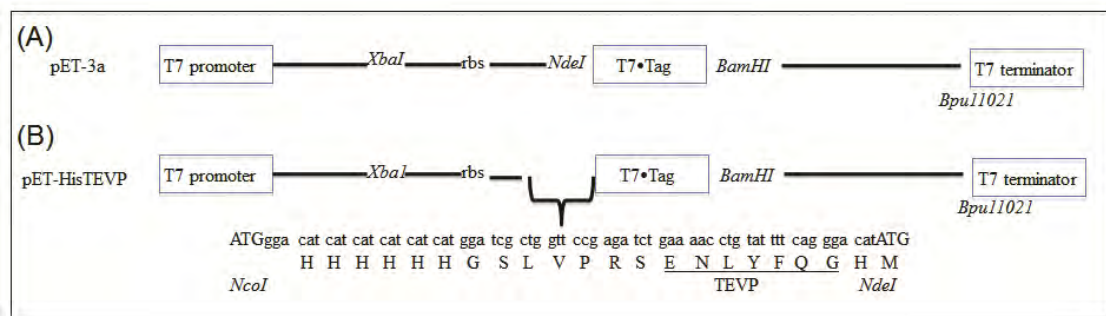


Figure S1. A) Original leader sequence-encoding region of pET-3a. B) Modified leader sequence of pET-3a (pET-HisTEVP); the site of insertion and the sequence of the linker region containing the (His)₆-tag and the TEVP recognition sequence is show.

The new leader sequence was created using a simple PCR method that produces a small gene (Fig. S2) by two polymerase chain reactions (PCR). In the first reaction, primer 1 (Fwd, 63bp, 5'TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATATCCATGGGACATCATCATCATCAT-3') and primer 2 (Rev, 66bp, 5'-ATGTCCCTGAAAATACAGGTTTTTCAGATCTCGGAACCAGCGATCCATGATGATGATGATGATGTCC-3'), which overlap in 18bp, were amplified generating a 111bp fragment (PCR1). In the second reaction (PCR2), the 111bp fragment and the primer 3 (Rev, 63bp, 5'- GCTCAGCGGGCTTCCTTTCGGGCTTTGCTAGGATCCACCCATATGTCCCTGAAAATACAGGTT-3'), which overlap in 21 bp, were amplified producing a 153bp fragment. The final amplified product, going from the T7 promoter site to the T7 terminator region, was purified from a 2% agarose gel with the Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) and cloned into the pCR2.1 vector (Original TA cloning® kit, Invitrogene). A positive clone was sequenced with the M13Fwd primer for corroborating the correct insertion of the new leader sequence. The pCR2.1 vector with the insert was digested with *XbaI* and *Bpu11021* restriction enzymes and the fragment was ligated into a pET-3a vector, previously digested with the same restriction enzymes. The PCR steps were carried out in a heated lid thermal cycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf)

in 200 μ L tubes; 50 μ l of standard PCR mixture contains 200 ng of primer, 20 nmol of dNTP mixture, 1x PCR buffer and 5 U TITANIUMTM *Taq* DNA polymerase. PCR conditions were as follows, 94°C for 4 min, 25 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 68°C for 1 min with a final incubation at 72°C for 10 min.

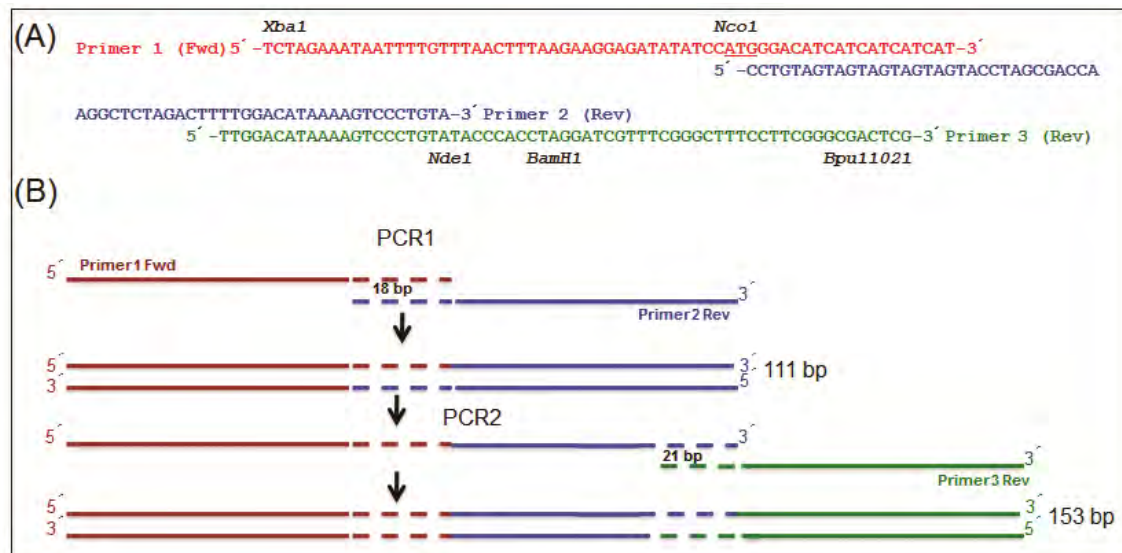


Figure S2. A) Primers used for the construction of the new leader sequence; the overlap regions are shown. B) Schematic representation of the PCR strategy used for the generation of the new leader sequence; the final PCR product was subcloned to pET-3a via the *Xba*I and *Bpu*1102I restriction sites.

Structural and thermal stability analysis of WT GITIM and single Cys mutants by circular dichroism.

In order to demonstrate that the Cys by Ala substitutions do not induce significant conformational alterations in GITIM, proteins were spectropolarimetrically studied. The circular dichroism spectra in the far-UV region for all the mutants are practically indistinguishable from the WT GITIM (Fig. S3A). In concordance, except for the C127A GITIM, the thermal stability of mutants was very similar to the WT GITIM (Fig. S3B). In sum, the results indicate that the overall structure of the single Cys mutants is well preserved.

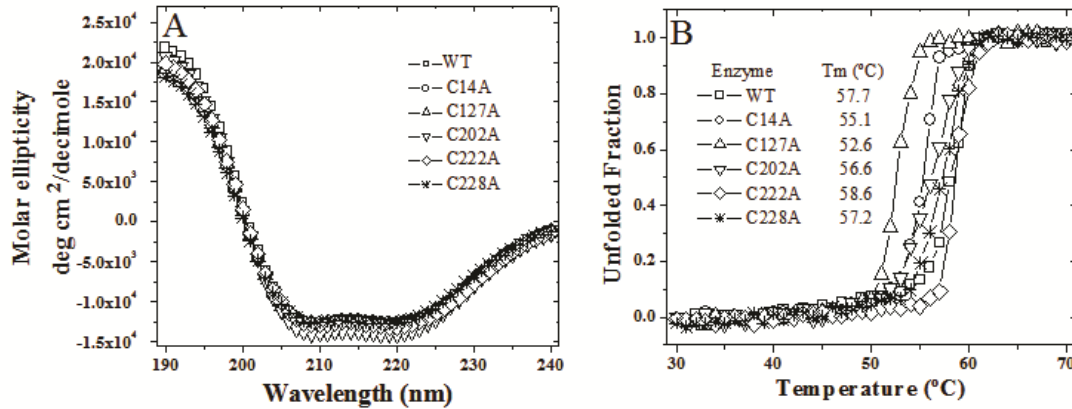


Figure S3. A) Far-UV circular dichroism spectra for WT GITIM and single Cys mutants. 100 $\mu\text{g/mL}$ of WT (\square), C14A (\circ), C127A (\triangle), C202A (∇), C222A (\diamond) or C228A ($*$) were scanned from 190 to 240 nm. B) Thermal stability of WT GITIM and single Cys mutants. The unfolding of 100 $\mu\text{g/mL}$ of WT (\square), C14A (\circ), C127A (\triangle), C202A (∇), C222A (\diamond) or C228A ($*$) was followed by the change in the circular dichroism signal at 222 nm as a function of the temperature increase. The scan temperature experiments were performed from 30 to 70°C at increments of 1°C per minute. The inset shows the $T_{m_{app}}$ for each protein.

MANUSCRITO ANEXO (ADDENDUM)

Inhibition of the Highly Conserved Active Site of Triosephosphate Isomerase by Perturbation of a Non-Conserved and Distant Region.

I) JUSTIFICACIÓN.

Como se describió anteriormente, los datos de inactivación en la GITIM indican que derivatizar a la Cys 222 con un grupo relativamente pequeño y neutro como el MMTS, induce la pérdida del 50 % de su actividad. En contraste, si se derivatiza con un grupo de mayores dimensiones y con carga neta negativa como el MTSCE ó DTNB, la GITIM se inactiva totalmente. Estos resultados sugieren que las características físico-químicas del derivatizante influyen de manera directa sobre el nivel de daño producido a la catálisis enzimática. Además, es muy probable que el mecanismo que conduce a la inactivación sea el mismo con cualquiera de las 3 sondas; sin embargo, a nivel atómico no existe descripción suficiente sobre cómo sucede este mecanismo.

Nuestro grupo de trabajo intentó cristalizar a la GITIM en presencia de los derivatizantes MMTS, MTSCE ó DTNB, con el objetivo de obtener información sobre las probables modificaciones estructurales. Desafortunadamente, no se lograron tener cristales estables en presencia de MTSCE y DTNB; sólo se obtuvieron cristales con MMTS con suficiente estabilidad para su difracción. No obstante, como ya se mencionó, con la estructura cristalográfica resuelta de GITIM-MMTS no se logró recabar información relevante que explicara el mecanismo de inactivación cuando se derivatiza la Cys 222.

Lo anterior fue motivante para que los Dres. Gloria Hernández Alcántara y Jesús Oria Hernández de nuestro grupo de trabajo, consideraran explorar una estrategia diferente para identificar cambios estructurales en condiciones de inactivación. La estrategia consistió en explorar qué características físico-químicas debería tener una molécula con potencial farmacológico que se alojara en la zona de la Cys 222 de la GITIM.

Esta idea se abordó utilizando la mutagénesis dirigida como herramienta para sustituir la Cys 222 por otro residuo aminoacil que imite las características físico-químicas de los derivatizantes. Por lo que el nivel de inactivación y las alteraciones estructurales promovidas por la sustitución se pueden evaluar en una muestra homogénea y, por tanto, clasificar el efecto de acuerdo a las propiedades del tipo de residuo aminoacil sustituido en la posición 222. En este trabajo se evaluaron los parámetros cinéticos y

estructurales de la GITIM al sustituir la Cys 222 por un residuo polar, no polar, hidrofóbico, hidrofílico, voluminoso, con carga neta positiva ó negativa. Es importante destacar que cada mutante potencialmente brindará información sobre el efecto en su función y estructura, lo que permitirá identificar las propiedades idóneas que debe tener nuestra molécula antiangiogénica. Una ventaja adicional de esta estrategia es que no se utilizan derivatizantes y en consecuencia, se evita modificar químicamente otros residuos de Cys; por lo que el efecto que se genere en la GITIM dependerá exclusivamente de la sustitución aminoacil en la posición 222.

Previamente, algunos grupos de trabajo evaluaron la importancia de los residuos aminoaciles para diferentes regiones en proteínas. Por ejemplo, un trabajo del 2002 donde Hernández-Alcántara y su grupo evaluaron las características que debe contener el residuo aminoacil en la posición 14 de la TbTIM para mantener la estabilidad en la enzima. Originalmente en esa región se localiza una Cys, sin embargo, estudios con derivatizantes demostraron que si la Cys se derivatiza con un grupo tiometilo, en la enzima se alteran sus propiedades cinéticas y estructurales (Hernández-Alcantara y cols., 2002). Este grupo realizó mutagénesis exhaustiva sustituyendo la Cys por cada uno de los otros 19 aminoácidos. Del análisis de sus resultados concluyeron que el residuo de aminoácido ideal para mantener a la enzima catalíticamente competente, debe tener una polaridad relativamente baja y un volumen de van der Waals entre 65 y 110 Å³. Por lo que cualquier otro volumen y/o carga ocasionaría inestabilidad de la TbTIM. Por otra parte, en otros trabajos se han realizado esfuerzos para identificar sitios importantes de la estabilidad de enzimas, sustituyendo los residuos nativos por cualquier otro aminoácido. (Clackson T. y Wells J. 1995; Bromberg Y. y Rost B. 2005; Gårdsvoll H. y cols., 2006). Por tanto, el empleo de esta herramienta puede ayudar a identificar las propiedades físico-químicas que son importantes para desestabilizarla estructuralmente.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar las características físico-químicas que se requieren para inactivar a la GITIM, sustituyendo la Cys 222 por otros residuos aminoaciles con diferentes propiedades físico-químicas.

II) ESTRATEGIA GENERAL.

Las mutantes fabricadas de la GITIM fueron C222M (Met por Cys), C222V (Val por Cys), C222N (Asn por Cys), C222D (Asp por Cys), C222F (Phe por Cys) y C222K

(Lys por Cys). Las mutantes C222V y C222M aumentarán el volumen de esa región 35 Å³, sin modificar la polaridad (similar a la derivatización con MMTS). Por el contrario, con las mutantes C222N y C222D se podrá obtener información del efecto que se genere al incluir en esa región polaridad y carga negativa respectivamente, sin cambiar sustancialmente el volumen. Adicionalmente, con la C222F se evaluará el efecto que provoca adicionar un grupo voluminoso y aromático (similar a la derivatización con DTNB) y finalmente, con la C222K se evaluará el efecto de añadir volumen y carga positiva en dicha región (similar a lo que adiciona el MTSCE).

Los datos que a continuación se muestran, aunque no forman parte de los objetivos del Doctorado, son un esfuerzo por descifrar los mecanismos de inactivación e identificar qué propiedades debe contener una molécula anti-GITIM para la región que proponemos.

Las enzimas producidas se caracterizaron cinética y estructuralmente por los investigadores anteriormente citados. Mi participación consistió en la cristalización de algunas de las enzimas y resolución de las estructuras cristalográficas que se mencionarán más adelante. La información que a continuación se presenta son un resumen de los resultados preliminares.

III) MATERIALES Y MÉTODOS.

a) Construcción, expresión y purificación de mutantes de la GITIM.

Las mutantes C222V, C222M, C222N, C222D, C222F y C222K se construyeron mediante mutagénesis sitio dirigida por PCR usando como templado el gen de la GITIM silvestre (López-Velazquez y cols., 2004). Se emplearon los oligonucleótidos directo 5'-GGAAGCAACXXXGAGAAGCT-3' y reverso 5'-AGCTTCTCXXXGTTGCTTCC-3', donde XXX es el sitio de la mutación en la posición 222 y corresponde a tripletes que codifican para los residuos de aminoácido antes mencionados. Los oligonucleótidos externos (que flanquean al gen) fueron el T7 promotor y T7 terminador (Novagen). Todos los oligonucleótidos empleados se sintetizaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

El gen de cada mutante obtenida por PCR se secuenció en la Unidad citada, para corroborar su fidelidad e identificar la mutación deseada. Los genes se clonaron en el plásmido pET3a-HisTEVP, las enzimas se sobre-expresaron y se purificaron mediante cromatografía de afinidad por níquel, como se explicó en la sección 4.1.

Con las enzimas purificadas a más del 95 %, se realizaron ensayos cinéticos (sección 4.3); ensayos espectroscópicos (sección 4.4); ensayos de unión al 2-PG a la GITIM y sus mutantes (sección 4.6).

Por último, se realizaron ensayos de cristalización y a continuación se explicará en que consistieron dichos ensayos, donde fue más extensa mi participación.

b) Cristalización, colecta de datos de difracción y determinación de las estructuras de las mutantes de la GITIM.

Con el propósito de obtener información estructural a nivel atómico, se cristalizaron algunas de las enzimas. Como previamente se mencionó, para obtener cristales de la GITIM debe considerarse partir de la mutante C202A (Enríquez-Flores y cols., 2011). Por lo anterior, las enzimas fabricadas incluyeron tanto la sustitución en la posición 222 como la sustitución en la posición 202. Las mutantes de la GITIM (C202A, C202A/C222N, C202A/C222D, C202A/C222K y C202A/C222F) se sobre-expresaron y purificaron por la técnica de afinidad en columna de níquel como se reportó anteriormente.

Para cristalizar las enzimas se empleó el método de difusión de vapor en gota sedente, se utilizaron los reactivos de la Hampton Research, que son una serie de soluciones precipitantes que ayudan a la cristalización de proteínas. Se adicionaron 100 μ L de estas soluciones en cajas de 96 pozos donde por cada pozo hay un compartimiento mayor en la parte inferior y uno menor en la parte superior. Las enzimas se depositaron en el pozo superior a concentraciones de 30 mg/mL para la C202A, 18 mg/mL para la C202A/C222N, 20 mg/mL para C202A/C222D, 34 mg/mL para la C202A/C222K y 35 mg/mL para la C202A/C222F. Todas las enzimas se incubaron en presencia de 5 mM de 2-PG. Posteriormente, las placas se sellaron con una película plástica y se guardaron a 4°C. Después de varias semanas, se obtuvieron cristales de cada una de ellas, excepto de la C202A/C222F, enseguida se criopreservaron para su posterior difracción.

Los cristales se llevaron a la Ciudad de Chicago E. U. al Sincrotrón Advance Photon Source, donde se obtuvo una línea en la estación LS-CAT para su difracción.

Desafortunadamente, para el cristal de la C202A/C222K, no fue posible obtener una buena colección de datos y no se continuó con su procesamiento. Sin embargo, con el resto de los cristales fue posible obtener una buena colecta de datos, por lo que enseguida se procesaron con MOSFLM (Leslie A. 2006) y se redujeron con SCALA (Evans P. 2006). Para la obtención de las fases, se utilizó el método de remplazo

molecular con el programa PHASER FOR MR de la suite CCP4 (McCoy A. y cols., 2007). Se utilizaron como modelo inicial las coordenadas de la GITIM (PDB 2DP3). Posteriormente, las estructuras se refinaron con el programa REFMAC 5 de la suite CCP4 (Murshudov G. y cols., 2011) y por último, se construyó un modelo con el programa COOT (Emsley P. y Cowtan K. 2004).

IV) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

a) Caracterización espectroscópica de las proteínas recombinantes.

Brevemente, la caracterización espectroscópica demostró que en todas las mutantes, los espectros de DC en UV lejano fueron similares al espectro de DC de la GITIM silvestre. Análogamente, en los ensayos de fluorescencia intrínseca se obtuvieron espectros de emisión de las mutantes, semejantes al espectro de emisión de la GITIM silvestre.

b) Caracterización cinética de la GITIM silvestre y sus mutantes de Cys.

Previamente se mencionó que la derivatización de la Cys 222 por sondas con distintas propiedades físico-químicas, induce inactivación diferencial y sus parámetros cinéticos se alteran significativamente. Por tanto, es útil suponer que al sustituir la Cys 222 por otros residuos de aminoácido con propiedades físico-químicas similares a las sondas MMTS, MTSCE ó DTNB, se obtendrían enzimas perturbadas en magnitud similar a lo que provocan los derivatizantes.

En relación a lo anterior, el Cuadro 7 muestra los principales parámetros cinéticos de las enzimas silvestre y mutantes. En algunas de ellas disminuyeron significativamente estos valores; sin embargo, en otras la mutación prácticamente no indujo modificación. Por ejemplo, en la GITIM C222V (donde la Val es 31.5 \AA^3 mas voluminosa que la Cys) la afinidad por el sustrato ó Km se incrementó ligeramente. Por tanto, esta sustitución fue esencialmente bien tolerada. En la mutante de la GITIM C222M, se disminuyeron tanto su velocidad máxima como la afinidad por el sustrato; cabe mencionar que las alteraciones en esta mutante fueron muy similares a las que se obtuvieron por su derivatización con MMTS (Enríquez-Flores y cols., 2001), por tanto se deduce que si aumentamos 54 \AA^3 a la Cys, la enzima se afectará en su actividad aproximadamente al 50%. Por otro lado, en la C222N se alteraron sus parámetros cinéticos más fuertemente que la C222M, la afinidad disminuyó 4.5 veces mientras que la eficiencia catalítica cayó 10 veces. Por tanto, si se incluye polaridad en este ambiente, sin aumentar el volumen, es poco tolerado por la enzima.

Las mutantes C222D, C222F, C222K se alteraron con mayor intensidad en sus parámetros cinéticos, como lo muestra en Cuadro 7.

Enzima	V _{max}	K _m	k _{cat} x 10 ⁵	k _{cat} /K _m x 10 ⁵	No. de veces menos eficiente (catalíticamente) que la GITIM silvestre
GITIM	8050 ±444	0.62 ±0.22	4.4	7	-
C222V	9560 ±467	0.96 ±0.12	5.2	5.4	1.29
C222M	3100 ±170	1.85 ±0.46	1.68	0.91	7.7
C222N	3653 ±107	2.79 ±0.73	1.99	0.71	9.8
C222D	3717 ±421	4.88 ±0.81	2	0.415	16.8
C222F	1665 ±163	3.9 ±0.46	0.9	0.23	30.4
C222K	255 ±33	3.1 ±0.64	0.13	0.044	159

Cuadro 7. Constantes cinéticas de la GITIM WT y mutantes de la Cys 222. Se tomaron las velocidades iniciales a concentraciones de GAP de 0.3 a 3 mM. Los datos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten, obteniéndose la V_{max} y la K_m.

En el Cuadro anterior se muestra que si se añade carga negativa a esta región sin aumentar el volumen (por ejemplo, GITIM C222D), la eficiencia catalítica cae 16 veces siendo la adición de cargas negativas una perturbación más grave que la polaridad. Por tanto, la enzima tendrá dificultades para catalizar si se aloja una molécula que tenga carga negativa. Por el contrario, si adicionamos un grupo voluminoso (GITIM C222F) de 81 Å³ mayor que la Cys, se alterará 30 veces la eficiencia catalítica. Por último y de mayor importancia, en la C222K se produjo una fuerte caída en la capacidad de unir a su sustrato, así como en la eficiencia catalítica que cayó 159 veces; por lo que esta sustitución disminuyó extensivamente la catálisis de la enzima. Este dato fue el más contrastante de los aquí presentados y sugiere que un grupo de 60 Å³ mayor que la Cys, con carga positiva, tiene la capacidad de alterar gravemente la catálisis y afinidad a través de la zona que proponemos como blanco.

Para complementar esta información, un dato relevante obtenido de la estructura cristalográfica (PDB 2DP3) es que en la región 222 hay un ambiente altamente hidrofóbico. De los siete residuos de aminoácido que hay a 5 Å a la redonda del azufre gamma de tal Cys, cuatro de ellos (Gly 219, Phe 234, Met 248 e Ile 251) son hidrofóbicos. En la proximidad existe también un ambiente relativamente polar, ya que los oxígenos del carbono carbonilo de los residuos Asn 218 y Gly 219 están a distancias de 3.5 y 4 Å respectivamente de esta zona Figura 14.

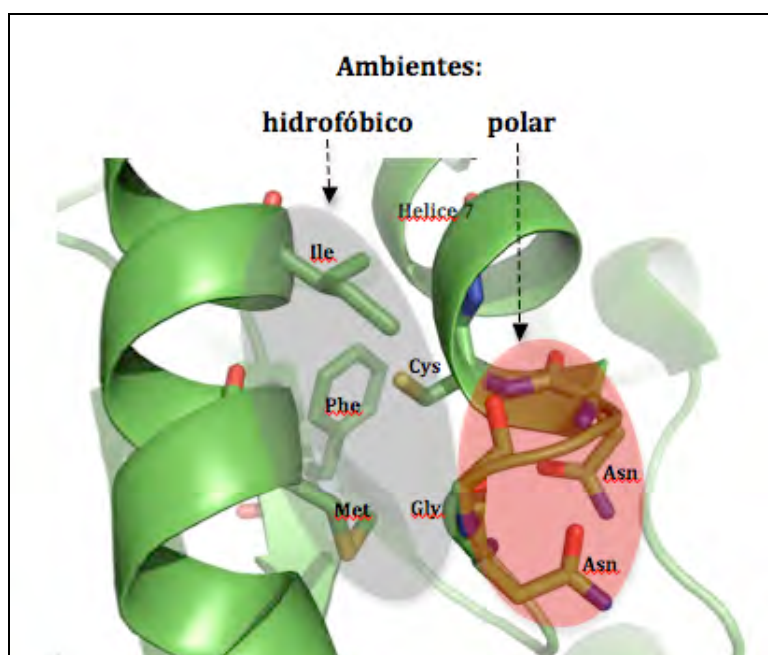


Figura 14. Ambientes cercanos a la Cys 222. Se sombreadon en color gris el ambiente hidrofóbico y en color rojo el ambiente polar. Los residuos de aminoácido seleccionados, están en un radio de 5 Å alrededor del azufre gamma de la Cys 222. La figura se preparó con PyMOL.

Tomando en cuenta esta información, sugerimos que estas propiedades pueden influir sobre la tolerancia de residuos de aminoácido con características hidrofóbicas y de volumen como Val ó Ala (Enríquez-Flores y cols., 2008).

c) Unión del 2-PG a la GITIM silvestre y sus mutantes.

Previamente algunos reportes demostraron que las asas 6 y 7 de la TIM participan en la catálisis y fijación de sustrato respectivamente (Norledge B. y cols., 2001). En relación a esto, es importante mencionar que la Cys 222 se localiza al final del asa 7 y principio de la hélice 7 (Figura 14); por tanto, este residuo está relativamente cerca de sitios relevantes para la catálisis y unión del sustrato. Además, hemos demostrado que es importante mantener esta zona en condiciones cercanas a la nativa; ya que si se modifica este microambiente se alteran la catálisis y unión de ligando.

En concordancia con lo anterior y con el propósito de evaluar si el sitio catalítico se perturbó, se obtuvieron por medios espectroscópicos la K_D de la GITIM y sus mutantes. Los resultados muestran que las K_D de la C222V y C222M sólo aumentaron dos y tres veces, respectivamente (Cuadro 8), algo similar a lo obtenido con la derivatización con MMTS (sección 5.4).

GITIM	K_D
Silvestre	26.4 ±2.6
C222V	57.4 ±7.1
C222M	79.4 ±8.5
C222N	113.3 ±41.7
C222D	ND
C222F	ND
C222K	ND

Cuadro 8. Constantes de unión al ligando 2-PG. Los valores de K_D para 2-PG se obtuvieron del cambio en la señal de fluorescencia de la GITIM, en respuesta a la adición del ligando. ND, no pudo ser determinado.

El Cuadro 8 ilustra que el valor de K_D de la C222V fue similar al reportado recientemente para la GITIM C222A (Enríquez-Flores y cols., 2011); por lo que este valor sugiere que la afinidad por el 2-PG no se modifica significativamente, si se incluye un grupo hidrofóbico y de dimensiones similares a la Cys. Por otro lado si se incrementa el volumen los efectos son más notorios, tal es el caso de la C222M donde la K_D aumentó 3 veces. Este resultado fue similar a lo obtenido por la derivatización con MMTS (sección 5.4). Por tanto y como lo sugieren los resultados de la K_D, los grupos polares ligeramente mayores que la Cys, son bien tolerados por la GITIM y prácticamente no modifican la unión a su ligando.

En contraste, la K_D de la C222N fue 4.3 veces mayor que la de la silvestre. En este caso sólo se modificó la polaridad sin afectar significativamente el volumen. Desafortunadamente la K_D de las enzimas C222D, C222F y C222K no pudo ser determinada debido a que la fluorescencia de estas enzimas no se modificó al añadir 2-PG y, por tanto, en estos casos no fue posible aplicar la ecuación 2. Este situación es similar al caso de la derivatización con MTSCE (sección 5.4).

Por tanto, tomando estos datos conjuntamente podemos sugerir que si se añaden tanto grupos voluminosos, polares y/o con carga, la GITIM pierde la capacidad de unir a su ligando.

d) Estabilidad conformacional de la GITIM wt y sus mutantes.

La estabilidad conformacional de una proteína puede evaluarse a través de la desnaturalización térmica. Los ensayos anteriormente descritos nos indican que estas enzimas se perturbaron diferencialmente en su catálisis y afinidad, de acuerdo al tipo de sustitución aminoacil. Sin embargo, al evaluarse mediante DC y fluorescencia intrínseca, se demostró que las distintas mutaciones no afectaron significativamente a nivel global la conformación de las enzimas.

En contraste, los ensayos de estabilidad térmica evidenciaron cambios importantes. Las enzimas que no sufrieron alteración significativa en la estabilidad térmica respecto a la silvestre, fueron la C222V, C222M y C222F. Interesantemente, las enzimas que se afectaron en mayor proporción, fueron aquellas donde se incluyó polaridad ó carga, siendo el caso más severo la C222K, donde la estabilidad térmica disminuyó 6.3 °C, siendo esta última la más perturbada de todas las enzimas.

e) Estructuras cristalográficas de la GITIM C202A, C202A/C222N y C202A/C222D.

La intención de obtener estructuras cristalográficas de las enzimas mutantes, fue el de contribuir al discernimiento de los mecanismos moleculares de la inactivación. Por tanto, se obtuvieron cristales de algunas de ellas y enseguida se resolvieron las estructuras cristalográficas de las enzimas C202A, C202A/C222N y C202A/C222D en presencia del ligando 2-PG. El Cuadro 9 muestra un panorama general de la estadística de estas estructuras.

Parámetro	C202A	C202A/C222N	C202A/C222D
Grupo espacial	I222	I222	P1
Moléculas por unidad asimétrica	1	1	20
Dimensiones de la celda	a = 55.54 b = 102.02 c = 118.76	a = 55.57 b = 100.47 c = 118.147	a = 105.2 b = 131.5 c = 132.54
Resolución (Å)	1.6	1.45	2.7
Completeness	99.05 %	99.8 %	88.02 %
R _{work} (%)	17.1	18.7	23.3
R _{free} (%)	19.6	20.6	26.2
Factor B promedio (Å ²)	22.8	18.3	48.1
Gráfica de Ramachandran	Permitidas: 97.02 % No permitidas: 2.55 %	Permitidas: 97.82 % No permitidas: 1.31 %	Permitidas: 97.14 % No permitidas: 2.14 %

Cuadro 9. Parámetros estadísticos de las proteínas cristalizadas por el método de difusión de vapor en gota asentada.

Como se observa en el Cuadro 9, las estructuras tuvieron distinto nivel de resolución. La de menor resolución fue la C202A/C222D y, de entre las tres estructuras, concuerda con ser la más alterada cinéticamente. En las estructuras de la GITIM C202A y C202A/C222N, el grupo espacial fue el mismo que el reportado previamente para la GITIM C202A (PDB 2DP3), mientras que la C202A/C222D sólo se pudo resolver con el grupo de menor simetría. Es relevante mencionar que la estructura cristalográfica de la C202A/C222D presentó 20 monómeros por unidad asimétrica. Lo anterior indica diferencias estructurales entre las cadenas ahí presentes y, como se verá más adelante, son de importancia para explicar qué regiones están afectadas. Las otras dos estructuras sólo presentaron un monómero por unidad asimétrica.

En primer lugar, se corroboró la zona de la mutación para cada enzima y se observó la densidad electrónica correspondiente (dato no mostrado). Enseguida y en una primera inspección de las estructuras, se destacó la presencia de 2-PG en la C202A y C202A/C222N. Se identificó densidad electrónica en el sitio catalítico (Lys 13, His 96 y

Glu 174), correspondiente a una molécula de estas características, la Figura 15 muestra este resultado.

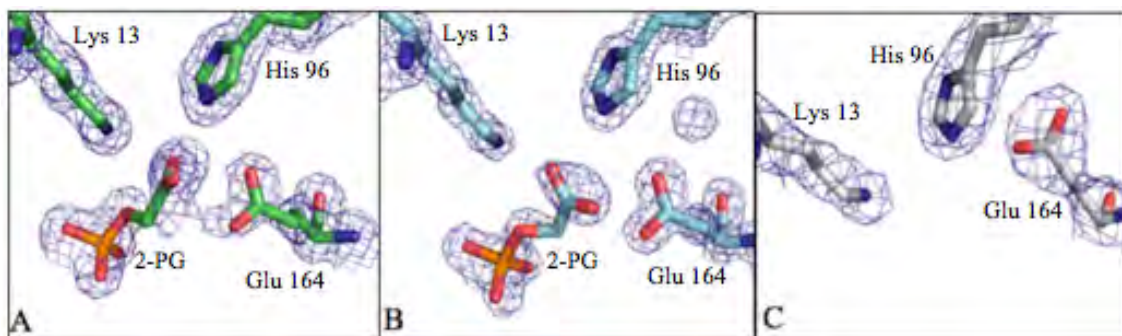


Figura 15. Representación del sitio catalítico de la GITIM C202A (A), C202A/C222N (B) y C202A/C222D (C). Se muestra densidad electrónica correspondiente a una molécula de 2-PG en el panel A y B. En el panel C se observa el sitio catalítico vacío (por simplicidad sólo se muestra 1 de las 20 cadenas de esta estructura).

Por tanto, es claro que el sitio catalítico está ocupado por el ligando en dos de las enzimas. En contraste, en ninguno de los 20 monómeros que conforman la celda unitaria de la C202A/C222D se identificó densidad electrónica de este ligando, a pesar de haber incubado con 5 mM de 2-PG. Por tanto, este resultado refuerza lo anteriormente descrito: esta mutante presenta muy baja afinidad por sus ligandos.

Otro análisis realizado fue la superposición de las estructuras (Sumathi K. y cols., 2006), con la intención de identificar diferencias entre ellas. Inicialmente se alineó la estructura previamente reportada de la GITIM (PDB 2DP3) contra la C202A nueva, mostrando que prácticamente ambas enzimas son idénticas, con desviación media del carbono alfa (RMSD) de 0.4 Å. Por lo que la nueva estructura que está a mejor resolución fue la que se tomó como modelo de comparación contra las demás estructuras. También se alinearon estructuralmente la C202A contra la C202A/C222N, con RMSD de 0.38 Å. Por lo se concluye que la estructura en general se preservó. Para el caso de la C202A/C222D, con 20 cadenas en la celda unitaria, se hizo una comparación contra todas ellas y en la Figura 16 se muestra este resultado.

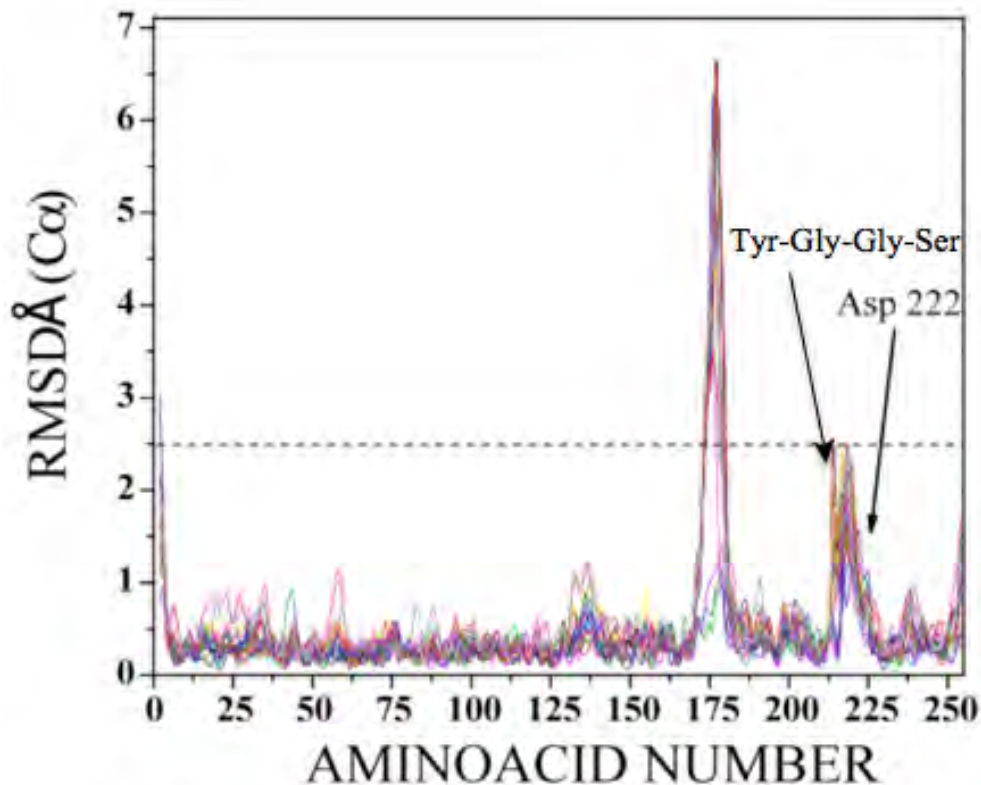


Figura 16. Diferencias estructurales de la C202A/C222D. Se alinearon las 20 cadenas alineándose entre ellas y se compararon contra la C202A. Se muestran 2 regiones en la enzima que son significativamente diferentes. Para este análisis se utilizó el servidor de alineamiento estructural 3dss.

Como se observa en la Figura 16, de los aminoácidos 5 hasta 160 prácticamente en las 20 cadenas no hubo diferencia en el RMSD conforme a la nativa; sin embargo, en los aminoácidos 170 a 178 hay diferencias importantes. Esta zona corresponde al asa catalítica y se ha localizado tanto en conformación abierta como cerrada (Rozovsky S. y cols., 2001). Además, se ha reportado que esta asa se desplaza más de 6 Å funcionando como una compuerta molecular. En la Figura 16 se aprecia una diversidad de conformaciones en esta zona, con desviaciones de hasta 6.5 Å. Por tanto, la variabilidad de las conformaciones se consideran dentro de las características reportadas para este tipo de proteínas. Otra zona alterada es la que corresponde de los aminoácidos 213 a 223. En esta región se localiza el motivo altamente conservado Tyr-Gly-Gly-Ser. Anteriormente se mencionó que este motivo conservado participa en el correcto posicionamiento y anclaje del sustrato. En la estructura de la C202A nueva, se observa que el N de la Ser 216 forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo fosfato del ligando, Figura 17.

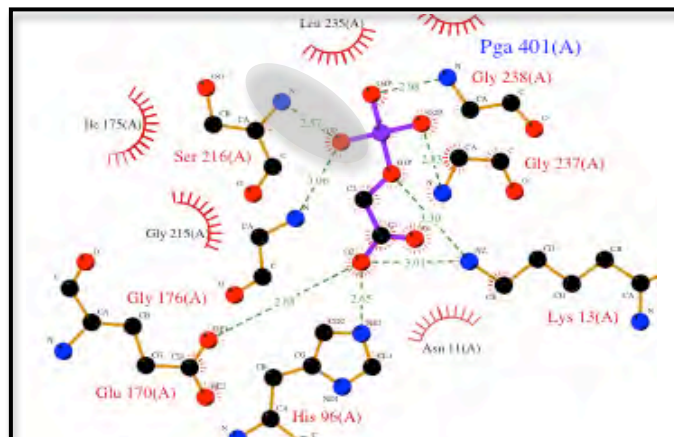


Figura 17. Ligplot (Wallace A. y cols., 1995) de la C202A donde se muestran los contactos entre el ligando y la enzima, representados en 2 dimensiones para mejor apreciación. En la zona sombreada se observa la distancia entre el N de la ser 216 y el Oxígeno de l grupo fosfato del ligando.

Los contactos que se mantienen entre los fosfatos del ligando y la enzima son muy importantes. Por lo que con los datos de la Figura 16 y de acuerdo a la Figura 17, la región del motivo Tyr-Gly-Gly-Ser donde se localiza la Ser 216 se movió considerablemente. Por tanto, esta zona se desestabilizó conformacionalmente y, muy probablemente, se alteró la función de anclaje del sustrato. También se ha descrito que en esta zona se localizan aguas estructurales conservadas (Kursula, I. y cols., 2004) que forman puentes entre el oxígeno del grupo fosfato del ligando y los nitrógenos de la Gly 215 y Ala 217. En la estructura cristalográfica de la C202A, una de estas aguas se enumera como la 18 (dato no mostrado). Estos residuos aminoáciles se localizan adyacentes a la Ser 216 y también fueron afectados por la inestabilidad conformacional de esta zona en la C202A/C222D. Otro dato interesante que se puede extraer de las estructuras es el grado de movilidad vibracional de cada átomo ó residuo de aminoácido; tal parámetro se denomina factor B. Esencialmente en las estructuras con ligando no se observaron variaciones en casi ninguna parte de las enzimas. En contraste, la C202A/C222D se perturbó fuertemente desde la región adyacente a la mutación extendiéndose hasta el motivo conservado. Los colores de la Figura 18 representan este parámetro: colores azules corresponden a valores más bajo de factor B, mientras que los colores en rojo corresponden a valores mayores.

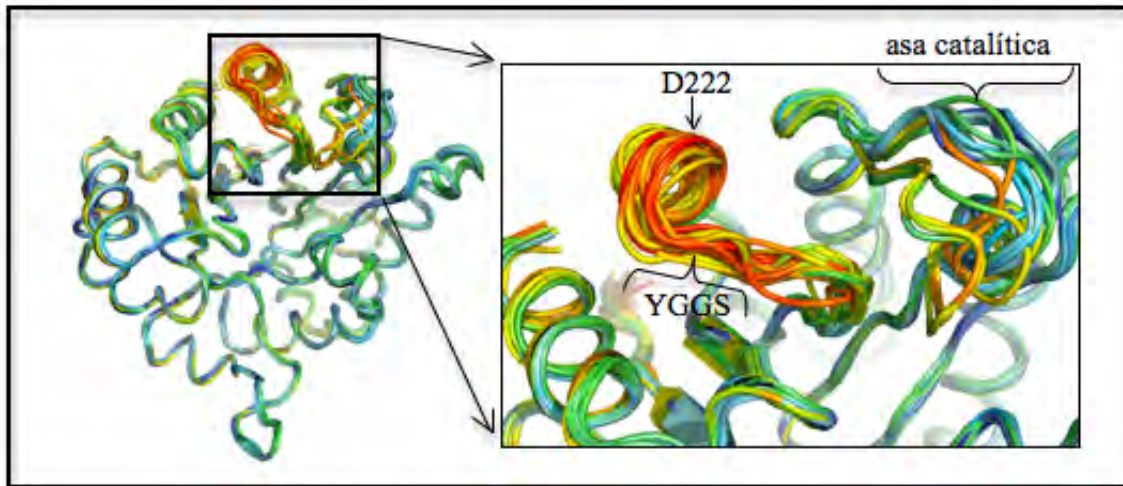


Figura 18. Panel de la izquierda, representación en listones de las 20 cadenas superpuestas de la C2020A/C222D. El panel de la derecha es una acercamiento del motivo Tyr-Gly-Gly-Ser y del asa 6. La figura se coloreó de acuerdo a los factores B, en azul se representan factores mas bajos, mientras que en rojo son los valores mas altos. La figura se preparó con el programa PyMOL.

Es evidente que la zona entre el motivo conservado y la mutación, a diferencia del resto de la estructura, están vibracionalmente más inestables. Se observa además una diversidad de conformaciones en dicha región y, a excepción del asa 6 ó asa catalítica, en el resto de la molécula las 20 cadenas empalman con bastante precisión. Para identificar de forma particular los aminoácidos que se modificaron estructuralmente, en la Figura 19 se esquematizó dicha perturbación.

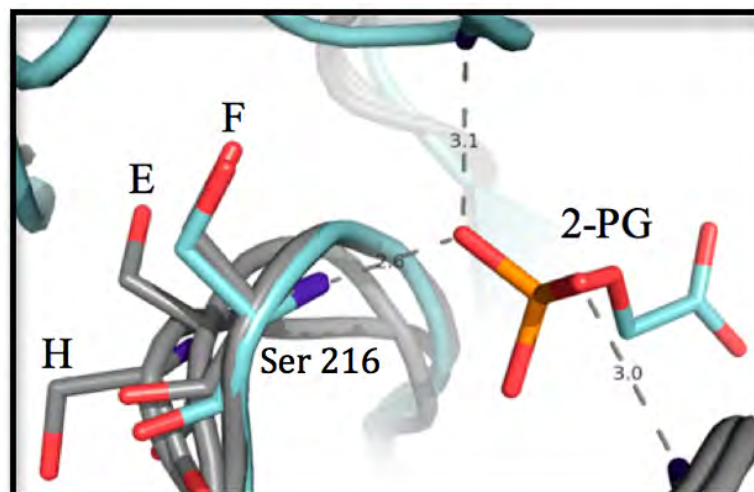


Figura 19. Representación en listones y varillas de las cadenas superpuestas E, F y H de la C202A/C222D (gris) y la C202A (cian) con su ligando. Además, se ilustran el 2-PG y las distancias en Å de sus oxígenos y residuos de aminoácido de la C202A. La figura se preparó con PyMOL.

En la Figura 19 se aprecian sólo tres de las 20 cadenas; por simplicidad y mejor apreciación se superpusieron las cadenas E, F y H. Además, se comparan con la estructura nativa C202A en presencia de su ligando (cian). La figura muestra las distancias que deben prevalecer entre el oxígeno del grupo fosfato del ligando 2-PG y el

nitrógeno de la Ser 216. Algunas conformaciones como F, hacen contacto con el ligando (empalman con la C202A); por el contrario, otras como E y H se alejan más de 2 Å del sitio de contacto, por lo que potencialmente se perdería en estas condiciones toda posibilidad de mantener el ligando unido al sitio catalítico.

No existen reportes de que ese motivo conservado se desplace tal magnitud. Sin embargo, en referencia a la suposición de que pudiera variar entre TIM's de diferentes especies, alineamos estructuralmente varias de ellas (TbTIM, TcTIM, PftTIM, EhTIM y HuTIM). Al revisarse esta zona, se encontró que la desviación no fue mayor de 1 Å (dato no mostrado); por tanto, esta evidencia indica que es importante que esta zona se mantenga lo mas próxima a la cavidad del sitio catalítico para realizar adecuadamente su función. Es evidente que al perturbarse la zona de la Cys con una carga negativa (Asp), el efecto se transmite hacia la zona catalítica a través del motivo Tyr-Gly-Gly-Ser.

Por otro lado, se desconoce porqué en la estructura C202A/C222N no se apreciaron modificaciones que expliquen la alteración en los parámetros cinéticos y constantes de unión de ligando. Las distancias de los contactos de esta enzima con el 2-PG se compararon con los correspondientes en la C202A. No observamos diferencias significativas, el análisis incluyó la zona de la mutación y aminoácidos de su alrededor. Sin embargo, no pudimos identificar diferencias que pudieran indicarnos cambios conformacionales relevantes. Sin embargo, los ensayos bioquímicos nos demuestran que hubo modificación de sus parámetros cinéticos y de su valores de K_D . Una probable explicación puede ofrecerse por la presencia de ligando en esta enzima. Se ha reportado que cuando el sitio catalítico de la TIM se encuentra ocupado por un ligando, el grado de compactación es mayor (Aparicio R. y cols., 2003), por lo que los potenciales cambios (como ya se mencionó para la C202A/C222D) podrían haberse ocultado por esa compactación, haciendo imposible su apreciación en estas condiciones.

V) CONCLUSIONES.

Los resultados indican que la modificación de la Cys 222 por mutagénesis dirigida ó derivatización con las sondas, inducen la inactivación en la GITIM por mecanismos similares.

La modificación de la Cys 222 genera un sitio catalítico incompetente.

El mecanismo de inactivación probablemente es a través de la alteración del motivo conservado Tyr-Gly-Gly-Ser y la consecuente pérdida de unión de los ligandos.

VI) REFERENCIAS.

Hernández-Alcántara G, Garza-Ramos G, Hernández GM, 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.

Clackson T, Wells J. 1995. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science*. **267**: 383-386.

Gårdsvoll H, Gilquin B, Le Du MH, Ménèz A, Jørgensen T, Ploug M. 2006. Characterization of the functional epitope on the urokinase receptor. Complete alanine scanning mutagenesis supplemented by chemical cross-linking. *J Biol Chem*; **281**: 19260-19272.

Bromberg Y, Rost B. 2008. Comprehensive *in silico* mutagenesis highlights functionally important residues in proteins. *Bioinformatics*. **24**: 207-212.

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

Enríquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernández-Alcántara G, Oria-Hernández J, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Hernández G, de la Mora-de la Mora I, Castillo-Villanueva A, García-Torres I, Méndez ST, Gómez-Manzo S, Torres-Arroyo A, López-Velázquez G, Reyes-Vivas H. 2011. Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: a study for antiparasitic drug design. *Proteins*. **79**: 2711-2724.

Leslie, A. G. The integration of macromolecular diffraction data. 2006. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **62**: 48-57.

Evans, P. Scaling and assessment of data quality. 2006. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **62**: 72-82.

McCoy A, Grosse-Kunstleve R, Adams P, Winn M, Storoni L, y Read R. 2007. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr.* **40**: 658-674.

Murshudov, G, Skubák, P, Lebedev, A, Pannu, N, Steiner, R, Nicholls, R, Winn, M, Long F, y Vagin A. 2011. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **67**: 355-367.

Emsley P, y Cowtan K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **60**: 2126-2132.

DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.

Enríquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernandez-Alcántara G, De la Mora-De la Mora I, Gutiérrez-Castellón P, Carvajal K, López-Velazquez G, Reyes-Vivas H. 2008. Species-specific inhibition of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Mol Biochem Parasitol.* **157**: 179-186.

Norledge B, Lambeir A, Abagyan R, Rottmann A, Fernandez A, Filimonov V, Peter M, Wierenga R. 2001. Modeling, mutagenesis, and structural studies on the fully conserved phosphate-binding loop (Loop 8) of triosephosphate isomerase: Toward a new substrate specificity. *Proteins.* **42**: 383-389.

Sumathi K, Ananthalakshmi P, Roshan MN, Sekar K. 2006. 3dSS: 3D structural superposition. *Nucleic Acids Res.* **34**: 128-132.

Rozovsky S, Jogl G, Tong L, y McDermott E. 2001. Solution-state NMR investigations of triosephosphate isomerase active site loop motion: ligand release in relation to active site loop dynamics. *J Mol Biol.* **310**: 271-280.

Wallace A C, Laskowski R y Thornton J. 1995. LIGPLOT: A program to generate

schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Prot. Eng.* **8**: 127-134.

Kursula I, Salin M, Sun J, Norledge V, Haapalainen A, Sampson N, y Wierenga R. 2004. Understanding protein lids: structural analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Protein Eng Des Sel.* **17**: 375-382.

Aparicio R, Ferreira S, y Polikarpov I. 2003. Closed conformation of the active site loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: evidence of conformational heterogeneity. *J Mol Biol.* **334**: 1023-1041.