



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNAM  
POSGRADO** 

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS.  
FACULTAD DE QUÍMICA.

QUIMERAS DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA:  
TRANSFORMACIÓN PROGRESIVA DE LA  
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Trypanosoma  
cruzi* EN LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE  
*Trypanosoma brucei*.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

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

M. en C. Itzhel García Torres.

Tutor: Dr. Ruy Pérez Montfort

MÉXICO, D.F

JUNIO, 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



**El jurado de Examen de grado estuvo constituido por:**

**Presidente: Dr. Armando Gómez Puyou, Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

**Vocal: Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra, Facultad de Química, UNAM.**

**Secretario: Dr. Miguel Costas Basín, Facultad de Química, UNAM**

**Suplente: Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, Facultad de Medicina, UNAM.**

**Suplente: Dr. Alfredo Torres Larios, Instituto de Fisiología, UNAM.**

## Indice.

Abreviaturas.....	6
Resumen.....	8
Abstract.....	9
<b>1. Introducción .....</b>	<b>10</b>
1.1 Enfermedades causadas por <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Trypanosoma brucei</i> .....	10
1.2 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i> .....	10
1.3 Metabolismo energético en tripanosomátidos. ....	13
1.4 Diferencias en el metabolismo energético de <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i> . ....	17
1.4.1 Metabolismo energético en la forma sanguínea de <i>T. brucei</i> .....	17
1.4.2 Metabolismo energético en la forma procíclica de <i>T. brucei</i> y en todas las fases de <i>T. cruzi</i> .....	19
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>24</b>
2.1 La triosafosfato isomerasa como blanco terapéutico para el diseño de fármacos antiparasitarios. ....	24
2.2 Características estructurales de la triosafosfato isomerasa. ....	25
2.3 La interfase de la triosafosfato isomerasa y la importancia del residuo en la posición 14 para la estabilidad del dímero. ....	29
2.4 Diferencias y similitudes entre TbTIM y TcTIM.....	33
2.5. ¿Por qué dos enzimas con características similares presentan distinto comportamiento ante el efecto de los reactivos de grupo sulfhidrilo?.....	37
2.6. La triosafosfato isomerasa como modelo de estudio para entender la relación estructura-función en las proteínas.....	42
2.6.1 Distintos acercamientos para estudiar la relación estructura-función en la triosafosfato isomerasa.....	42
2.6.2 Las interacciones a larga distancia juegan un papel importante en la estabilidad y plegamiento de las proteínas con plegamiento de tipo barril TIM.....	44
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>47</b>
3.1 Objetivo general.....	47
3.2 Objetivos particulares. ....	47
<b>4. Materiales y Métodos. ....</b>	<b>48</b>
4.1 Nomenclatura utilizada para nombrar a las distintas proteínas quiméricas....	48
4.2 Diseño de los genes de las proteínas quiméricas. ....	48
4.3 Sobreexpresión y purificación de las proteínas quiméricas.....	50
4.4 Determinación de la actividad catalítica de TbTIM, TcTIM y de las enzimas quiméricas. ....	52
4.5 Ensayos de inactivación de las enzimas silvestres y quiméricas con MMTS. 53	
4.6 Cuantificación de cisteínas derivatizadas con DTNB. ....	54
4.7 Cristalización de la quimera TcTIM 2, 3, 5-8, difracción de rayos X, y recolección de los datos. ....	55
4.8 Determinación del pKa de la cisteína de interfase de las enzimas silvestres y algunas quimeras. ....	57
<b>5. Resultados .....</b>	<b>58</b>
5.1 Diseño y construcción de las proteínas quiméricas. ....	58

5.2	Parámetros cinéticos de las proteínas quiméricas.....	60
5.3	Efecto del MMTS en la actividad de las quimeras susceptibles. ....	61
5.4	Importancia de la región 4 en la susceptibilidad diferencial de TbTIM y TcTIM ante el efecto del MMTS.....	62
5.5	El papel de la región 1 en la susceptibilidad de TcTIM y TbTIM a altas concentraciones de MMTS. ....	64
5.6	Cuantificación de cisteínas derivatizadas con DTNB. ....	66
5.7	Análisis de las regiones 1 y 4 en TbTIM y TcTIM y la quimera TcTIM 2, 3, 5-8	71
5.8	Determinación del pKa de la cisteína de interfase en la quimera TcTIM 2,3,5-8 y algunas otras quimeras.....	72
5.9	Avances en la identificación del número mínimo de aminoácidos involucrados en la diferencia de susceptibilidad de TcTIM y TbTIM ante el MMTS. ....	75
6.	Discusión.....	82
6.1	Flexibilidad de la triosafosfato isomerasa para generar quimeras.....	82
6.2	A partir de una secuencia de 251 aminoácidos fue posible disectar dos regiones cruciales en la inactivación de TbTIM y TcTIM por reactivos de grupo sulfhidrilo. ....	83
6.3	Efecto de las regiones 1 y 4 en la inactivación de TcTIM y TbTIM por agentes derivatizantes. ....	84
6.4	Análisis de las regiones 1 y 4 de TcTIM y TbTIM. ....	89
6.4.1	Diferencias en las regiones 1 y 4 entre TcTIM y TbTIM. ....	89
6.4.2	Importancia de las regiones 1 y 4 en otras características de la TIM.....	91
7.	Conclusiones. ....	93
8.	Perspectivas. ....	94
9.	Referencias Bibliográficas.....	96
10.	Artículos publicados .....	106

## Abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina bifosfato
ASA	Área de superficie accesible
BCA	Ácido bicinconínico
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen diamino tetraacético
$\alpha$ -GDH	$\alpha$ - glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
GAP	Gliceraldehído 3-fosfato
G3P	Glicerol 3- fosfato
IPTG	Isopropil-b-D tiogalactopiranosido
<i>k</i> <sub>cat</sub>	Constante catalítica
kDa	Kilodaltones
<i>K</i> <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria-Bertani
LmTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Leishmania mexicana</i> .
MMTS	Metil metano tiosulfonato
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fenil-metano sulfonil fluoruro
RMS	Root mean square
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
TEA	Trietanolamina

TE	Trietanolamina/EDTA
TIM	Triosafosfato isomerasa
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i> .
TcTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> .
Tm	Temperatura aparente de desnaturalización
Vmax	Velocidad máxima
V <sub>0</sub>	Velocidad inicial



## Resumen

El estudio de la relación estructura-función en las proteínas es un tema que mantiene ocupados a varios grupos de investigación. Todos tienen un objetivo principal: identificar los aminoácidos responsables de una función específica en una proteína dada. El estudio de las triosafosfato isomerasas de dos parásitos altamente relacionados, ha dado origen a cuestionar por qué dos enzimas con más del 70% de identidad en su secuencia de aminoácidos y estructuras cristalográficas casi idénticas presentan un comportamiento diferente ante diversos agentes que afectan la catálisis. En este trabajo se estudia de manera particular el efecto del metilmetano tiosulfonato (MMTS) en las triosafosfato isomerasas de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) y *Trypanosoma brucei* (TbTIM). La susceptibilidad de TcTIM ante el efecto de este derivatizante es 70 veces mayor con respecto a TbTIM. Inicialmente, se pensó que los aminoácidos vecinos a la cisteína de interfase o bien los aminoácidos de la interfase, podrían ser los involucrados en este comportamiento diferencial. Para averiguarlo, se han estudiado varios aminoácidos como candidatos; sin embargo, no se ha tenido el éxito esperado debido al gran número de contactos que los aminoácidos establecen en las proteínas y a la cooperatividad de estas interacciones. El objetivo de este trabajo fue encontrar las regiones responsables de este comportamiento mediante la caracterización de proteínas quiméricas. Se construyeron 9 proteínas quiméricas con distintas regiones de ambas proteínas y se determinó el efecto del MMTS en la actividad de las enzimas. Se encontró que las regiones 1 y 4 son las involucradas en el distinto comportamiento ante el efecto del MMTS; en estas regiones se encuentran un total de 18 diferencias entre las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas. De manera sorprendente, entre estas regiones no existe alguna relación estructural, además que los aminoácidos implicados no son cercanos a la cisteína de interfase, lo que corrobora que el comportamiento diferencial de estas TIM's ante el MMTS es un efecto en el que se encuentran involucrados varios aminoácidos y que al estar en regiones separadas, obedecen a un camino estructural no identificado hasta el momento. Así mismo, se demostró que el cambio de reactividad de la cisteína de interfase se debe principalmente a un incremento de su valor de  $pK_a$  como consecuencia de los residuos mutados. Este trabajo presenta un ejemplo de interacciones a larga distancia que modulan la reactividad de la cisteína de interfase en la triosafosfato isomerasa.

## Abstract

The relationship between structure and function in proteins is a main topic that concerns many research groups. One of the most important objectives in this area it is to identify the amino acids relevant for a specific function in proteins. Several studies of triosephosphate isomerases from two related parasites have been promoted an important question to solve. Why two enzymes with high similarity at amino acid sequence level and almost identical three dimensional structures almost show a different behaviour against agents that perturb enzymatic catalysis? In this work we have special interest in the effect of methyl methane thiosulfonate (MMTS) in the activity of triosephosphate isomerases from *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) and *Trypanosoma brucei* (TbTIM). TcTIM is 70 times more sensitive than TbTIM to MMTS. Initially we thought that aminoacids from interface or near to interface cystein were involved in this different behaviour. In this way, several mutants have been constructed by site directed mutagenesis; but all of these have been unsuccessful, because of the numerous contacts involved between aminoacids and the cooperative nature of their interactions. The main objective of this work was to find the region or regions responsible for the different behaviour between TcTIM and TbTIM using chimeric proteins. We designed and purified nine chimeric proteins with different portions of TbTIM and TcTIM, in order to find the amino acids involved in the derivatization mechanism of MMTS. We found that 18 aminoacids located in regions 1 and 4 control the seventy fold difference in reactivity of the interface cysteine between both wild type enzymes. Surprisingly, we found that the change in susceptibility to MMTS was due to residues that are not in contact with the interface cysteine, and most are not part of the dimer interface, but belong to two specific regions of the protein that are not connected to each other either in a sequential or a structural basis. Furthermore, we demonstrated that the change in reactivity is due to an increase in the apparent  $pK_a$  of the interface cysteine produced by the mutated residues. This work shows an example of long-range interactions that control the reactivity of the interface cysteine in triosephosphate isomerase.

## **1. Introducción**

### **1.1 Enfermedades causadas por *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*.**

Tanto la enfermedad de Chagas como la enfermedad del sueño son enfermedades causadas por parásitos que involucran dos hospederos: un mamífero y un insecto vector. *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) son los agentes causales de estas enfermedades de importancia médica en América Latina y en África, respectivamente. En datos publicados por la Organización Mundial de la Salud en 2010 ([www.who.int](http://www.who.int)) se estima que alrededor de 10 millones de personas se encuentran infectadas con *T. cruzi*. Latinoamérica es la región endémica de la enfermedad de Chagas en donde se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad más de 25 millones de personas. Se estima que, en el 2008, se presentaron más de 10,000 muertes debido a esta parasitosis. Esta enfermedad está asociada de manera importante a condiciones de vivienda de pobreza extrema. Los principales países afectados presentan altos índices de pobreza entre los cuales se incluye México.

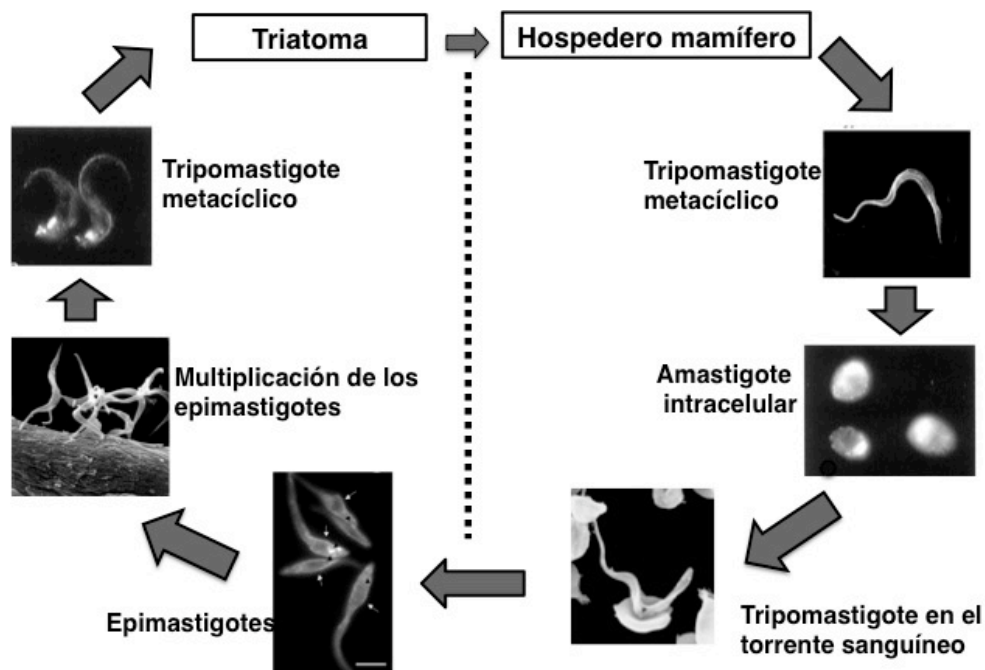
En el caso de la tripanosomiasis africana, se estima que millones de personas en 36 países de África se encuentran en riesgo de infección por *T. brucei*. Debido a los numerosos esfuerzos que se han llevado a cabo en el control de esta enfermedad, es relevante que en el 2009 por primera vez en 50 años, el número de casos reportados fue menor a 10,000 (9878) y el número de casos estimados no excedió los 30,000.

### **1.2 Ciclo de vida de *T. cruzi* y *T. brucei*.**

Tanto *T. cruzi* como *T. brucei* son tripanosomátidos que pertenecen al grupo de los Kinetoplastea. El ciclo de vida de *T. cruzi* es bastante complejo (Figura 1A); involucra varias etapas de desarrollo tanto en el hospedero mamífero como en el insecto vector, el cual no parece verse afectado por la infección del parásito.

En el caso de *T. cruzi*, la infección se transmite al humano por el insecto hematófago del género Reduviidae, mejor conocido como triatoma. A pesar de que se han identificado más de 130 especies de triatomas capaces de transmitir el parásito al humano, tres de ellas son las más importantes: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*.

Las formas celulares que se identifican en el hospedero mamífero son los tripomastigotes en su forma sanguínea, que no son replicativos y los amastigotes intracelulares replicativos; mientras que, en el insecto vector se encuentran epimastigotes replicativos y tripomastigotes metacíclicos en su forma infectiva.



**Figura 1A. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.**

El insecto vector de *T. brucei* es la mosca tse-tse (*Glossina spp*). En su forma procíclica, el parásito vive en el intestino del insecto vector, desde ahí migra hacia las glándulas salivales como epimastigote para infectar al huésped mamífero mediante una mordedura. En las glándulas salivales del insecto, estos epimastigotes atacan el epitelio y proliferan, dando lugar a las formas metacíclicas

infectivas. Se ha estimado que las moscas pueden inyectar miles de parásitos al huésped, pero no se sabe cuantos de éstos se pueden diferenciar hacia las formas alargadas sanguíneas y establecer una infección. Dentro del hospedero mamífero, la infección crónica se caracteriza por niveles oscilantes de parasitemia, debido a la respuesta inmune que se genera contra los antígenos de superficie del parásito, que por ser de naturaleza glicoproteica son altamente variables, de ahí sus siglas en inglés (variant surface glycoprotein VSG) (Hajduk S.L. 1984). En el torrente sanguíneo, el parásito se encuentra en su forma alargada, desde ahí puede migrar a otras áreas del hospedero mamífero o bien diferenciarse a las formas cortas y no replicativas que podrán ser ingeridas nuevamente por la mosca, y así en su forma procíclica comenzar un nuevo ciclo (Figura 1B) (Roditi I. y Lehane M.J. 2008)

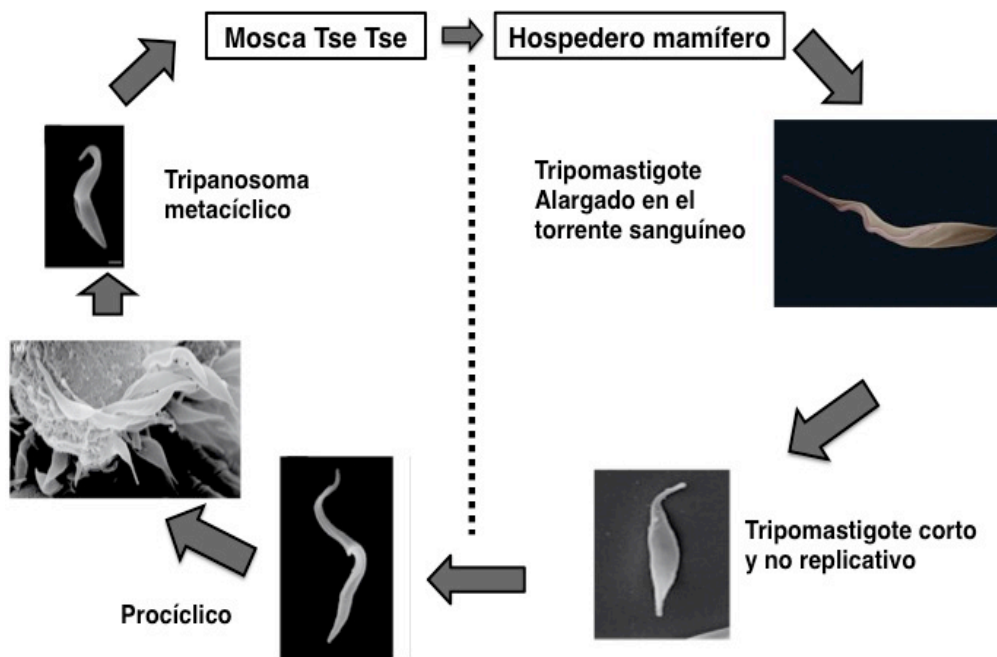


Figura 1B. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*.

### **1.3 Metabolismo energético en tripanosomátidos.**

Los tripanosomátidos poseen características biológicas peculiares; son organismos flagelados con una sola mitocondria con diferentes niveles de diferenciación dependiendo de la fase en la que se encuentre el parásito. También poseen un kinetoplasto que contiene la red de DNA mitocondrial, en este organelo es donde se lleva a cabo la edición del RNA. El metabolismo energético de estos parásitos es especial debido a dos hechos importantes; en primer lugar un gran porcentaje de la glucólisis se encuentra compartimentalizada en el glicosoma y por otro lado la cadena de transporte de electrones presenta características diferentes con respecto a las cadenas respiratorias clásicas (Tielens A.G y van Hellemond JJ., 2009).

Existe una clasificación reciente que agrupa a los tripanosomátidos de acuerdo a su metabolismo energético (Tielens AG y van Hellemond JJ., 2009, Tabla 1). La forma alargada de *T. brucei* forma parte del primer grupo de parásitos donde se encuentran aquéllos que utilizan exclusivamente la glucólisis para producir ATP. Estos organismos no consumen aminoácidos y además no se han detectado cantidades significativas de acetato o succinato. *T. brucei* en su forma alargada, presenta una sola mitocondria pobremente desarrollada, de tal forma que hay una represión importante de esta función organular. La cadena transportadora de electrones presenta una actividad considerable, ya que transfiere electrones de la oxidación glicosomal de la glucosa al oxígeno. De manera peculiar, en esta fase del parásito, la cadena transportadora de electrones no posee citocromos, de tal forma que su actividad se lleva a cabo mediante una oxidasa alterna parecida a la encontrada en plantas (Chaudhuri, M. *et al.* 1998). El NADH producido en los glicosomas se transfiere a la mitocondria a través de la lanzadera de glicerol-3 fosfato y dihidroxiacetona-fosfato presente también en mamíferos. Este transporte de electrones no involucra translocación de protones, por lo que no está ligado a la producción de ATP. Estos parásitos tampoco utilizan la fosforilación oxidativa para obtener ATP.

En la segunda categoría se encuentra la forma sanguínea de *T. congolense* y la fase parasitaria de *Phytomonas* que se encuentra en la planta. Estos parásitos también dependen de la glucosa para la producción de ATP, sin embargo no producen piruvato como los parásitos de la primera categoría y su producto final es el acetato principalmente. Estos parásitos tampoco consumen aminoácidos, no utilizan una cadena respiratoria clásica conformada por citocromos, ni tampoco utilizan la fosforilación oxidativa para la obtención de ATP. Al igual que los parásitos del primer grupo, utilizan la oxidasa alterna similar a la reportada en plantas para oxidar el NADH.

En el tercer grupo se encuentra única y exclusivamente la forma sanguínea de *T. theileri*. Este parásito no utiliza otros aminoácidos y su fuente principal de obtención de energía es la glucosa. Sus principales productos finales son el succinato y el acetato. A diferencia de los parásitos del primer y segundo grupo, este parásito no utiliza la oxidasa alterna para donar electrones al oxígeno, si no por el contrario utiliza una cadena respiratoria clásica acoplada a citocromos, por lo que obtiene ATP a través de la fosforilación oxidativa.

La forma procíclica de *T. brucei* así como todas las etapas de *T. cruzi* tanto en el mamífero como en el insecto vector, se agrupan en la cuarta y última categoría, que incluye a los parásitos con metabolismo energético más complejo. Estos parásitos no dependen únicamente de la glucosa para obtener energía. Poseen un metabolismo mitocondrial más complejo que los del grupo uno y pueden degradar aminoácidos. *T. cruzi* presenta una cadena respiratoria clásica acoplada a los complejos respiratorios I, II, III y IV que se encuentran presentes en mamíferos (van Hellemond, J.J. *et al* 2005a) además de utilizar la fosforilación oxidativa para la obtención de ATP. En la fase dentro del insecto vector *T. brucei* posee una mitocondria bien diferenciada con una cadena de transporte de electrones ramificada con cuatro complejos que donan electrones a la poza de ubiquinona, a la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, a la NADH:deshidrogenasa, al complejo I y al complejo II. El ubiquinol que se forma se reoxida y transfiere los electrones a los

complejos III y IV de la cadena respiratoria clásica o a la oxidasa alterna parecida a la encontrada en plantas (van Hellemond, JJ. *et al* 2005 b).

Categoría	Parásitos incluidos	Principales características
I	La forma alargada sanguínea de <i>T. brucei</i>	Dependientes de la glucólisis, el piruvato es el principal producto final, no utilizan una cadena respiratoria clásica, ni tampoco la fosforilación oxidativa, utilizan una oxidasa alterna para la oxidación del NADH
II	La fase sanguínea de <i>T. congolense</i> y la fase plantar de <i>Phytomonas</i> .	Dependientes de la glucólisis para la obtención de ATP, el principal producto final es el acetato, no utilizan una cadena respiratoria clásica, ni tampoco la fosforilación oxidativa, utilizan una oxidasa alterna para la oxidación del NADH
III	Fase sanguínea de <i>T. theileri</i>	Dependientes de la glucólisis, principales productos finales son el acetato y el succinato. Utilizan una cadena respiratoria clásica acoplada a citocromos, así como la fosforilación oxidativa reportada en mamíferos
IV	Fase sanguínea de <i>T. lewisi</i> , parásitos procíclicos de <i>T. brucei</i> y todas las fases parasitarias de <i>T. cruzi</i> y <i>Leishmania</i> spp.	No son dependientes de la glucólisis, pueden utilizar también aminoácidos, utilizan una cadena respiratoria clásica así como la fosforilación oxidativa para la obtención de ATP. La fase procíclica de <i>T. brucei</i> utiliza la oxidasa alterna similar a la reportada en plantas.

**Tabla 1. Categorías del metabolismo energético en tripanosomátidos de acuerdo a Tielens y Van Hellemond, 2009**



Durante mucho tiempo se creyó que en las etapas de *T. brucei* en el insecto vector, se llevaba a cabo de manera normal el ciclo de Krebs; sin embargo, existen pocas evidencias experimentales que lo demuestren. Algunas de ellas incluyen la detección de la actividad enzimática de las proteínas participantes en la vía. A pesar de que los genes que codifican para las enzimas de esta vía se encuentran en el genoma y se expresan en esta fase del parásito, algunos estudios recientes demuestran que *T. brucei* no utiliza el ciclo de Krebs para la oxidación completa del acetil-CoA a dióxido de carbono. Así mismo, se ha demostrado que algunas reacciones del mencionado ciclo se usan principalmente en rutas anabólicas tales como la gluconeogénesis y la formación de ácidos grasos (van Weelden, S.W.H. *et al.* 2005).

A la fecha, se han identificado muchas otras rutas que se encuentran compartimentalizadas en el glicosoma. Gracias a la liberación de los genomas completos de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major* en el 2005, se han podido identificar varias enzimas que cumplen su función dentro del glicosoma. Esto ha sido posible mediante la búsqueda de las secuencias de direccionamiento peroxisomal (PTS1 y PTS2, de sus siglas en inglés Peroxisomal Targeting Signal type 1 and type 2). Este análisis bioinformático ha revelado 191 proteínas con posibles secuencias de PTS1 y 68 proteínas con secuencias PTS2 con homólogos presentes en *T. cruzi* y *T. brucei*. Aproximadamente al 50% de ellas no se les ha atribuido alguna función glicosomal. Dentro de aquellas que sí han sido identificadas como proteínas glicosomales, algunas no se han encontrado en la forma sanguínea de *T. brucei*, o bien, se encuentran con una actividad muy baja. Sin embargo sí están presentes en los glicosomas de los parásitos procíclicos de *T. brucei* y en las etapas del parásito en el insecto vector o en el hospedero mamífero de *L. major* y *T. cruzi*.

Por mencionar algunas de estas proteínas, se ha encontrado dentro del glicosoma a la enzima clave de la gluconeogénesis, la fructosa-1-6-bifosfatasa, así como a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y a la 6-fosfogluconolactonasa

(Duffieux F., *et al.*, 2000) que catalizan las primeras reacciones de la rama oxidativa de la vía de las pentosas-fosfato.

También se encontró que el gen que codifica para la sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa en *T. cruzi* y *T. brucei* posee una secuencia PTS1. Ésta es una enzima que pertenece al ciclo de Calvin, que usualmente sólo se encuentra en plástidos de plantas o algas, y en algunos hongos o ciliados. Se cree que los tripanosomátidos pudieron adquirir este gen por medio de transferencia horizontal y que esta enzima se utiliza como una modificación del ciclo de las pentosas-fosfato (Hannaert V., *et al* 2003 b).

Una de las primeras rutas que se identificó en el glicosoma fue la síntesis de las purinas. Así mismo, dos de las seis enzimas que catalizan la última etapa de la biosíntesis de pirimidinas también se han localizado en el glicosoma, mientras que las cuatro restantes son citosólicas (Michels P.A., *et al.*, 2000). Al igual que en los peroxisomas de mamíferos, en los glicosomas de los tripanosomátidos se llevan a cabo las dos primeras reacciones de la biosíntesis de lípidos mediante la acción de las enzimas alquil-DHAP sintetasa y la DHAP-aciltransferasa (Oppendoes F.R., 1984). También se han encontrado algunas enzimas involucradas en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos como la 2-enoil-CoA hidratasa y la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa dependiente de NADPH (Wiemer E.A., *et al.*, 1996).

Uno de los sistemas más ampliamente estudiados en los tripanosomátidos es el sistema de desintoxicación de radicales libres, debido a su exclusividad en los tripanosomas y a su localización glicosomal.

## **1.4 Diferencias en el metabolismo energético de *T. cruzi* y *T. brucei*.**

### **1.4.1 Metabolismo energético en la forma sanguínea de *T. brucei***

La forma sanguínea de *T. brucei* es completamente dependiente de la glucosa disponible en la sangre del hospedero para la obtención de energía. En esta etapa del parásito, la glucólisis es la principal ruta para la obtención de ATP mediante la

degradación de glucosa hasta piruvato, producto final de esta vía. Dentro del glicosoma, se encuentran las siete enzimas involucradas en la conversión de glucosa a 3-fosfoglicerato (Figura 2) y las enzimas restantes encargadas de las etapas finales de la vía se encuentran en el citosol. En esta etapa de *T. brucei*, la hexocinasa y la fosfofructocinasa no se regulan alostéricamente como sucede en la glucólisis de otros organismos (Nwagwu M y Opperdoes FR., 1982). Mediante estudios bioquímicos y de simulación computacional, se demostró que la compartimentalización de las enzimas glucolíticas en los glicosomas cumple la función de regulación que compensa la falta de la regulación clásica de las primeras reacciones de la glucólisis (Haanstra, J.R. *et al*, 2008). Por otro lado, en estudios *in silico* se demostró que esta compartimentalización evita la acumulación de algunos metabolitos que podrían alcanzar niveles tóxicos para el parásito, tales como la glucosa 6-fosfato, la fructosa 6-fosfato y la fructosa 1,6 bifosfato (Kessler P.S. y Parsons M. 2005). De manera interesante, se ha encontrado que las enzimas glucolíticas, que se encuentran compartimentalizadas en el glicosoma, poseen puntos isoeléctricos mayores con respecto a sus homólogas encontradas en el citosol de las células de mamífero (de Souza W, 2002).

Dentro del glicosoma, existe un balance adecuado entre el consumo y la producción de ATP y NADH: hay un consumo de dos moléculas de ATP en las reacciones catalizadas por la hexocinasa (HK) y la fosfofructocinasa (PFK), el cual se compensa por la producción de ATP de la fosfoglicerato cinasa (PGK). La obtención neta de ATP se lleva a cabo en el citosol mediante la reacción catalizada por la piruvato cinasa (PK). El caso del NADH es similar, ya que el NADH glicosomal resultante de la reacción catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, es reoxidado dentro del organelo y seguido de la transferencia de electrones del oxígeno molecular, por la glicerol-3-fosfato oxidasa (G3PO) mitocondrial. Este proceso se lleva a cabo mediante la acción concertada de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa glicosomal dependiente de NADH, del

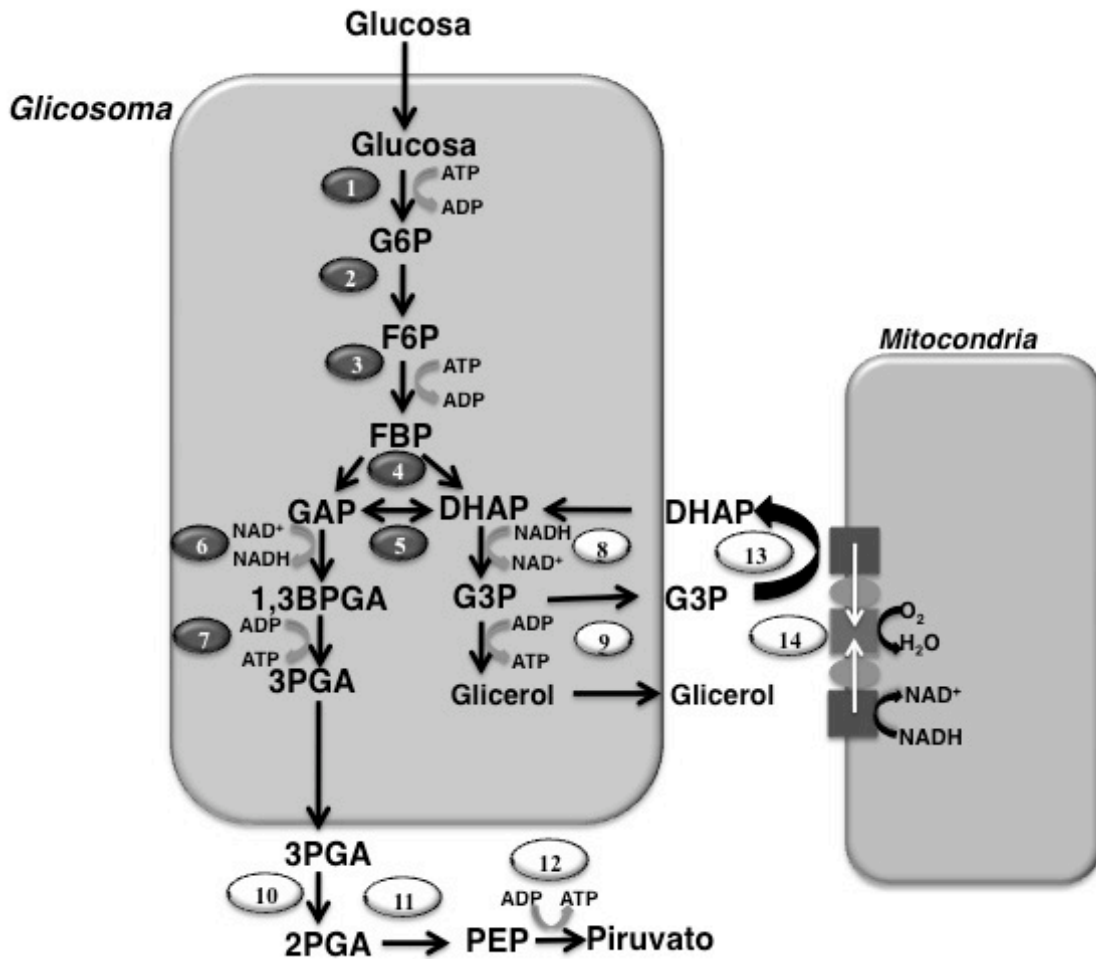
transportador que se encuentra en la membrana glicosomal que intercambia el glicerol 3-fosfato (G3P) por dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y de la G3PO mitocondrial (Michels P.A., *et al.*, 2006). De hecho, la G3PO es un sistema formado por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa que utiliza FAD, ubiquinona y una oxidasa terminal, mejor conocida como la oxidasa alterna de tripanosomátidos o TAO (de sus siglas en inglés Trypanosome Alternative Oxidase).

Se ha demostrado que la compartimentalización correcta de las enzimas glicolíticas en el glicosoma es esencial para la supervivencia de la forma sanguínea de *T. brucei*. Las peroxinas (PEX) son las proteínas encargadas del sistema de importación de proteínas al glicosoma. Utilizando la herramienta del RNA de interferencia se ha demostrado que la delección de los genes que codifican para PEX2, PEX6, PEX10, PEX12 o PEX14 da como resultado la deslocalización parcial de las proteínas glicosomales hacia el citosol, con la consecuente muerte de los parásitos (Guerra-Giraldez J.C.*et al.*, 2002; Furuya T., *et al.*, 2002; Moyersoén J., *et al.*, 2003; Krazy H., *et al.*, 2006). Hay otros estudios que apoyan que la deslocalización de las enzimas glicosomales es letal para *T. brucei*; por ejemplo, la expresión de la isoforma citosólica de la fosfoglicerato cinasa (PGKc) en la forma sanguínea del parásito, provoca la muerte de los parásitos en pocos días, debido a que la PGKc sólo es funcional en el parásito procíclico (Blattner J., *et al.* 1998). De manera similar, cuando la forma sanguínea de *T. brucei* se transfecta con el gen de la triosafosfato isomerasa de *S. cerevisiae* (ScTIM) que se encuentra principalmente en el citosol, hay una inhibición importante del crecimiento de los parásitos (Helfert S., *et al.* 2001).

#### **1.4.2 Metabolismo energético en la forma procíclica de *T. brucei* y en todas las fases de *T. cruzi***

Tanto la forma procíclica de *T. brucei* dentro del insecto vector como *T. cruzi* en la mayoría de sus fases, presentan un metabolismo energético similar. La glucosa se metaboliza esencialmente en el glicosoma, al igual que en la forma sanguínea de *T. brucei*, sin embargo presenta tres diferencias fundamentales con respecto a

la forma sanguínea. En primer lugar, el 3-fosfoglicerato se genera en el citosol, por lo que la PGK se encuentra fuera del glicosoma. En segundo lugar el fosfoenolpiruvato (PEP), producido en el citosol, funciona como sustrato de dos cinasas glicosomales: la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y la piruvato fosfato dicinasa (PPDK) y, por último, el piruvato no es el producto final de la glucólisis ya que éste se convierte en acetato, lactato, succinato y L-alanina en la mitocondria y/o en el citosol (Figura 3). Se ha propuesto que tanto la actividad de PGK citosólica (PGKc), como la actividad de la PPDK glicosomal, contribuyen a mantener el balance de ATP/ADP dentro del glicosoma (Acosta H., *et al.*, 2004).



**Figura 2. Metabolismo energético de la forma sanguínea de *T. brucei*.** En condiciones aeróbicas, la glucosa se convierte a piruvato; en condiciones anaeróbicas se obtienen cantidades equimolares de glicerol y piruvato. Abreviaturas: G6P, glucosa 6-fosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; FBP, fructosa 1,6-bifosfato; GAP, gliceraldehído 3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; 1,3BPGA, 1,3 bifosfoglicerato, 3PGA, 3-fosfoglicerato; 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; G3P, glicerol 3-fosfato. Enzimas: 1)hexocinasa (HK); 2)glucosa 6-fosfato isomerasa (G6PI); 3) fosfofructocinasa (PFK); 4) aldolasa (ALD); 5)Triosafosfato isomerasa (TIM); 6)gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); 7)fosfoglicerato cinasa glicosomal (PGKg); 8)glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH); 9)glicerol cinasa (GK); 10)Fosfoglicerato mutasa (PGM); 11)enolasa (ENO); 12)piruvato cinasa (PK); 13)glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD (G3PDH-FAD); 14)oxidasa alterna de tripanosomátidos (TAO). Modificado de (Hannaert V.*et al.*, 2003, Michels PA. *et al.*,2006, Hannaert V.*et al.*, 2003 y Tielens y van Hellemond 2009).

Se ha demostrado que la glucólisis no es indispensable para el metabolismo energético de los tripanosomas procíclicos, ya que existen reportes en donde varias cepas de parásitos procíclicos pueden adaptarse a condiciones de crecimiento carentes de glucosa sin presentar efectos importantes en su desarrollo (Lamour N., *et al.*, 2005). Cuando se cultivan parásitos procíclicos de *T. brucei* y epimastigotes de *T. cruzi* en medio rico en glucosa, utilizan este carbohidrato como fuente principal de carbono. Sin embargo, cuando estos parásitos son cultivados en medios carentes de glucosa, la velocidad de consumo de la L-prolina aumenta considerablemente, lo que indica que utilizan este aminoácido como fuente principal de carbono, lo que concuerda con las concentraciones altas de prolina y otros aminoácidos encontradas en el insecto vector. Al igual que en la forma sanguínea, los parásitos procíclicos de *T. brucei*, y todas las formas de *T. cruzi*, metabolizan la glucosa dentro del glicosoma, mientras que la L-prolina se metaboliza en la mitocondria.

Por otro lado, la delección del gen que codifica para PEX14 tiene implicaciones importantes en la compartimentalización de la glucólisis. Los tripanosomas procíclicos deletados en PEX14 son capaces de sobrevivir en ausencia de glucosa, una vez que el medio se suplementa con este azúcar, los parásitos procíclicos mueren. En primer lugar, esto sugiere que al no haber función normal de la glucólisis, en ausencia de glucosa, los parásitos son capaces de obtener su energía por vías alternas, en este caso mediante el metabolismo de prolina (Furuya T., *et al* 2002). Una vez que la glucosa está presente, los parásitos no pueden utilizarla debido a que la vía no se encuentra correctamente compartimentalizada lo que demuestra el papel fundamental de PEX14 en este evento.

Dentro del insecto vector, tanto *T. cruzi* como *T. brucei*, están sometidos a condiciones aeróbicas, por lo que han desarrollado un metabolismo aeróbico constituido por dos oxidasas mitocondriales: la citocromo oxidasa sensible a cianuro y la oxidasa alterna de tripanosomas (TAO) que es sensible a ácido





## 2. Antecedentes.

### 2.1 La triosafosfato isomerasa como blanco terapéutico para el diseño de fármacos antiparasitarios.

Desde hace algunas décadas, se ha estudiado a la triosafosfato isomerasa (TIM) como blanco terapéutico para el tratamiento de enfermedades parasitarias, tales como la enfermedad de Chagas, la enfermedad del sueño, leishmaniasis, esquistosomiasis, malaria, giardiasis, entre otras. Existen numerosos estudios bioquímicos y estructurales que hacen que esta enzima sea una de las enzimas glucolíticas más estudiadas. La primera estructura cristalográfica de TIM que fue depositada en el Protein Data Bank (PDB) en 1975, corresponde a la TIM de pollo (ChTIM) (Banner, D.W., *et al.*, 1975) con una resolución de 2.5 Å. En la actualidad (Marzo, 2012) se encuentran disponibles en el PDB, 125 estructuras cristalográficas de TIM, las cuales incluyen las TIMs silvestres de 30 organismos diferentes, entre ellas la TIM de humano (HTIM, Mande., S.C., *et al.* 1994), de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* (TcTIM, Maldonado E., *et al.*, 1998 y TbTIM, Wierenga R.K., *et al.*, 1991, respectivamente).

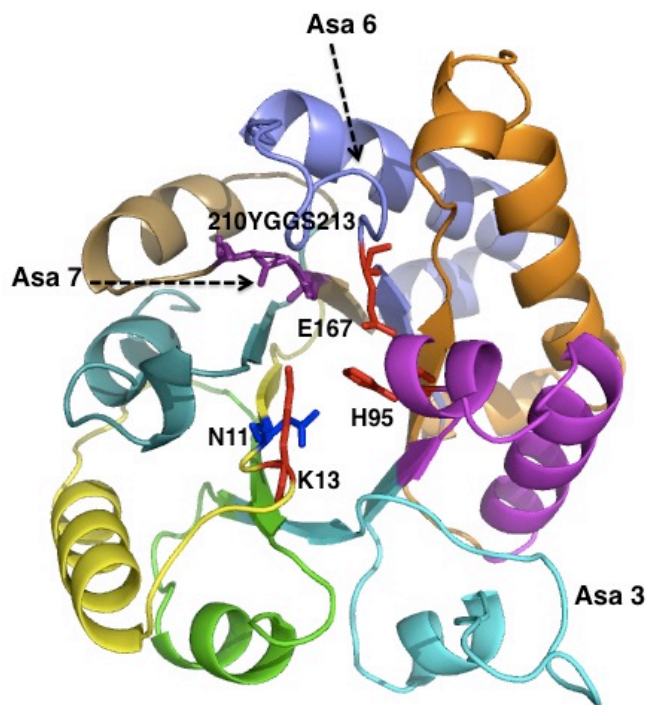
La TIM (E.C. 5.3.1.1) es la enzima que cataliza la quinta reacción de la glucólisis, favorece la isomerización entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato (GAP) (Figuras 2 y 3). La actividad de la TIM sólo se encuentra limitada por la difusión de los sustratos, por lo cual se le ha denominado el “catalizador perfecto”; presenta valores de eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) cercanos a  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

En las especies mesófilas la TIM requiere estar en forma dimérica para tener actividad, mientras que en algunas especies termófilas como *Pyrococcus woesei* (Walden H., *et al.*, 2001) y *Thermoproteus tenax* (Walden H., *et al.*, 2004) es un homotetrámero. En el parásito *Giardia lamblia*, la TIM se encuentra catalíticamente

activa tanto en su forma dimérica como tetramérica (López-Velazquez G., *et al.*, 2004).

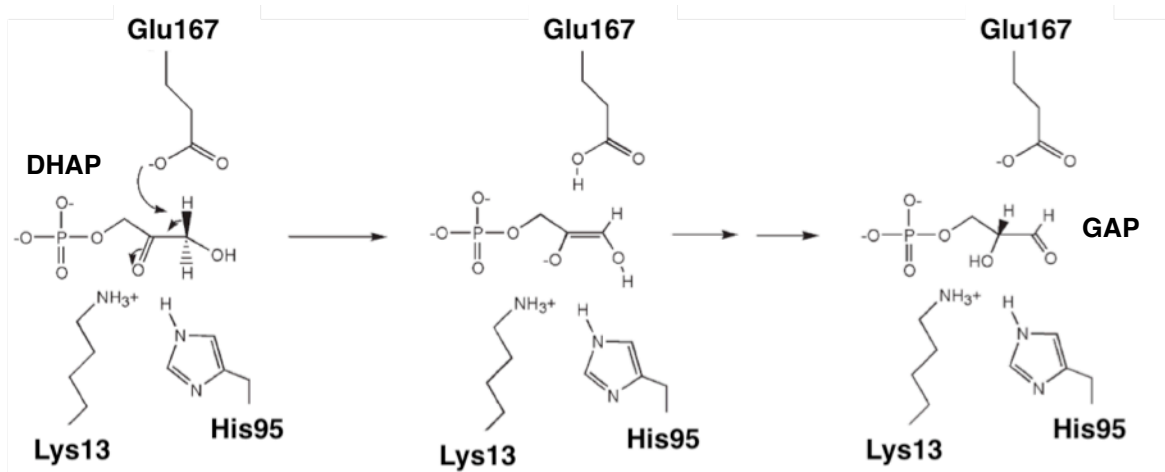
## 2.2 Características estructurales de la triosafosfato isomerasa.

El plegamiento de tipo  $(\beta-\alpha)_8$  que caracteriza a la TIM, es el que la naturaleza ha escogido predominantemente en una gran número de proteínas. Alrededor de 20 clases de enzimas presentan el dominio estructural de barril TIM (Nagano, *et al.*, 2002). En todos los barriles TIM, las hebras  $\beta$  se encuentran dispuestas en el interior del barril formando una hoja  $\beta$  cerrada, mientras que las  $\alpha$ -hélices se localizan en la parte externa de la proteína. Cada hebra  $\beta$  se encuentra unida a una hélice  $\alpha$ , mediante asas (loops). Los sitios activos de estas enzimas se encuentran en el extremo C-terminal de las hebras  $\beta$ , mientras que las asas se encuentran en el extremo N-terminal siendo importantes para la estabilidad de la proteína (Figura 4).



**Figura 4.** Barril  $\beta/\alpha$  de la TIM. En el centro del barril se muestran los aminoácidos del sitio catalítico (K13, H95, E167); así mismo se muestra el N11 como el cuarto aminoácido implicado en la catálisis. En el asa 7 se muestra el dominio conservado YGGGS (210-213), que ha sido relacionado con la conformación cerrada del asa 6 en presencia de sustrato. La figura fue realizada con las coordenadas depositadas en el PDB para TbTIM, con código 5TIM, utilizando el programa Pymol.

En la TIM, la catálisis se lleva a cabo por la función concertada de tres aminoácidos que se encuentran en el centro del barril de cada monómero. La interconversión entre la DHAP y el GAP involucra transferencia de protones. El residuo catalítico clave en esta transferencia es el glutámico catalítico, Glu167, que se encuentra al inicio del asa 6. Cuando se encuentra en su conformación activa, su cadena lateral se dirige hacia el ligando, iniciando así la isomerización. Este aminoácido actúa como la base catalítica que sustrae un protón del átomo C1 de la  $\alpha$ -hidroxicetona o bien del C2 del  $\alpha$ -hidroxialdehído respectivamente (Figura 4 y Figura 5).



**Figura 5.** Mecanismo catalítico de la TIM. Conversión de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en el gliceraldehído 3-fosfato (GAP), pasando por un intermediario enediol. El Glu167 actúa como la base catalítica que sustrae el protón del sustrato. El movimiento subsiguiente de los protones, convierten el intermediario enediol en el GAP. Modificado de Alahuhta M., y Wierenga R.K., 2010.

Para entender el mecanismo que permite el cambio de conformación del Glu67 de su forma activa a inactiva se ha caracterizado una variante de TbTIM en la cual se mutó la Pro168 por Ala; este residuo está inmediatamente al lado del Glu catalítico. Se ha sugerido que pequeños arreglos en el dipéptido Glu167-Pro168 favorecen el movimiento del asa 6 que protege la unión del sustrato (Wierenga R.K., *et al* 1991). Los datos estructurales derivados de esta mutante demostraron

que la presencia de la cadena lateral de la prolina es fundamental para transmitir la señal de la unión del ligando, dando como consecuencia que el asa 6 adopte la conformación cerrada (Casteleijn *et al.*, 2006).

Los otros aminoácidos involucrados en la actividad catalítica de la TIM son la His95 localizada en el asa 4 y la Lys13 presente en el asa 1. El anillo imidazol de la His 95, actúa como electrófilo polarizando el grupo carbonilo del sustrato lo que permite su enolización. La Lys 13 es el aminoácido responsable de la especificidad de la enzima por su sustrato natural. Se ha identificado a un cuarto protagonista de la reacción de isomerización de la TIM, la Asn11, ubicada también en el asa 1, (Kursula I., *et al* 2001) (Figuras 4 y 5).

Así mismo, se ha identificado que los grupos amino de los aminoácidos que se encuentran en las asas 6, 7 y 8 forman un sitio de unión específico del grupo fosfato del sustrato, que lo estabilizan mediante puentes de hidrógeno e impiden la formación del metilglioxal (Kursula & Wierenga, 2003). Este hecho ha sido comprobado, con la construcción de una variante de la TIM de pollo (ChTIM), en la que se deletaron cuatro residuos de la punta del asa 6. Como consecuencia de esta delección, en esta variante no se forman los cuatro puentes de hidrógeno con el grupo fosfato, de tal forma que el sustrato no se une fuertemente dando origen a la formación de metilglioxal; de hecho esta mutante fue denominada como una metilglioxal sintasa (Pompliano *et al.*, 1990)

En estudios cristalográficos se ha revelado que las asas 6 y 7 presentan una conformación abierta en ausencia de ligando y cerrada en presencia de el (Noble., *et al.*, 1993). En la TIM de tripanosomátidos el asa 6 abarca de la Pro168 a la Ala178, que precede inmediatamente al Glu167 catalítico. El movimiento del asa 6 a la conformación abierta se estabiliza por el asa 5; de igual manera se ha observado que la conformación cerrada del asa 6, se correlaciona con un cambio estructural en el asa vecina, el asa 7, la cual posee la secuencia característica Tyr210-Gly211-Gly212-Ser213. Una vez que el extremo del asa 6 (Gly173) se desplaza aproximadamente 7 Å debido a la unión del sustrato, el cambio

conformacional del asa 7 involucra la reorientación planar de dos péptidos: Gly211-Gly212 y Gly212-Ser213 (Casteleijn *et al.*, 2006).

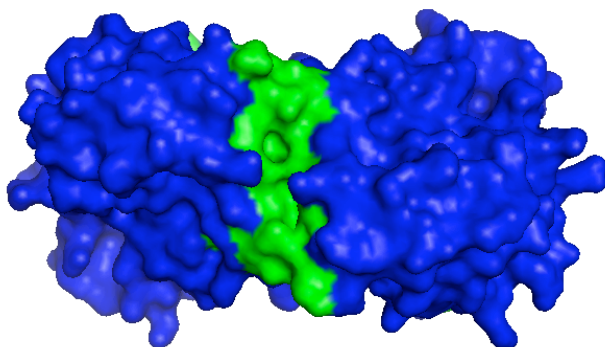
Mediante el análisis de las secuencias de aminoácidos y las estructuras cristalográficas de varias TIMs se ha llegado a la conclusión de que hay una relación importante entre los aminoácidos de las asas 6 y 7 (Kursula I., *et al.*, 2004). La secuencia que se encuentra en la bisagra del extremo amino-terminal del asa 6, 168-PheValTrp (usando numeración de TbTIM), siempre correlaciona con el motivo del asa 7, 210-TyrGlyGlySer. En organismos termófilos, hay una desviación de esta covarianza, ya que en lugar de la secuencia PheValTrp se encuentra la secuencia PhePheGlu, lo que resulta en un cambio del motivo TyrGlyGlySer del asa 7 por CysGlyAlaGly o ThrGlyAlaGly. Estas variaciones de las secuencias en las asas 6 y 7 se presentan en archeas como *T. tenax* y *P. woesi* (Wang Y., *et al* 2009). Con el objetivo de estudiar la interacción entre el asa 6 y el asa 7, se construyó una mutante de ChTIM en la que el motivo del asa 7, TyrGlyGlySer se intercambió por su contraparte en archeas, ThrGlyAlaGly. La mutación en el asa 7 en la ChTIM tuvo importantes efectos, ya que presentó pérdida considerable de la actividad, de la capacidad para unir el sustrato y en la estabilidad térmica. Con estos resultados se pudo concluir que el asa 7 actúa coordinando el movimiento del asa 6, permitiendo así una catálisis óptima, además de tener un efecto importante en la termoestabilidad (Wang Y., *et al* 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que los cinco aminoácidos que se encuentran en la punta del asa 6 (Ala171-Ile172-Gly173-Thr174-Gly175) se desplazan como un cuerpo rígido una vez que el sustrato se ha unido (Wierenga R.K. *et al*, 1991). La conformación cerrada de esta asa se estabiliza mediante un puente de hidrógeno entre el asa 6 y uno de los átomos de oxígeno del grupo fosfato del ligando. Se ha demostrado que el movimiento de esta asa catalítica es el paso limitante de la velocidad de la reacción de la TIM (Rozovsky S., *et al.*, 2001). El asa 8 no presenta cambios conformacionales debido a la unión del sustrato; sin embargo, los grupos amino de la Gly 234 y de la Gly235 interaccionan con el

grupo fosfato del sustrato formando puentes de hidrógeno. El asa 2 no influye de manera importante en la geometría del sitio activo.

### 2.3 La interfase de la triosafosfato isomerasa y la importancia del residuo en la posición 14 para la estabilidad del dímero.

Los aminoácidos que forman la interfase entre los dos monómeros se distribuyen en las asas 1, 2, 3 y 4. Se calculó el área de superficie que se oculta después de la dimerización comparada con el área expuesta del monómero solo: en TcTIM corresponde a 1476 y 1491 Å<sup>2</sup> para los monómeros A y B, respectivamente (Maldonado E., *et al.*, 1998). Para TbTIM estos valores resultaron ser 1522 y 1533 Å<sup>2</sup> (Wierenga R.K., *et al.*, 1991). La interfase está formada por 32 aminoácidos en donde al menos un átomo de cada aminoácido hace contacto con algún átomo de un aminoácido del monómero vecino a una distancia de 4 Å (Figura 6).



**Figura 6.** Interfase entre los dos monómeros de la TIM. La interfase está formada por 32 aminoácidos que se muestran en verde. La figura se hizo utilizando las coordenadas depositadas en el PDB para TbTIM, con código 5TIM, utilizando el programa Pymol.

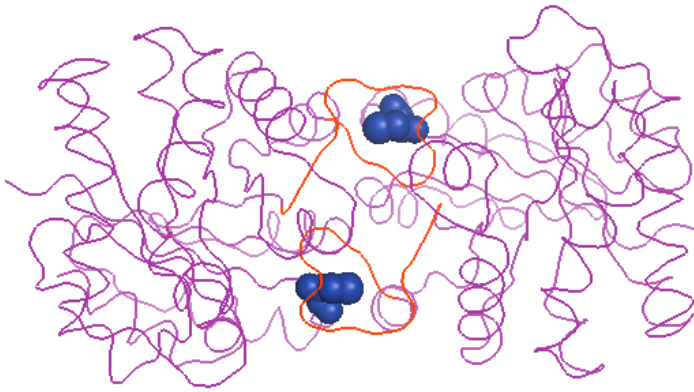
El análisis de 15 estructuras cristalográficas de TIM's de 13 diferentes especies reveló que existen 18 moléculas de agua en la proteína que se conservan en todas las TIM's estudiadas, 3 de estas moléculas son cercanas al sitio catalítico, las 15 restantes se encuentran ocultas y están situadas en la vecindad de la interfase. Sólo 4 de estas moléculas de agua se pueden clasificar estrictamente como aguas interfaciales, que además no se encuentran en estructuras cristalográficas de TIM's monoméricas (Rodríguez-Almazán C., *et al.*, 2008). Mediante espectroscopía de masas en formato de ionización por electrospray se

encontraron también moléculas de agua unidas fuertemente a la interfase de la TIM de *Plasmodium falciparum*, 6 de estas moléculas coinciden con las moléculas de agua conservadas en las estructuras cristalográficas de TIM's de 13 especies diferentes (Thakur S.S., *et al.*, 2009).

Los contactos entre las subunidades de la TIM están dados principalmente por los aminoácidos de las asas 1 y 3. Algunas mutaciones en el asa 1 de HuTIM (Mainfroid V., *et al.*, 1996) y la desamidación de la Asn15 en la TIM de conejo (Sun Q, *et al.*, 1992) tuvieron como consecuencia una disminución en la estabilidad del dímero. De esta forma, se demostró que las interacciones del asa 1 con el otro monómero son fundamentales para la estabilización del dímero.

Gran parte de los aminoácidos que conforman el asa 3 se encuentran en la interfase. El asa 3 abarca de los aminoácidos 65 al 79 y se encuentra inmersa en una cavidad cercana al sitio activo de la otra subunidad. Se ha demostrado que los dos aminoácidos que presentan un mayor número de interacciones entre los monómeros son la Cys 14 (aa no conservado) y la Thr75 (aa conservado). Particularmente, la Thr75, que se encuentra en un extremo del asa 3 contribuye con una red de puentes de hidrógeno que se extiende hasta el sitio activo de la otra subunidad. Cuando se mutó este aminoácido junto con la Gly76 por Arg75 y Glu76 respectivamente, resultó en una proteína monomérica que presenta una disminución severa de la actividad catalítica (Schliebs W, *et al.*, 1997).

En la TIM de tripanosomátidos y de algunos otros parásitos, el asa 3 rodea a la Cys14, también llamada cisteína de interfase (Figura 7). Los estudios de mutagénesis dirigida de los aminoácidos en esta asa, han demostrado su importancia en la estabilidad del dímero (Cabrera N., *et al.*, 2008, Schliebs W *et al.*, 1997). Más aún, cuando el asa 3 de la TIM de *Trypanosoma brucei* (TbTIM), se acorta por la eliminación de 7 residuos, se obtuvo una proteína monomérica catalíticamente activa con un valor de  $k_{cat}$  alrededor de 1000 veces menor y un aumento de 20 veces en la  $K_m$ , comparado con la enzima dimérica silvestre (Borchert TV., *et al.*, 1993 b, Borchert TV., *et al.*, 1994).



**Figura 7.** Cisteína de interfase rodeada por el asa de interdigitación. El asa 3 abarca de los residuos 65- 79 (numeración para TbTIM) y rodea a la cisteína de interfase de la subunidad vecina. La figura se hizo utilizando las coordenadas depositadas en el PDB para TbTIM, con código 5TIM, con el programa Pymol.

Al igual que la Thr75, la Cys14 también está fuertemente involucrada en la estabilidad del dímero, ya que, tanto su cadena lateral, como su cadena principal, están involucradas en la formación de varios puentes de hidrógeno. El análisis de la estructura cristalográfica de TbTIM, reveló que los átomos de la Cys14 hacen contacto con 26 átomos de la otra subunidad (Hernández-Alcántara G., *et al.*, 2002). Un alineamiento de 470 secuencias de TIM, excluyendo a la TIM de las archeas, reveló la diversidad de aminoácidos que pueden ocupar la posición 14 en esta proteína. En la mayoría de los organismos (360), hay una Met ocupando esta posición y en el resto de las secuencias la posición 14 está ocupada por ocho aminoácidos diferentes. En 22 de las secuencias, se encontró un residuo de Cys. Un hecho importante es que en ninguna de ellas hay un aminoácido aromático o cargado en esta posición (Banerjee M., *et al.*, 2011). Esto tiene evidencia experimental contundente, ya que la mutante C14F de TbTIM, es una TIM monomérica, que presentó una  $k_{cat}$  1000 veces menor y una  $K_m$  seis veces mayor con respecto a la enzima silvestre (Hernández-Alcántara G., *et al.*, 2002). El cambio de la cisteína de interfase por residuos cargados como el aspártico y el glutámico en la TIM de *Plasmodium falciparum* (PfTIM), resultó en enzimas con actividad catalítica mucho menores comparadas con la enzima silvestre. Además la mutante Cys13Asp, presentó una tendencia importante a disociarse en monómeros (Banerjee M., *et al.*, 2011).



El hecho de que la TIM de algunos parásitos, tengan en la posición 14 un residuo de cisteína, a diferencia de la TIM de humano que posee una metionina, ha cobrado gran interés a lo largo de los años en el diseño racional de fármacos especie-específicos. De esta manera se ha estudiado exhaustivamente la perturbación de este residuo, con el fin de desestabilizar el dímero, teniendo como consecuencia la pérdida de la actividad catalítica de la TIM, y dando lugar a la muerte de los parásitos. Entre las TIMs de los organismos que tienen una cisteína en la posición 14 se encuentra la TIM de *Entamoeba histolytica* (EhTIM)(Landa A., *et al.*,1997, Rodríguez-Romero A., *et al.*, 2002), *Plasmodium falciparum* (PfTIM) (Ranie J., *et al.*, 1993), *Giardia lamblia* (GITIM) (Enriquez-Flores S., *et al.*, 2008), *Leishmania mexicana* (LmTIM) (Gómez-Puyou A., *et al.*, 1995), TbTIM y TcTIM. Existen numerosos estudios que se han enfocado a perturbar este residuo de interfase. Por mencionar algunos, todas estas TIMs, han sido estudiadas en presencia de reactivos de grupo sulfhidrilo como el metilmetano tiosulfonato (MMTS) y el 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB).

Se ha observado que cuando la TIM se incuba en presencia de estos reactivos derivatizantes, se presenta una pérdida de la actividad catalítica como consecuencia de cambios estructurales importantes y de la desestabilización de las proteínas diméricas (Garza-Ramos G., *et al.*, 1998, Gómez-Puyou A., *et al.*, 1995, Pérez-Montfort R., *et al.*, 2002, Maithal K., *et al.*, 2002).

A partir de toda la información acerca de la interfase de la TIM, han surgido diversas líneas de investigación con el objetivo de diseñar compuestos que perturben la estabilidad del dímero y, como consecuencia, inhiban la actividad catalítica. En este sentido, algunos compuestos derivados del benzotiazol han mostrado eficacia en la inhibición de la TcTIM a concentraciones en el orden  $\mu\text{M}$ . Entre estos compuestos se encuentran el ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-propanosulfónico, el ácido 2-(p-aminofenil)-6-metilbenzotiazol-7-sulfónico y el ácido 2-(2-(4(4-aminofenil) benzotiazol-6-metilbenzotiazol-7-sulfónico) (Tellez-Valencia A., *et al.*, 2004). La segunda generación de estos compuestos dio origen

a la 6,6'benzotiazol-2,2'diamina la cual, en concentraciones del orden micromolar, causa inactivación reversible no sólo en TcTIM sino también en TbTIM y LmTIM (Olivares-Illana V., *et al.*, 2006). El compuesto que hasta el momento ha resultado más eficaz en la inhibición selectiva de TcTIM es la ditiodianilina (DTDA), ya que con una concentración de 260 nM inhibe el 50% de la actividad catalítica de TcTIM (Olivares-Illana V., *et al.*, 2007).

## 2.4 Diferencias y similitudes entre TbTIM y TcTIM.

Las TIMs de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosma brucei* comparten algunas características, sin embargo su comportamiento ante diversos agentes que afectan la catálisis es muy distinto. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas revela una identidad del 73.9% y una similitud del 92.4% (Figura 8). En ambas secuencias hay un total de 65 diferencias: 36 de las cuales son sustituciones conservativas, 11 sustituciones no conservativas y 18 aminoácidos sin homología. La TcTIM cuenta con un aminoácido más en la posición 2, una Ala, por lo que posee 251 aminoácidos, mientras que TbTIM sólo tiene 250.

```

TcTIM      MASKPQPIAAANWKCNGSESLVPLIETLNAAATFDHVDQCVVAPTFLHIPMTKARLTNPK 60
TbTIM      MSKPQPIAAANWKCNGSQSLSELIDLNFNSTINHDVQCVVASTFVHLAMTKERLSHPK 59
          * * * * * : : : : : * * * * * : : : : : * * * * * : : : : : * * * * *

TcTIM      FQIAAQNAITRSGAFTGEVSLQILKDYGISWVVLGHSERRLYGETNEIVA EKVAQACAA 120
TbTIM      FVIAAQNAIAKSGAFTGEVSLPILKDFGVNWIVLGHSERRAYGETNEIVADKVA AAVAS 119
          * * * * * : : : : : * * * * * : : : : : * * * * * : : : : : * * * * *

TcTIM      GFHVIVCVGETNEEREAGRTAAVVLTQLAAVAQKL SKEAWSRVVIA YEPVWAI GTGKVAT 180
TbTIM      GFMVIACIGETLQERESGR TAVVLTQIAAIAK KLKADWAKVVIAYEPVWAI GTGKVAT 179
          * * * * * : : : : : * * * * * : : : : : * * * * * : : : : : * * * * *

TcTIM      PQQAQEVHELLRRWRSKLGTDIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDINGFLVGGASLK 240
TbTIM      PQQAQEAHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGGASLK 239
          * * * * * : : : * * * * * : : : * * * * * : : : * * * * * : : : * * * * *

TcTIM      PEFVEIIEATK 251
TbTIM      PEFVDIIKATQ 250
          * * * * * : : : * * * * * : : : * * * * * : : : * * * * *

```

**Figura 8. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TcTIM y TbTIM** realizado con el algoritmo Clustal W. En total hay 65 diferencias: 36 sustituciones conservativas (:); 11 sustituciones no conservativas (.) y 18 aminoácidos sin homología ( ). Se define una sustitución conservativa cuando dos aminoácidos pertenecen al mismo grupo de acuerdo a sus características fisicoquímicas por ejemplo la misma carga o el mismo grado de hidrofobicidad. Una sustitución no conservativa se refiere cuando dos aminoácidos no comparten las mismas características, aunque pueden pertenecer al mismo grupo. Los aminoácidos sin homología no tienen alguna relación entre ellos. El código de colores de cada grupo de aminoácidos describe lo siguiente: **ROJO**: aa pequeños y/o hidrofóbicos; **AZUL**: aa ácidos; **MAGENTA**: aa básicos y **VERDE**: aa con grupos hidroxilo, amino, o sulfhidrilo, en este grupo está incluida la Gly.

El punto isoeléctrico de estas dos proteínas varía por casi una unidad de pH, para TbTIM es de 9.9, mientras que el de TcTIM 8.9. Ambas enzimas son homodímeros y sus estructuras tridimensionales se superponen con un RMS de  $0.96 \text{ \AA}^2$ , las dos poseen valores semejantes de  $k_{cat}$  y  $K_m$ . TcTIM tiene cuatro cisteínas en las posiciones 15, 40, 118 y 127. TbTIM tiene sólo tres cisteínas, en la posición 118 que en TbTIM equivale a la posición 117, existe una Val en lugar de una Cys.

A pesar de que estas dos proteínas presentan importantes similitudes, existen diferencias notables en su comportamiento ante diversos agentes que afectan la catálisis enzimática. Por ejemplo, cuando estas proteínas son incubadas en presencia de subtilisina, TcTIM presenta una disminución progresiva de la actividad a medida que la concentración de proteasa aumenta; en cambio en la actividad de TbTIM no hay una disminución notable a concentraciones crecientes de subtilisina. La abolición de la actividad de TbTIM requiere concentraciones mayores con respecto a las requeridas para inactivar por completo a TcTIM. Más aún, el análisis del grado de proteólisis obtenido en TbTIM revela que el dímero, después del efecto de la subtilisina, está formado por un monómero fragmentado, y un monómero intacto. En TcTIM la proteólisis que se alcanza es de un 100% (Reyes-Vivas H., *et al.*, 2002).

Se ha estudiado el efecto desnaturalizante del hidrocóloruro de guanidina en la actividad de TbTIM y TcTIM. El análisis de las cinéticas de reactivación de estas enzimas ha revelado importantes diferencias. Una vez que el agente desnaturalizante es eliminado, TcTIM puede reactivarse hasta un 90%, mientras que TbTIM tan sólo alcanza un 60% de reactivación. Ambos procesos de reactivación son dependientes de la concentración de proteína, sin embargo, la reactivación de TcTIM es más rápida y más eficiente que la de TbTIM (Zomosa-Signoret V., *et al.*, 2003).

Los datos de termoestabilidad seguida por dicróismo circular de estas enzimas homólogas indican que TcTIM presenta una mayor estabilidad a la

desnaturalización por la temperatura con respecto a TbTIM. TcTIM presenta una temperatura aparente de desnaturalización ( $T_m$ ) de 57.6° C mientras que la  $T_m$  obtenida para TbTIM fue cuatro grados menor (53 °C) (García-Torres I, 2006).

Existen estudios de desnaturalización térmica en presencia y ausencia de urea, en los cuales se estudiaron y determinaron las barreras de solvatación que interfieren en el proceso de desplegamiento en estas dos enzimas. Se estudió la desnaturalización térmica de TbTIM y TcTIM, incluyendo también la TIM de *Leishmania mexicana* (LmTIM). En los tres casos la desnaturalización térmica es un proceso irreversible y cinéticamente controlado. La principal diferencia radicó en los parámetros cinéticos de desnaturalización; TcTIM presentó una energía de activación ( $E_A$ ) mucho mayor con respecto a los valores obtenidos para TbTIM y LmTIM. El valor de la  $E_A$  de TcTIM fue de 792.8 kJ/mol, mientras que para TbTIM y LmTIM fue de 397.9 y 315.1 kJ/mol respectivamente, esto implica que la energética del estado de transición entre estas especies es particularmente diferente. De manera concreta, el hecho de que TcTIM tenga una  $E_A$  mucho mayor con respecto a TbTIM y LmTIM da como consecuencia una velocidad de desnaturalización varios órdenes de magnitud menor, lo que le confiere una mayor estabilidad cinética con respecto a las otras TIMs estudiadas. Si se toman los valores de  $E_A$  obtenidos experimentalmente de manera aislada, no es posible explicar el grado de desplegamiento en el estado de transición así como algunos otros factores que contribuyen a la energética del estado de transición. Estos factores involucran principalmente a las barreras de solvatación. La contribución de estas barreras se explicó en términos del cambio de entalpía de activación en el estado de transición que está afectada por la fracción desplegada así como por el área de superficie oculta (ASA) involucrada en la ruptura de contactos internos. Al calcular el ASA de la fracción desplegada en el estado de transición, para TcTIM resultó ser del 27% del total de ASA de desplegamiento comparada con el 5% para TbTIM y LmTIM (Costas M., *et al.*, 2009).

Desde hace un poco más de quince años, se ha estudiado el efecto de los reactivos de grupo sulfhidrilo en la actividad de TcTIM y TbTIM. Se ha identificado que la derivatización de la cisteína de interfase (14 en TbTIM y 15 en TcTIM) es la causante de las perturbaciones estructurales de estas dos TIMs dando como consecuencia la abolición de la actividad enzimática. Se han construido un importante número de mutantes que demuestran este hecho. Cuando en TbTIM, la Cys14 es sustituida por Ser o Ala, resultan proteínas con características biofísicas semejantes a las de la enzima silvestre; sin embargo, estas mutantes son resistentes al efecto derivatizante del MMTS y el DTNB. Por otro lado, las TIMs que poseen de manera natural los residuos de Cys en la posición 40 y 126, pero que carecen de la Cys 14, son insensibles al efecto del MMTS (Garza-Ramos G., *et al.*, 1998). Con estos resultados se demostró que la inactivación de esta enzima es consecuencia de la derivatización de la cisteína de interfase (Pérez-Montfort R., *et al.*, 1999, Cabrera N., *et al.*, 2008). El mismo efecto ocurrió con la mutante Cys15Ala en TcTIM: al cambiar la cisteína de interfase por una alanina se produce una enzima resistente al efecto del MMTS (Zomosa-Signoret V., *et al.* 2007). Algunos experimentos con heterodímeros de TbTIM y TcTIM han confirmado que la reactividad de la cisteína de interfase de un monómero está íntimamente relacionada con el monómero adyacente. El heterodímero formado por Cys15Ala TcTIM/TbTIM que sólo tiene una cisteína de interfase, presentó una inactivación del 60% ante el efecto del MMTS. Es necesario derivatizar a las cisteínas de interfase de ambos monómeros para lograr la pérdida total de la actividad en la TIM (Zomosa-Signoret V., *et al.*, 2007).

A pesar de que el arreglo tridimensional y el ambiente que rodea a la cisteína de interfase en TcTIM y TbTIM es casi idéntico, la susceptibilidad de TcTIM ante el MMTS es alrededor de 70 veces mayor con respecto a TbTIM, en el caso del DTNB la diferencia es aún mayor, ya que TcTIM es 160 veces más susceptible con respecto a TbTIM (Gómez-Puyou A., *et al.*, 1995, Garza-Ramos G., *et al.*, 1998, Maldonado E., *et al.*, 1998, Pérez-Montfort R., *et al.*, 1999). Durante varios

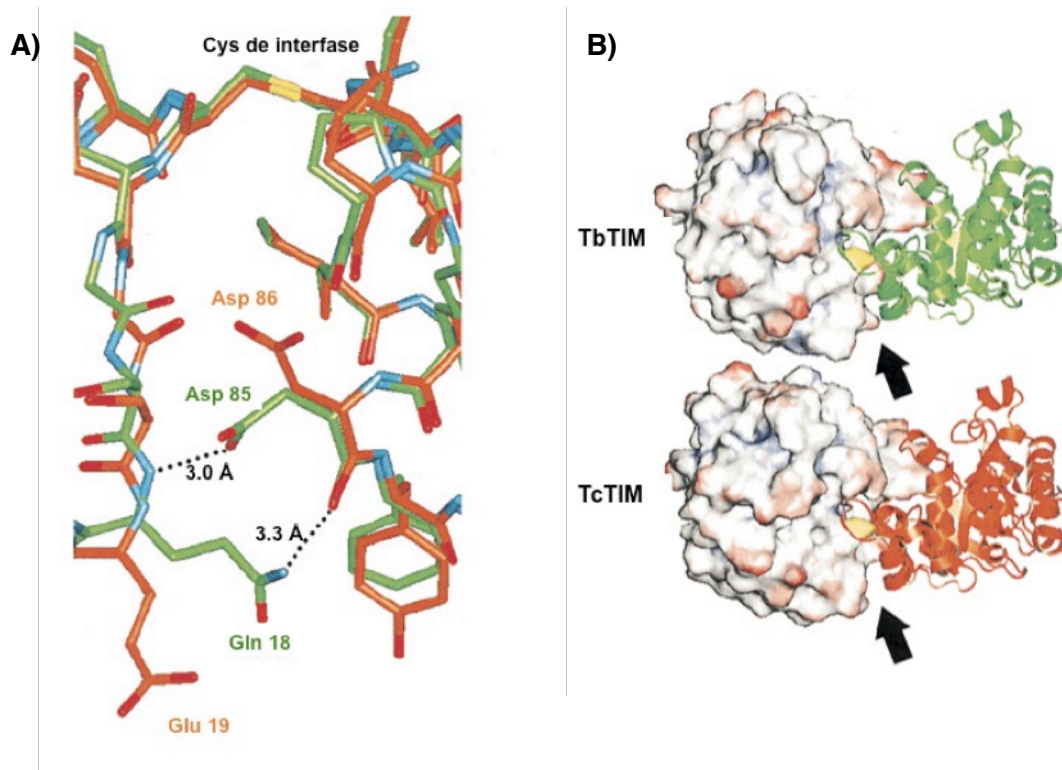
años se han hecho numerosos intentos con el fin de identificar las determinantes que hacen que estas proteínas homólogas presenten un distinto comportamiento ante el efecto de los reactivos de grupo sulfhidrilo. Algunos de ellos se revisarán en el siguiente apartado.

## **2.5. ¿Por qué dos enzimas con características similares presentan distinto comportamiento ante el efecto de los reactivos de grupo sulfhidrilo?**

Esta pregunta ha mantenido ocupado a nuestro grupo de investigación por más de 15 años. Gracias a la mutagénesis sitio dirigida, se han podido monitorear diversas regiones de TbTIM y TcTIM con el fin de encontrar aquellos aminoácidos responsables del distinto comportamiento de estas dos enzimas ante la inactivación por MMTS y DTNB. El primer candidato a analizar fue la Cys 117 presente en TcTIM, pero no en TbTIM. Se construyeron las mutantes correspondientes en TbTIM y TcTIM, cambiando el aminoácido en la posición 117 por su contraparte en la enzima homóloga. Tanto la TcTIM Cys118Val como la TbTIM Val117Cys presentaron el mismo comportamiento en presencia del MMTS, cuando se compararon con sus correspondientes enzimas silvestres (Garza-Ramos G., *et al* 1998).

Una vez que las estructuras cristalográficas de TbTIM y TcTIM se depositaron en el PDB (5TIM y 1TCD, respectivamente), se pudieron comparar estas dos proteínas a detalle. A pesar de que ambas estructuras cristalográficas se superponen con un RMS de 0.96 Å, se encontraron algunas diferencias relevantes que se describen a continuación (Maldonado, E., *et al.*, 1998). Al final del asa 1, que antecede a la hélice 1, tanto en TcTIM como TbTIM, se encuentra una Ser en la posición 17 en TbTIM y 18 en TcTIM. Este residuo forma parte del extremo amino terminal de la primer hélice. El primer residuo de esta hélice en TbTIM es la Gln18, el nitrógeno de su grupo amida se encuentra a una distancia de puente de hidrógeno del oxígeno del enlace peptídico entre el Asp85 y la Phe86 de la otra subunidad. Así mismo, el oxígeno del grupo carboxilo del Asp85 también se

encuentra a una distancia de puente de hidrógeno del nitrógeno del enlace peptídico entre la Ser17 y la Gln18 (Figura 9A). En TcTIM el arreglo del inicio de la hélice 1 con el último residuo de la hélice 3, difiere considerablemente con el arreglo respectivo en TbTIM. En TcTIM, el grupo carboxilo del Glu19 del monómero B se encuentra a una distancia de 6.5 Å del enlace peptídico entre el Asp86 y la Tyr87 de la otra subunidad, de manera similar, el grupo carboxilo del Asp86 del monómero A se encuentra a 6.7 Å del nitrógeno del enlace peptídico entre la Ser18 y el Glu19.



**Figura 9. Acercamiento de la región que se encuentra entre el final del asa 1 de una subunidad y la hélice 3 de la subunidad adyacente de TbTIM (verde) y TcTIM (naranja).** A) Distancias entre los aminoácidos del asa 1 y de la hélice 3. En TbTIM la Gln 18 se encuentra a 3.3 Å del oxígeno del enlace peptídico entre el Asp85 y la Phe86 de la otra subunidad, así mismo, el Asp 85 se encuentra a 3.0 Å de distancia del enlace peptídico entre la Ser17 y la Gln18 del otro monómero. B) Se indica con una flecha la cavidad que se forma entre el asa 1 de un monómero y la hélice 3 de la subunidad vecina, se observa que esta cavidad es mayor en TcTIM. Modificada de Maldonado E., *et al.*, 1998

De esta forma, se observó que las interacciones entre la hélice 1 y la hélice 3, de la subunidad adyacente son diferentes en ambas enzimas, debido a la

conformación del Glu 19 existente en TcTIM y comparada con la Gln 18 en TbTIM (Figura 9B). En el mismo contexto, se creó una mutante de TcTIM en la cual la Pro24 fue sustituida por Glu (el aminoácido correspondiente en TbTIM). El Glu23 en TbTIM (hélice 1) forma un puente de hidrógeno con la Gln 19, en TcTIM en esta posición hay una Pro, por lo que no existe el puente de hidrógeno con la Ser20 (equivalente a la Gln19 en TbTIM). Por este motivo, se construyó la mutante Pro24Glu, con el fin de introducir un puente de hidrógeno entre los residuos 20 y 24 y así permitir que la distancia entre las dos vueltas de la hélice se acortara sin perturbar las interacciones hidrofóbicas de la hélice 1 con la hebra  $\beta$  interna. Con este acortamiento de la hélice se predijo que se generaría una cavidad mayor entre la hélice 1 y la 3 de la subunidad adyacente. Esta enzima mutante presentó un aumento de 5 veces en la susceptibilidad a los agentes de sulfhidrilo. De esta manera se concluyó que un aumento en la separación entre el inicio de la hélice 1 y el final de la hélice 3 es importante para la accesibilidad de los agentes que perturban la Cys de interfase. Se puede decir que conforme el tamaño de la cavidad entre las dos hélices aumenta, la sensibilidad a los reactivos de grupo sulfhidrilo aumenta también de manera proporcional, presentando el siguiente orden de resistencia a la acción de los reactivos derivatizantes de cisteínas: TbTIM>TcTIM>Pro24Glu (Maldonado E., *et al.*, 1998)

Reyes Vivas y cols. en el 2001 mostraron particular interés, tanto en las regiones que ya habían sido estudiadas de la primera hélice, como en algunas otras diferencias en el asa 3. Se construyó una mutante de TcTIM en la cual se sustituyó el Glu19 por Gln (el aminoácido correspondiente en TbTIM). Esta mutante fue ligeramente más sensible a la inactivación por el MMTS. De aquí se pudo concluir que la existencia de un ácido glutámico o una glutamina en la posición 18 no influye en la marcada diferencia en sensibilidad a los agentes de grupo sulfhidrilo entre TbTIM y TcTIM (Reyes-Vivas H., *et al.*, 2001)(Tabla 2)

La resistencia de LmTIM a la inactivación por los agentes derivatizantes es mayor que la de TbTIM. La constante de inactivación ( $k_2$ ,  $M^{-1}$ ,  $s^{-1}$ ) de LmTIM por



MMTS es 3 veces menor con respecto a la de TbTIM y 250 veces menor con respecto a la calculada para TcTIM (Reyes-Vivas H., *et al.*, 2001). Al estudiar el asa 3 de TcTIM, en su parte final se encontró que, en la posición 18, donde TbTIM y LmTIM tienen una Pro, TcTIM tiene una Gln. Por otro lado, gran parte de los aminoácidos del asa 3 de TbTIM y LmTIM son idénticos entre sí; sólo difieren con respecto a los de TcTIM en los residuos 70 y 71. Con el fin de determinar si esas diferencias eran las responsables de la alta susceptibilidad de TcTIM a los agentes derivatizantes, se construyeron dos mutantes de TcTIM, una en la que Gln82 fue sustituida por Pro, la cual a su vez fue tomada como molde para construir una triple mutante en la cual la Thr70 y la Arg71 se sustituyeron por los residuos que existen en TbTIM y en LmTIM: Thr70Ala/Arg71Lys/Gln82Pro. La constante de inactivación por MMTS de la mutante Gln82Pro fue aproximadamente 30% menor con respecto a la reportada para la TcTIM silvestre. En la triple mutante esta constante resultó mucho menor, lo que indica que la secuencia de aminoácidos del asa 3, y los residuos adyacentes, contribuyen parcialmente a la susceptibilidad de la cisteína de interfase a los reactivos sulfhidrilo. Resulta importante remarcar que la triple mutante, la cual posee el asa 3 idéntica a la de TbTIM y a la de LmTIM, presentó una sensibilidad al MMTS 31 y 114 veces mayor con respecto a TbTIM y LmTIM, respectivamente (Reyes-Vivas H., *et al.*, 2001)(Tabla 2).

En nuestro laboratorio se han estudiado ampliamente los aminoácidos de la interfase de ambas enzimas; la identidad entre ellos es del 82% y hay 7 residuos que son diferentes. Con el objetivo de saber si las diferencias existentes en esta región de la proteínas era la responsable del distinto comportamiento entre TbTIM y TcTIM a la inactivación con los reactivos de sulfhidrilo, se construyeron dos mutantes: una de TcTIM, que posee los aminoácidos de la interfase de TbTIM (TcTIM7) y la mutante inversa, es decir TbTIM con los aminoácidos de la interfase de TcTIM (TbTIM7) (García-Torres I., 2006 Tesis de Maestría). Cuando ambas enzimas fueron sometidas a la inactivación con los derivatizantes, TcTIM7 se comportó de manera similar a la enzima silvestre TcTIM, mientras que en la

mutante de TbTIM (TbTIM7) el efecto fue más drástico, obteniendo una constante de inactivación por MMTS 3 veces mayor con respecto a la enzima silvestre. En la tabla 1 se muestran los valores de la constante de inactivación del MMTS de algunas de las mutantes antes mencionadas.

A pesar de numerosos esfuerzos y de haber monitoreado puntualmente diversos sitios en la TIM, hasta ahora no se ha podido encontrar cual (es) región o regiones de aminoácidos son las que influyen directamente en el diferente comportamiento de TbTIM y TcTIM, ya que todos los resultados han sido parciales y no determinantes. De esta manera, el principal interés de este proyecto es monitorear distintas regiones de las enzimas con el fin de encontrar las secuencias responsables de las diferencias a la inactivación por derivatización.

Enzima	$k_2$ ( $M^{-1}, s^{-1}$ ) por MMTS	Referencia
TbTIM	0.6	Pérez-Montfort R., <i>et al.</i> , 1999
TcTIM	40	Pérez-Montfort R., <i>et al.</i> , 1999
TcTIM Glu19Gln (hélice 1)	90	Reyes-Vivas H., <i>et al.</i> , 2001
TcTIM Gln82Pro (hélice 3)	32	Reyes-Vivas H., <i>et al.</i> , 2001
TcTIMThr70Ala/Arg71Lys/Gln82Pro (asa 3, hélice 3)	18	Reyes-Vivas H., <i>et al.</i> , 2001
TcTIMinterfaseTbTIM (TcTIM7)	≈40	Datos no publicados
TbTIMinterfaseTcTIM (TbTIM7)	1.74	García-Torres I., 2006

**Tabla 2.** Constantes de inactivación por MMTS de TbTIM y TcTIM silvestres y algunas mutantes.

## **2.6. La triosafosfato isomerasa como modelo de estudio para entender la relación estructura-función en las proteínas.**

La caracterización de las proteínas tiene un objetivo principal: comprender su función así como los factores que la regulan y la alteran. En este sentido, existen muchos estudios enfocados a identificar cual aminoácido o aminoácidos son los participantes de una función dada. De esta manera, se han definido dominios estructurales, sitios catalíticos, sitios de unión de sustrato, sitios alostéricos y varias zonas importantes que caracterizan a una función específica. Muchos de estos sitios se conservan a lo largo de la evolución como por ejemplo, los sitios catalíticos, mientras que otros son especie-específicos. Estos últimos han cobrado gran interés en el diseño y desarrollo de fármacos antiparasitarios, en donde se intenta abatir una función específica en el parásito sin afectar la función de la proteína en el humano. En este contexto la TIM ha sido un excelente modelo de estudio, de tal forma que es una de las enzimas glucolíticas más ampliamente estudiadas, de la que se conocen perfectamente sus mecanismos catalíticos y los aspectos estructurales más importantes, ya que se han difractado hasta la fecha un gran número de cristales de esta proteína de diferentes especies.

El problema central de este trabajo de investigación es saber que parte de la secuencia de aminoácidos de la TIM confiere a la resistencia o susceptibilidad ante los agentes de grupo sulfhidrilo, por esta razón al seleccionar dos proteínas homólogas casi idénticas nos permiten evaluar cuales cambios pueden ser los responsables del distinto comportamiento.

### **2.6.1 Distintos acercamientos para estudiar la relación estructura-función en la triosa-fosfato isomerasa.**

Cuando se quiere saber la función de un aminoácido específico, la estrategia que se utiliza preferencialmente es mutarlo y evaluar las consecuencias de dicho cambio. La estrategia de mutagénesis dirigida se utiliza de manera rutinaria en la biología molecular con el fin de cambiar aminoácidos a libre elección y así analizar

el efecto de cada mutación. En algunos casos, el aminoácido de interés es mutado por algún aminoácido presente en la misma proteína, pero de otra especie, o bien existe la estrategia de monitoreo por alaninas o su nombre en inglés “Alanine scanning”, en donde el aminoácido de interés es mutado por alanina. El cambio por este aminoácido, permite evaluar el efecto del residuo mutado, además que por ser un aminoácido pequeño y que su cadena lateral es químicamente inerte, no emula las características de ninguno de los otros aminoácidos (Morrison K.L. y Weiss G.A, 2001).

A lo largo de los años se han hecho numerosos estudios de mutagénesis dirigida en la TIM. Por mencionar algunos ejemplos, en el trabajo de Hernández-Alcántara y cols. se mutó exhaustivamente la cisteína de interfase de TbTIM. Este residuo fue sustituido por los 19 aminoácidos restantes, con el objetivo de evaluar el efecto de cada sustitución en la catálisis y estabilidad de la enzima. Se encontró que mutar la cisteína de interfase por Ala, Ser, Pro, Thr o Val no afecta la actividad y estabilidad de la enzima; sin embargo el cambio por Asn, Arg o Gly dio como consecuencia enzimas con muy baja actividad. Cambiar por los aminoácidos restantes resultó en proteínas con menos del 1% de actividad con respecto a TbTIM silvestre. Con este trabajo se demostró el papel importante que juega la cisteína de interfase en la actividad de la TIM que se encuentra directamente relacionado con el proceso de dimerización de la enzima (Hernández-Alcántara G., *et al.*, 2002).

La mutagénesis dirigida también ha sido de vital importancia en los esfuerzos por encontrar los aminoácidos responsables del distinto comportamiento en TcTIM y TbTIM ante diversos agentes que afectan la catálisis. En el caso particular de los agentes de grupo sulfhidrilo como el MMTS y el DTNB, se han generado un importante número de mutantes en las cuales se han monitoreado algunos aminoácidos como posibles candidatos que definen la diferencia entre TcTIM y TbTIM. Estos acercamientos se basaron principalmente en las diferencias de estas dos proteínas en los aminoácidos cercanos y en el ambiente circundante de

la cisteína de interfase. Algunas mutantes que se construyeron para este fin fueron la Pro24Glu, Glu19Gln, Gln82Pro, Thr70Ala/Arg71Lys/Gln82Pro, todas ellas tomando como molde a TcTIM (Maldonado E., *et al.*, 1998; Reyes-Vivas H., *et al* 2001). En el mismo sentido, se monitoreó la interfase entre los dímeros, debido a que la cisteína 14 se encuentra inmersa en esta cavidad. Al mutar los siete aminoácidos diferentes de la interfase, tanto en TcTIM (TcTIM7) como en TbTIM (TbTIM7) no se encontró que estas diferencias estuvieran involucradas en la diferencia de comportamiento (García-Torres I., 2006).

A pesar de que estas mutantes no han revelado cuales aminoácidos son los responsables del comportamiento diferencial de estas dos enzimas, si han generado información de zonas localizadas en la TIM. Ahora sabemos que ni los cambios en el asa 3, ni los cambios en la interfase son los protagonistas del efecto diferencial de los agentes de grupo sulfhidrilo en estas TIM's de tripanosomátidos. Hasta este momento y con base en todos los antecedentes presentados, sabemos que la diferencia en estas dos enzimas no es un efecto a corta distancia, ya que se han monitoreado todas las posibilidades de la vecindad cercana. Dado esto, la siguiente posibilidad por explorar son las zonas distantes a la cisteína de interfase.

### **2.6.2 Las interacciones a larga distancia juegan un papel importante en la estabilidad y plegamiento de las proteínas con plegamiento de tipo barril TIM**

Las fuerzas intramoleculares que estabilizan a las proteínas son de dos tipos principalmente: las interacciones locales y las interacciones a larga distancia. Estas últimas han sido estudiadas ampliamente en su relación con el plegamiento de las proteínas globulares. Desde hace un poco más de una década se han estudiado las interacciones a larga distancia en las proteínas que presentan plegamiento del tipo barril ( $\beta$ - $\alpha$ )<sub>8</sub>. Estos estudios han arrojado resultados interesantes, entre los cuales se encuentra el trabajo de Selvaraj y Gromiha en donde se hace un análisis con 36 proteínas con plegamiento tipo ( $\beta$ - $\alpha$ )<sub>8</sub>. En este trabajo se evaluó el número de interacciones a larga distancia así como los

aminoácidos que favorecen este tipo de interacciones. El análisis consistió en medir estos contactos utilizando un criterio simple en términos de distancia de residuos. Se encontró que cuando el aminoácido principal se encuentra a una distancia de 21-30 residuos se favorecen mayoritariamente las interacciones a larga distancia. Todos los aminoácidos mostraron preferencia por el rango de 21-30 residuos para formar este tipo de contactos, excepto algunos aminoácidos aromáticos como la Phe, el Trp y la Tyr, en este grupo también se incluye a la Lys. En el rango de 21-30 residuos, la Cys presentó el máximo número de contactos, seguida de la Leu, Ile y Val. Otro hecho interesante es que los aminoácidos que tienden a establecer el mayor número de contactos a larga distancia se encontraban localizados en hebras  $\beta$ . En este trabajo se demostró que las interacciones a larga distancia juegan un papel importante en el plegamiento y la estabilidad de las proteínas con plegamiento de tipo  $(\beta-\alpha)_8$  ya que el 87.4% de los aminoácidos presentaron al menos un contacto a larga distancia (Selvaraj y Gromiha., 1998).

También se ha reportado que los protagonistas de las interacciones a corta y a larga distancia se agrupan formando centros de estabilización (Dosztanyi *et al.*, 1997). En estos centros o “clusters” se encuentran predominantemente aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos que se encuentran ocultos al solvente. Estos grupos se han estudiado ampliamente en su relación con los mecanismos de plegamiento en las proteínas de tipo barril  $(\beta-\alpha)_8$  (Kannan N.; *et al.*, 2001). En un estudio realizado por Selvaraj y Gromiha en el 2003, en el cual identificaron los aminoácidos clave que conforman estos centros hidrofóbicos en 36 proteínas con plegamiento tipo barril  $(\beta-\alpha)_8$ , de la misma manera se calcularon las interacciones a corta, media y larga distancia que existe para cada uno de estos aminoácidos. Se observó que excepto tres de 36 proteínas estudiadas, todas contienen centros hidrofóbicos que contribuyen al correcto empacamiento de las proteínas. También se observó que los centros hidrofóbicos se conservan estructuralmente en todas las proteínas estudiadas lo que demuestra su papel fundamental en el plegamiento

de este tipo de proteínas. Se calculó la contribución de las interacciones a corta, media y larga distancia para los aminoácidos clave en los centros hidrofóbicos. Se observó que las interacciones a larga distancia son las que contribuyen mayoritariamente, con una contribución promedio de 65.4%, lo que apoya fuertemente que las interacciones a larga distancia juegan un papel importante en la formación de los centros hidrofóbicos y en la estabilidad de las proteínas. Cabe destacar que este tipo de interacciones se presentan de manera considerable en los centros hidrofóbicos localizados preferencialmente en las hebras  $\beta$  o en los giros cercanos a las hojas  $\beta$ .

Cuando se estudió a detalle la estructura de la Taka amilasa (Código PDB: 2TAA) se observó que 4 de sus cinco centros hidrofóbicos se encuentran en las hebras  $\beta$  y que además estos centros forman una red de interacciones a la larga distancia que los interconecta. Este tipo de redes entre centros hidrofóbicos también se ha reportado para otras proteínas con el mismo tipo de plegamiento.

El hecho de que las interacciones a larga distancia se den principalmente entre aminoácidos localizados en las hebras  $\beta$  y que las interacciones a media y corta distancia estén dadas por aminoácidos en las hélices  $\alpha$  apoyan las hipótesis formuladas por Sheinerman y Brooks en las cuales mediante el uso de dinámica molecular se observó que las hélices  $\alpha$  se forman primero y una vez que las interacciones y contactos locales se forman, se pliegan las hebras  $\beta$  (Sheinerman y Brooks., 1998).

Todos estos hechos resaltan el papel central que juegan tanto los centros hidrofóbicos como las interacciones a larga distancia en los mecanismos de plegamiento y estabilidad de las proteínas con plegamiento tipo barril TIM. Así mismo estos estudios abren una posibilidad de estudio con el fin de averiguar si este tipo de interacciones también están involucradas en otro tipo de eventos, relacionados con la catálisis y estabilidad de las proteínas.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Identificar la (s) región (es) responsables del distinto comportamiento entre TbTIM y TcTIM ante el efecto inactivante de los reactivos de grupo sulfhidrido.

#### **3.2 Objetivos particulares.**

- Obtener quimeras de TcTIM que contengan distintas regiones de TbTIM.
- Purificar dichas quimeras.
- Caracterización cinética de las proteínas quiméricas.
- Evaluar el efecto de los derivatizantes en la actividad de las enzimas.



## **4. Materiales y Métodos.**

### **4.1 Nomenclatura utilizada para nombrar a las distintas proteínas quiméricas.**

El objetivo principal de este trabajo es la transformación progresiva de TcTIM en TbTIM, por tal motivo se diseñaron, purificaron y caracterizaron diferentes proteínas quiméricas de TcTIM a las que gradualmente se les adicionaron regiones de TbTIM. Con fines prácticos, cada una de las proteínas quiméricas se nombra de acuerdo a las regiones de TcTIM que posee, las regiones restantes, que no se mencionan, corresponden a regiones de TbTIM (Tabla 2). En este sentido, y a manera de ejemplo, la llamada quimera TcTIM 1-6, tiene las regiones 1-6 de TcTIM y las regiones 7 y 8 de TbTIM; la quimera TcTIM 4, sólo tiene la región 4 de TcTIM y las regiones 1-3 y 5-8 de TbTIM y la quimera TcTIM 2, 3, 5-8, sólo cuenta con las regiones 1 y 4 de TbTIM y seis regiones de TcTIM.

### **4.2 Diseño de los genes de las proteínas quiméricas.**

Partiendo de las secuencias de DNA reportadas en la base de datos del NCBI que codifican para TbTIM y TcTIM (códigos: X03921 y U53867, respectivamente) se diseñaron los genes de tres quimeras: TcTIM 1-6, TcTIM 1-5 y TcTIM 1-4. Estos genes fueron sintetizados por la compañía Genscript (Piscataway, NJ). El gen de la quimera TcTIM1-4 fue diseñado de tal manera que a partir de éste se pudieran construir otras quimeras. Este diseño involucró algunas modificaciones en las secuencia nucleotídicas para generar el sitio de restricción para la enzima *HaeIII* entre las bases 292-300. Utilizando esta enzima de restricción se pudo obtener la región 4 de TcTIM o TbTIM para construir las quimeras TcTIM1-3 y TcTIM4, respectivamente. El gen de la quimera TcTIM1-3,5-8 también fue sintetizado comercialmente por Genscript.

La quimera TcTIM1-2 se obtuvo a partir de tres reacciones de PCR, utilizando la enzima Accuzyme DNA polymerase (Biolone, Taunton MA). En la primera reacción

de PCR se amplificaron las regiones 1 y 2 de TcTIM utilizando el oligonucleótido externo T7 Promotor y el oligonucleótido 5'GCGTTCTGTGCGGCAATCTG3' (Rv12), tomando como templado el DNA de la quimera TcTIM1-4. En la segunda reacción de PCR se amplificó de la región 3 a la 8 de TbTIM, utilizando el oligonucleótido externo T7 Terminador y el oligonucleótido 5'CAGAACGCCATTGCAAAGAGC3'(Fw38) usando como molde el DNA de TbTIM silvestre. En la tercera reacción de PCR se unieron estos dos fragmentos para dar origen al gen completo amplificando con los oligonucleótidos T7 Promotor y T7 Terminador.

Esta misma estrategia se utilizó para obtener la quimera TcTIM1, utilizando los mismos oligonucleótidos externos y los oligonucleótidos 5'GTGCAATGCGTAGTGGCCTCC3'(Fw28) y 5'TGATCACGATGTGCAATGCGT3'(Rv1). En la primera reacción de PCR se amplificó la región 1 de TcTIM, flanqueando con el oligonucleótido T7 Promotor y Rv1 el DNA de la quimera TcTIM1-4. En la segunda reacción se amplificaron de las regiones 2 a la 8 de TbTIM tomando como templado el DNA de TbTIM silvestre y los oligonucleótidos T7 Terminador y Fw28. En la tercera reacción de PCR se unieron ambos fragmentos amplificando con los oligonucleótidos externos T7 Promotor y T7 Terminador.

Los oligonucleótidos Fw28 y Rv1 se utilizaron para construir la quimera TcTIM 2, 3, 5-8. Tomando como molde el DNA de TbTIM silvestre con el oligonucleótido T7 Promotor y el Rv1, se amplificó la región 1 de TbTIM la cual fue unida a las regiones 2-8 de la quimera TcTIM1-3, 5-8 que se amplificaron flanqueando, con el oligonucleótido T7 Terminador y Fw28, el DNA de la quimera TcTIM1-3,5-8.

Todos los genes de las quimeras se clonaron en el plásmido de expresión pET-3a con los sitios de restricción *Nde-I*, *BamHI*. Cada gen fue secuenciado y transformado en células BL21(DE3)pLysS (Novagen, Madison WI).

### 4.3 Sobreexpresión y purificación de las proteínas quiméricas.

Una vez que bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3)pLysS se transformaron con los genes de las quimeras, se inocularon en medios Luria Bertani suplementados con 100  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina y se incubaron a 37 °C. Una vez que los cultivos alcanzaron un valor de absorbancia  $A_{600 \text{ nm}} = 0.6$  se indujeron con isopropil- $\beta$ -D tiogalactopiranosido (IPTG) 0.4 mM y se incubaron durante 12 horas a 30 °C.

Los protocolos de purificación reportados para TcTIM y TbTIM son distintos (Ostoa-Saloma P., *et al.*, 1997; Borchert T.V., *et al.*, 1993a; respectivamente). Las principales diferencias radican en la distribución de ambas proteínas una vez que las células bacterianas se sonicán. Después de la centrifugación del lisado celular, TcTIM se distribuye principalmente en la fracción soluble, mientras que TbTIM se encuentra mayoritariamente en los restos membranales. Para solubilizar a TbTIM, la fracción membranal se trata con NaCl 300 mM. Debido a que las quimeras contienen diversas regiones de ambas proteínas, fue pertinente realizar algunas modificaciones a los protocolos reportados para la purificación de las proteínas quiméricas.

Cada enzima quimérica se sometió a un análisis previo a su purificación para determinar su distribución, ya fuera en la fracción insoluble o en el sobrenadante. Con esta información cada quimera se trató, o como TcTIM, o bien como TbTIM. En la tabla 3 se presenta la localización preferencial de cada quimera, haciendo mención de si fueron tratadas con NaCl o no.

Una vez transcurridas las doce horas de inducción, se colectó el paquete celular mediante centrifugación y se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis (MES 100 mM pH: 6.3, DTT 1mM, EDTA 0.5 mM y PMSF 0.2 mM). Aquellas quimeras que se distribuyeron principalmente en la fracción insoluble, se rompieron en presencia del amortiguador de lisis con NaCl 300 mM. Cada suspensión se sonicó

5 veces durante 40 segundos con 1 minuto de descanso entre cada ciclo. Los restos celulares se separaron del sobrenadante mediante una centrifugación a 14,000 x g durante 1 hora. No todos los cultivos de las quimeras se rompieron con facilidad mediante cinco ciclos de sonicación, por ejemplo, a la quimera TcTIM 4 fue necesario sonicarlas más de 10 veces y la apariencia del lisado celular difería con respecto a las células que sobreexpresaron el resto de las quimeras.

Quimera	Regiones de TcTIM	Regiones de TbTIM	Método de purificación
TcTIM 1-6	1-6	7,8	TcTIM
TcTIM 1-5	1-5	6-8	TcTIM
TcTIM 1-4	1-4	5-8	TbTIM, NaCl 300 mM
TcTIM 1-3	1-3	4-8	TbTIM, NaCl 300 mM
TcTIM 4	4	1-3, 5-8	TbTIM, NaCl 300 mM
TcTIM 1-3, 5-8	1-3, 5-8	4	TcTIM
TcTIM 1-2	1-2	3-8	TbTIM, NaCl 300 mM
TcTIM 1	1	2-8	TbTIM, NaCl 300 mM
TcTIM 2,3, 5-8	2,3,5-8	1, 4	TcTIM

**Tabla 3. Regiones incluidas en cada quimera y método de purificación utilizado para obtener cada una.**

Aquellas quimeras que se comportaron como TbTIM y que fueron tratadas con NaCl 300 mM para solubilizarlas, se diluyeron en el amortiguador de lisis sin NaCl, hasta una concentración aproximada de NaCl 20 mM. Los sobrenadantes se cargaron en una columna de intercambio iónico SP-Sepharose (Fast Flow), previamente equilibrada con amortiguador de MES 50 mM pH 6.3. Las proteínas se eluyeron con un gradiente de concentración de NaCl de 0-500 mM en el mismo amortiguador. Una vez que las proteínas se habían eluido, se precipitaron con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 70% en agitación a 4° C durante 12 horas. El precipitado se separó mediante centrifugación a 23,000 x g durante 15 min y se disolvió en 3 mL de amortiguador de trietanolamina (TEA) 100 mM pH 7.4, EDTA 1 mM; a esta suspensión se le adicionó la cantidad necesaria de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para alcanzar una

concentración final de 2.2 M. El siguiente paso de purificación consistió en la separación de las proteínas de interés utilizando una columna hidrofóbica Toyopearl, previamente equilibrada con amortiguador de TEA 100 mM pH 7.4, EDTA 1 mM y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.2 M. Las proteínas quiméricas se eluyeron con un gradiente lineal de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 2.2 a 0 M. Las fracciones con las proteínas de interés se concentraron para tener una concentración mayor de 1 mg/mL.

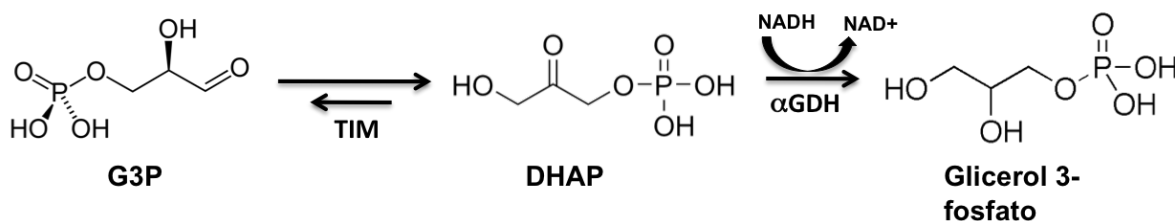
Todos los pasos de las distintas purificaciones se monitorearon a lo largo del proceso de purificación en geles SDS-PAGE al 16%, teñidos con azul de Coomassie, y mediante el seguimiento de la actividad catalítica. Las proteínas puras se almacenaron a concentraciones mayores de 1 mg/mL, a 4°C y precipitadas en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 70% de saturación.

En los pasos intermedios de la purificación se cuantificó la concentración de proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA, Protein Assay Reagent Kit) a 562 nm. La concentración de las proteínas puras se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y utilizando los coeficientes de extinción molar  $36\,440\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  para TcTIM silvestre, TcTIM1-6, TcTIM1-5, TcTIM1-4, TcTIM1-3, TcTIM1-3,5-8 y TcTIM2,3,5-8 y  $34\,950\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  para TbTIM silvestre, TcTIM4, TcTIM1-2 y TcTIM1, respectivamente. Estos valores de coeficientes de extinción molar fueron calculados a partir de la secuencia de aminoácidos utilizando el programa ExPASy ProtParam.

#### **4.4 Determinación de la actividad catalítica de TbTIM, TcTIM y de las enzimas quiméricas.**

La actividad enzimática de TIM se determinó a 25 °C siguiendo la conversión de gliceraldehído 3-fosfato (GAP) a dihidroxiacetona-fosfato (DHAP), utilizando como enzima acoplante la  $\alpha$ -glicerolfosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH) y monitoreando la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADH (Figura 10). La mezcla de reacción contenía TEA 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, GAP 1 mM, NADH 0.2 mM y  $\alpha$ -GDH 20  $\mu\text{g/mL}$ . La reacción se inició con la adición de la TIM

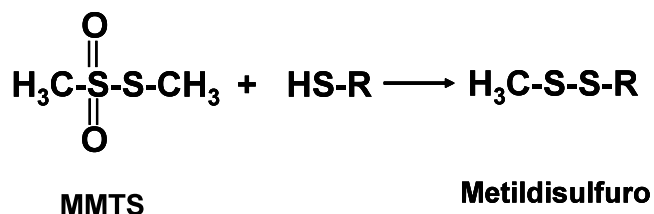
correspondiente a una concentración de 5 ng/mL. Para la determinación de los parámetros cinéticos, se varió la concentración de GAP en un rango de 0.05 a 2 mM; los datos obtenidos se ajustaron al modelo de Michaelis y Menten y, mediante regresión no lineal, se calcularon los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ .



**Figura 10. Reacción acoplada para determinar la actividad de la TIM.** La transformación de G3P a DHAP catalizada por la TIM, se monitorea espectrofotométricamente con la reacción acoplada de la  $\alpha$ -GDH, enzima que convierte la DHAP en glicerol 3-fosfato utilizando NADH.

#### 4.5 Ensayos de inactivación de las enzimas silvestres y quiméricas con MMTS.

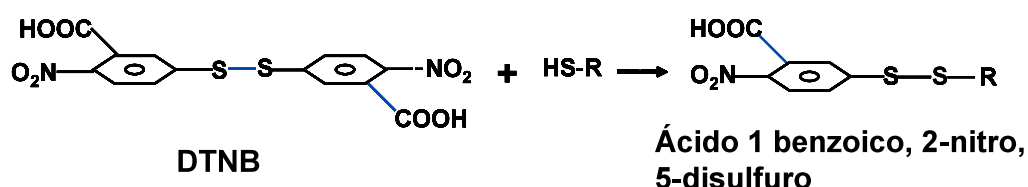
El metilmetano tiosulfonato (MMTS) reacciona exclusivamente con Cys, produciendo el derivado metildisulfuro que es relativamente pequeño (Figura 11). Tanto las enzimas silvestres, como las quimeras, se incubaron a una concentración de 250  $\mu$ g/mL en amortiguador de TEA 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, a 25  $^{\circ}$ C, en presencia de concentraciones crecientes de MMTS de 2.5 a 100  $\mu$ M, durante dos horas. Al término de este tiempo se midió la actividad utilizando 5 ng/mL de proteína en cada celda. Los datos de actividad se reportan como el porcentaje de actividad residual, tomando como 100% la actividad de cada enzima incubada a la misma concentración sin MMTS.



**Figura 11. Reacción de derivatización entre el MMTS y un grupo sulfhidrilo libre.**

## 4.6 Cuantificación de cisteínas derivatizadas con DTNB.

El ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) reacciona equimolarmente con grupos sulfhidriilo dando lugar al ácido 1-benzoico, 2-nitro, 5-disulfuro (Figura 12).



**Figura 12. Reacción de derivatización entre el DTNB y un grupo sulfhidriilo libre.**

Tanto en las enzimas silvestres, como en las proteínas quiméricas, se determinó el número de cisteínas derivatizadas con DTNB en función del tiempo. Las enzimas se incubaron a una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en un amortiguador de TEA 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, en presencia de DTNB 1 mM. Se monitorearon los cambios de absorbancia a 412 nm, a partir del momento en que las enzimas se adicionaron a la mezcla de derivatización durante 25 minutos. Paralelamente se monitoreó en otra celda el blanco, el cual contenía la mezcla de derivatización sin proteína. Estos valores fueron restados a los valores experimentales obtenidos para cada muestra. El número de cisteínas derivatizadas a los 12 minutos se obtuvo empleando la ecuación 1.

$$N = (A_{412\text{nm}}/\epsilon) / (\text{concentración de proteína en mg/ PM de la proteína})$$

**Ecuación 1. Determinación del número de cisteínas derivatizadas.** N: número de cisteínas derivatizadas;  $A_{412\text{ nm}}$ : absorbancia a 412 nm a un determinado tiempo;  $\epsilon$ : coeficiente de extinción molar del TNB,  $13,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

#### **4.7 Cristalización de la quimera TcTIM 2, 3, 5-8, difracción de rayos X, y recolección de los datos.**

La quimera TcTIM 2, 3, 5-8 se cristalizó mediante difusión de vapor utilizando el método de la gota sentada. Se tomó 1  $\mu$ L de la proteína a una concentración de 35 mg/mL, la cual se mezcló con la solución reservoria. Después de 1 o 2 semanas de incubación, se obtuvieron cristales en la condición H3 del kit HT (Hampton Research). Los mejores cristales crecieron a 9°C en la solución reservoria que contenía Malonato de sodio 200 mM y polietilen glicol 3350 al 20%. Para su conservación y transporte los cristales se crioprotegieron, para lo cual fue necesario aumentar la concentración del polietilen glicol 3350 en la gota del cristal hasta un 35% y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido. Los datos de la difracción se colectaron en el Life Sciences Collaborative Acces Team (LS-CAT) 21-ID-F en el Advance Photon Source (Argonne National Laboratory), usando un detector MarMosaic 225. Los datos fueron procesados con MOSFLM (Leslie AGW, 1992) y tratados con SCALA (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

La estructura fue resuelta por el método de reemplazo molecular utilizando el programa PHASER (McCoy AJ., *et al.*, 2007). Se tomaron las coordenadas de TcTIM silvestre con el código del PDB 1TCD como templado para hacer el reemplazo molecular. El refinamiento de los datos se realizó con los programas Refmac (Murshudov G.N., *et al.*, 1997) y Phenix (Adams P.D., *et al.*, 2010). El modelaje molecular se hizo utilizando el programa COOT (Murshudov G.N., *et al.*, 1997). Los datos cristalográficos y la estadística del refinamiento se presentan en la tabla 4. Las coordenadas y los factores de la estructura cristalográfica se depositaron en la base de datos del Protein Data Bank (PDB) con el código 3Q37.



<b>Parámetros</b>	
<b>Estadística de la colección de datos</b>	
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub>
Dimensiones de la celda unitaria	
a, b, c (Å)	83.6, 77.2, 85.4
Ángulos $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (grados)	90.0, 116.6, 90.0
Rango de resolución (Å)	54.3-1.65 (1.74-1.65)
Número de reflexiones	336,767 (40,524)
Número de reflexiones únicas	107,171 (13,903)
Totalidad de los datos(%)	91.9 (82.4)
R <sub>sim</sub> (%)	7.3 (27.5)
I/ $\sigma$	6.9 (2.3)
Media(I)/ds	10.5 (3.9)
<b>Estadística del refinamiento</b>	
Rango de resolución (Å)	41.7-1.65 (1.70-1.65)
R <sub>crist</sub> /R <sub>free</sub> (%)	18.9 (25.4)/22.0 (30.7)
Número de átomos, proteína/solvente	7540/991
Media del valor B (Å <sup>2</sup> )	13.2
Valor B a partir de la gráfica de Wilson (Å <sup>2</sup> )	13.6
Desviación de mínimos cuadrados de la longitud de los enlaces (Å)	0.006
Desviación de mínimos cuadrados de los ángulos de enlace (grados)	1.005
Prueba de validación $\sigma$ A (error de coordenadas)	0.21
<b>Residuos en el gráfico de Ramachandran (%)</b>	
Región más permitida.	822 (94.2%)
Región permitida	49 (5.6%)
Región generosamente permitida	2 (0.2%)
Región no permitida <sup>a</sup>	0 (0.0%)

**Tabla 4. Datos cristalográficos de la quimera TcTIM 2,3, 5-8 y datos estadísticos del refinamiento.**

#### 4.8 Determinación del pKa de la cisteína de interfase de las enzimas silvestres y algunas quimeras.

Se determinó el pKa de la cisteína de interfase de las TbTIM y TcTIM silvestres y de cinco quimeras más: TcTIM 1-4, TcTIM 1-3, TcTIM 1, TcTIM 1-3, 5-8, y TcTIM 2, 3, 5-8. El protocolo utilizado fue de acuerdo al reportado por Reyes-Vivas y cols en el 2001 (Reyes-Vivas *et al.*, 2001). Se hicieron algunas modificaciones al protocolo original que se describen brevemente a continuación. Las enzimas se incubaron a una concentración de 5 µg/mL en amortiguador de TEA 100 mM y EDTA 100 mM ajustado a diferentes valores de pH. Los valores de pH ensayados fueron 7.0, 7.4, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5. Así mismo, se probaron dos concentraciones de MMTS. Aquellas quimeras que presentaron un comportamiento similar al de TbTIM, se incubaron con MMTS 80 µM, mientras que las quimeras que fueron sensibles a la derivatización por MMTS iguales a TcTIM, se incubaron en presencia de MMTS 10 µM. En el caso de las proteínas que presentaron un comportamiento intermedio a la inactivación con el MMTS, se probaron con las dos concentraciones de MMTS (10 y 80 µM). Los valores de pKa aparente se calcularon a partir de las gráficas del logaritmo natural (ln) del porcentaje de la actividad residual *versus* el pH. Estas curvas se ajustaron a un modelo derivado de la ecuación de Henderson Hasselbach que se describe a continuación (Ec.2).

$$\ln (\% \text{ actividad}) = (Y_i + Y_f \times 10^{pK_a - pH}) / (1 + 10^{pK_a - pH})$$

**Ecuación 2. Determinación del valor de pKa aparente** a partir de las gráficas que representan el ln del % de actividad de las enzimas incubadas a diferentes valores de pH vs pH; en donde  $Y_i$  y  $Y_f$  representan la actividad inicial y final respectivamente.

## 5. Resultados

### 5.1 Diseño y construcción de las proteínas quiméricas.

Debido a que ambas TIMs poseen una estructura de tipo barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, se dividió la secuencia de aminoácidos en ocho regiones: se agrupó una hebra  $\beta$ , la hélice  $\alpha$  inmediata y el asa de unión. Por otro lado, a partir de un alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre TbTIM y TcTIM, se observó que el mayor número de diferencias se presentaban en las regiones 1, 5 y 6; existen 13 cambios en la región 1, y 15 y 10 cambios en las regiones 5 y 6, respectivamente. De tal forma que, de un total de 65 diferencias, 28 diferencias se encuentran en estas tres regiones (Figura 13).

De esta manera se diseñaron inicialmente 6 quimeras; las primeras tres quimeras contienen las regiones con el mayor número de diferencias, es decir la quimera TcTIM 1-6 tiene las regiones 1-6 de TcTIM y las regiones 7-8 de TbTIM y así consecutivamente las quimeras restantes tienen más regiones de TbTIM y menos de TcTIM, por ejemplo la quimera TcTIM 1; sólo posee la región 1 de TcTIM y las regiones 2-8 de TbTIM (Tabla 3).

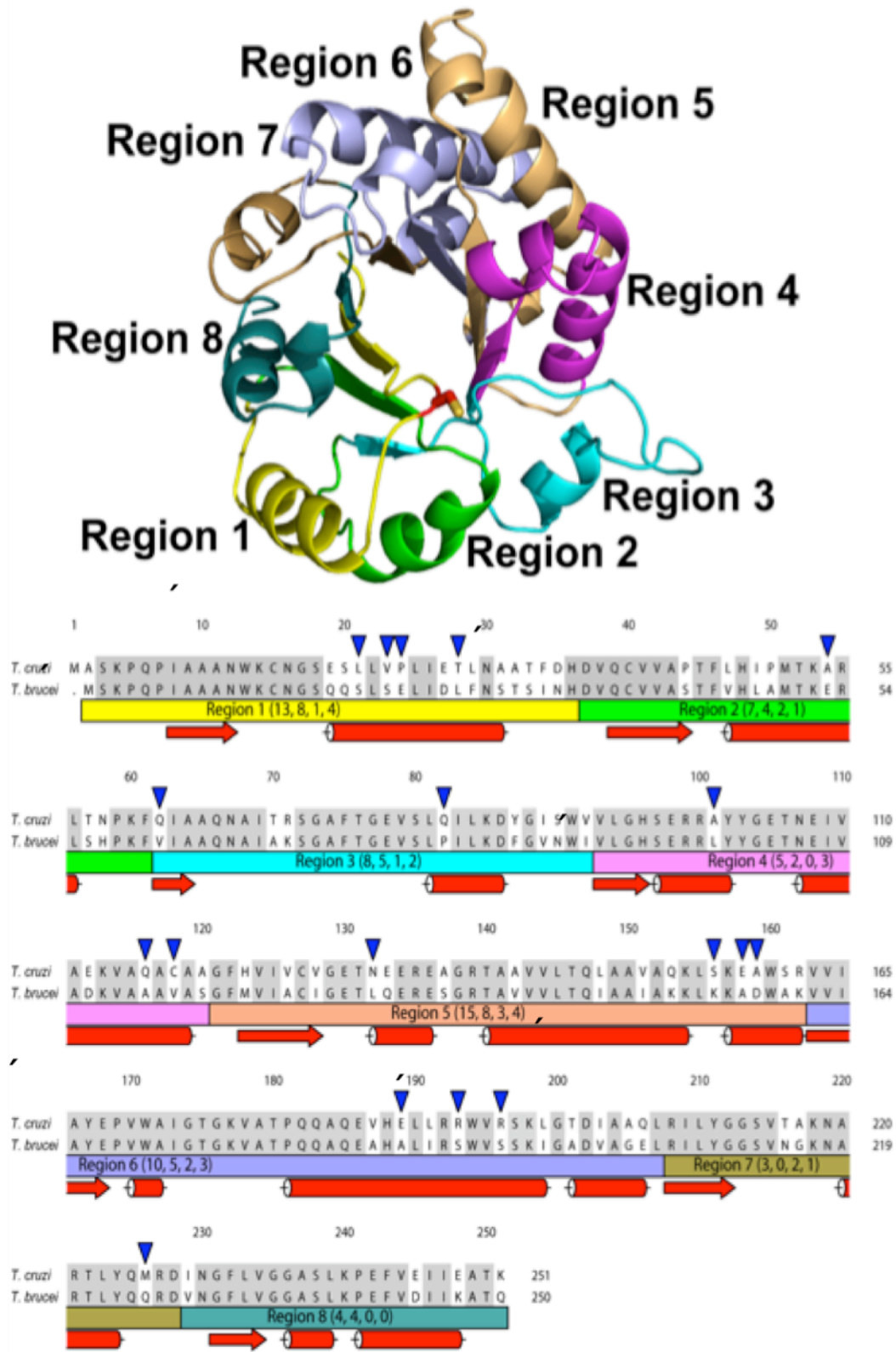


Figura 13. A) Disposición de las 8 regiones en la TIM. B) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TcTIM y TbTIM realizado con el algoritmo Clustal W. Los aminoácidos marcados con flechas azules indican aquellas sustituciones sin homología (18 en total)

## 5.2 Parámetros cinéticos de las proteínas quiméricas.

Se determinó la cinética en estado estacionario de todas las quimeras en la dirección de gliceraldehído 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato. Los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$ , para la mayoría de las quimeras, son muy similares a los de las enzimas silvestres (Tabla 5). Los parámetros cinéticos de la quimera TcTIM 1-6 son menores en comparación con los reportados para las enzimas silvestres; sin embargo, el valor de la eficiencia catalítica ( $K_m/k_{cat}$ ) se encuentra en el mismo rango que los valores de las enzimas silvestres. La eficiencia catalítica de la quimera TcTIM 1-5 es aproximadamente la mitad en comparación con los valores reportados para las enzimas silvestres; esto se debe a un valor disminuido de la  $k_{cat}$ .

Enzima	$K_m$ (mM)	$k_{cat} \times 10^5$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m \times 10^7$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
TbTIM	0.45	3.1	1.15
TcTIM	0.43	2.7	1.05
TcTIM 1-6	0.13	0.956	1.23
TcTIM 1-5	0.38	1.55	0.68
TcTIM 1-4	0.63	3.32	0.87
TcTIM 1-3	0.58	3.31	0.95
TcTIM 1-2	0.57	3.28	0.92
TcTIM 1	0.48	3.17	1.10
TcTIM 4	0.37	2.38	1.07
TcTIM 1-3, 5-8	0.44	2.6	0.97
TcTIM 2,3, 5-8	0.26	3.59	2.29

**Tabla 5. Parámetros cinéticos de TbTIM y TcTIM silvestres, así como de las proteínas quiméricas.**

### 5.3 Efecto del MMTS en la actividad de las quimeras susceptibles.

El metilmetano tiosulfonato (MMTS) inactiva a la TIM debido a la derivatización de los residuos de cisteína, reacciona inicial, y principalmente, con la Cys 14 de la TbTIM o con la Cys 15 en la TcTIM. Se determinó el efecto de diferentes concentraciones de este agente en la actividad de todas las quimeras. En concordancia con resultados previos (Garza-Ramos G., *et al.*, 1998 y Pérez-Montfort R., *et al.*, 1999), se observó que la susceptibilidad de TcTIM es 70 veces mayor con respecto a TbTIM (Figura 14). Las quimeras TcTIM 1-6, TcTIM 1-5 y TcTIM 1-4 presentaron un patrón de inactivación similar al de TcTIM, a pesar de que cada una de ellas tiene diferente número y distribución de regiones de TcTIM y TbTIM. Cabe mencionar que la quimera TcTIM 1-4 posee la mitad de regiones de TcTIM y TbTIM respectivamente, sin embargo presenta una susceptibilidad al MMTS similar a TcTIM. Estos resultados indican que las diferencias en aminoácidos de las regiones 5-8 no están involucradas en el comportamiento diferente observado en TcTIM y TbTIM en presencia del MMTS. En las regiones 5-8 se encuentran un total de 32 diferencias que corresponden al 49% del total de los cambios entre las dos enzimas.

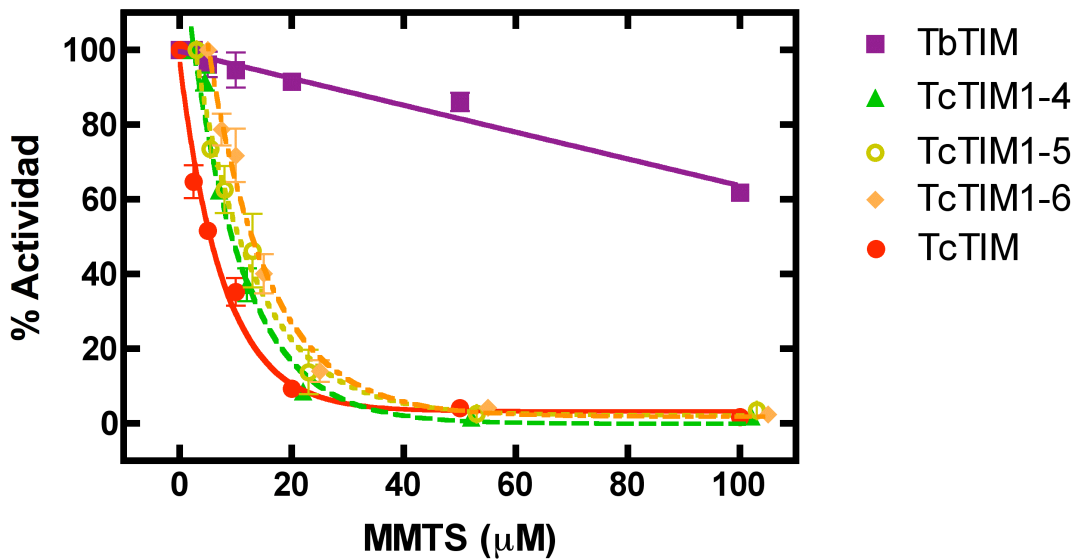


Figura 14. Inactivación por MMTS de TbTIM, TcTIM y las quimeras: TcTIM 1-6; TcTIM 1-5 y TcTIM 1-4.

#### **5.4 Importancia de la región 4 en la susceptibilidad diferencial de TbTIM y TcTIM ante el efecto del MMTS.**

Cuando se incorporó la región 4 de TbTIM a la quimera TcTIM1-4, para dar origen a la quimera TcTIM 1-3, se observó un cambio importante en el patrón de inactivación por el agente derivatizante (Figura 15). Esta proteína quimérica fue la primera que mostró un patrón de inactivación por MMTS intermedio entre TbTIM y TcTIM. Es importante señalar que esta enzima mantiene prácticamente el 100% de actividad cuando se incuba a bajas concentraciones de MMTS, tal y como sucede con TbTIM, y que la pérdida de su actividad comienza cuando se incuba en presencia de MMTS 20  $\mu$ M. Estos resultados, sugieren que las 5 diferencias en las secuencias de aminoácidos de la región 4 contribuyen a las diferencias en susceptibilidad de TbTIM y TcTIM ante la inactivación por el MMTS. Por esta razón, se construyeron dos nuevas proteínas quiméricas: una TbTIM con la región 4 de TcTIM (TcTIM 4) y una TcTIM con la región 4 de TbTIM (TcTIM 1-3, 5-8). Los ensayos de inactivación a diferentes concentraciones de MMTS de estas dos quimeras se muestran en la Figura 16. Resulta muy interesante el hecho de que estas tres quimeras (con diferentes regiones 4) presenten un comportamiento muy similar cuando se inactivan con MMTS. De manera general, las tres muestran un comportamiento intermedio entre la TcTIM y la TbTIM silvestres. Sin embargo, es importante señalar las marcadas diferencias entre ellas (Figura 17): la proteína quimérica TcTIM 4 comienza a perder actividad a una concentración de 2.5  $\mu$ M de MMTS, tal y como sucede con TcTIM silvestre. En contraste, la quimera TcTIM 1-3, 5-8, que sólo posee la región 4 de TbTIM, se ve poco afectada a concentraciones bajas del derivatizante de manera similar a lo que ocurre con TbTIM silvestre.

Estos resultados muestran que los 5 aminoácidos diferentes en la región 4 son importantes para la diferencia en la susceptibilidad a la inactivación por MMTS que se ha reportado entre las proteínas TbTIM y TcTIM silvestres, por lo que la

sustitución de la región 4 en TcTIM o TbTIM silvestres tiene el efecto esperado de conferir susceptibilidad o resistencia respectivamente a bajas concentraciones del agente de grupo sulfhidrido.

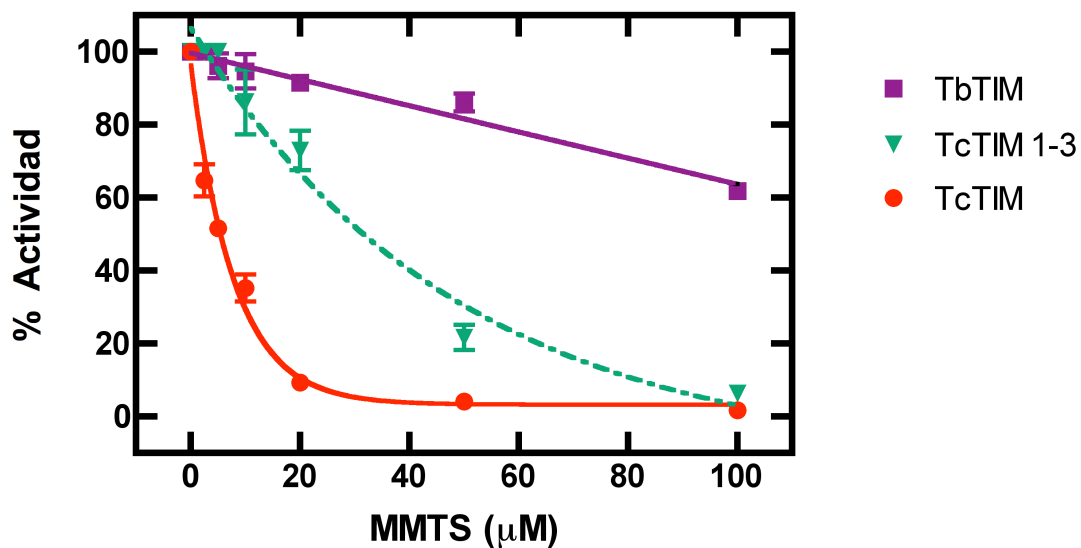


Figura 15. Inactivación por MMTS de TbTIM, TcTIM, y la quimera TcTIM 1-3.

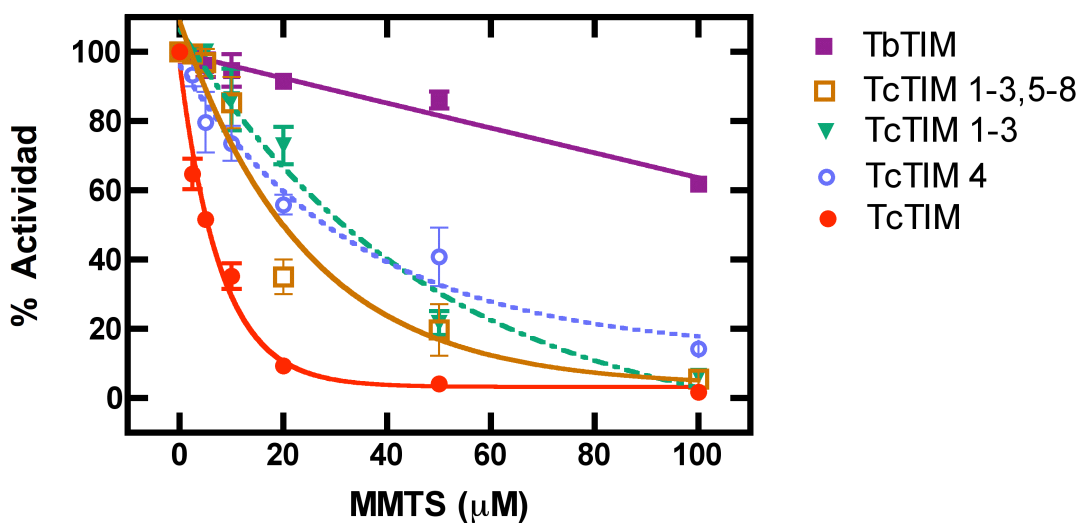
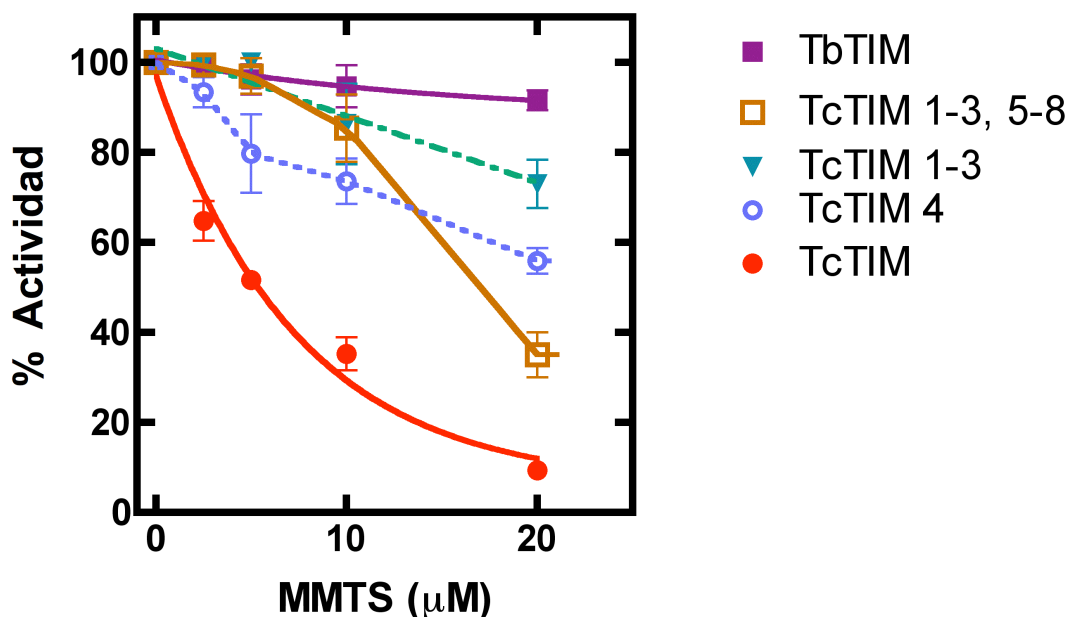


Figura 16. Inactivación por MMTS de TbTIM, TcTIM y las quimeras de la región 4: TcTIM 1-3,5-8, TcTIM 1-3 y TcTIM 4.



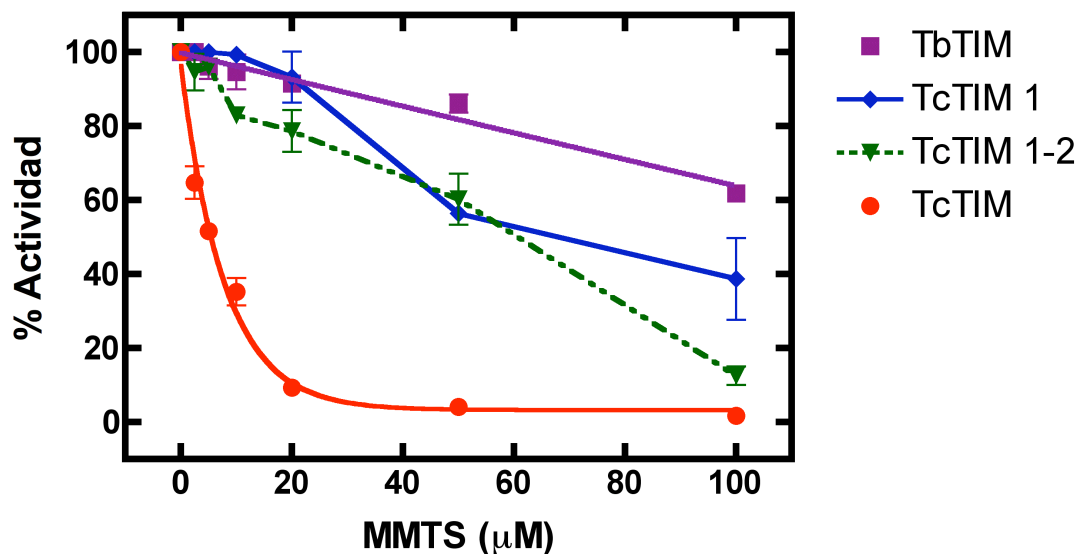


**Figura 17. Inactivación por MMTS de TbTIM, TcTIM, y las quimeras de la región 4: TcTIM 1-3,5-8, TcTIM 1-3 y TcTIM 4. Acercamiento de las curvas de inactivación a bajas concentraciones de MMTS.**

### **5.5 El papel de la región 1 en la susceptibilidad de TcTIM y TbTIM a altas concentraciones de MMTS.**

Las quimeras con las regiones 4 alternadas de TcTIM o TbTIM presentan una susceptibilidad intermedia al MMTS, pero aún no se comportaron como TbTIM silvestre. Debido a esto, se probaron dos quimeras más con regiones adicionales de TbTIM; la quimera TcTIM 1-2 y la quimera TcTIM 1. Los ensayos de inactivación con MMTS de estas dos enzimas se muestran en la figura 18. TcTIM 1-2 conserva la mayor parte de su actividad cuando se incubó a concentraciones menores o iguales de MMTS 20 μM, y es capaz de mantener hasta el 60% de actividad en presencia de MMTS 50 μM. A concentraciones mayores se observa una importante caída en la actividad de la enzima, y a 100 μM de MMTS su inactivación fue comparable a la observada en la TcTIM silvestre. Un fenómeno similar ocurrió en el caso de la quimera TcTIM 1 ya que, a bajas concentraciones

del derivatizante, mantuvo casi el 100% de actividad. A partir de una concentración de MMTS 50  $\mu\text{M}$ , mostró una importante pérdida de actividad hasta casi el 50%. A diferencia del resto de las proteínas quiméricas, esta última conserva el 40% de actividad en presencia de MMTS 100  $\mu\text{M}$ .



**Figura 18. Inactivación por MMTS de TbTIM, TcTIM, y las quimeras TcTIM 1-2 y TcTIM 1.**

Dado que la quimera TcTIM 1, que es una proteína TbTIM silvestre con sólo una región de TcTIM, no es tan resistente a la acción del MMTS como TbTIM silvestre, se concluyó que la región 1 juega un papel fundamental en las diferencias en susceptibilidad de TcTIM y TbTIM a la inactivación por reactivos sulfhidrilo. La región 1 tiene un total de 13 diferencias en la secuencia de aminoácidos de TcTIM y TbTIM. Basados en estos resultados, y en los de las quimeras de la región 4, se diseñó, construyó y purificó una nueva proteína quimérica: una TcTIM con las regiones 1 y 4 de TbTIM. (TcTIM 2, 3, 5-8). Esta enzima se construyó a partir de una de las proteínas quiméricas de la región 4 descritas anteriormente: se sustituyó la región 1 de la quimera TcTIM 1- 3, 5-8 por la región 1 de TbTIM silvestre. Esta quimera presenta el mismo patrón de inactivación que TbTIM

(Figura 19): a una concentración de MMTS 100  $\mu\text{M}$  conserva el 70% de actividad, tal y como ocurre con TbTIM silvestre. La quimera TcTIM 2, 3, 5-8 posee el 92.8 % de la secuencia de aminoácidos de TcTIM y presentó un comportamiento ante el MMTS indistinguible del que presenta la enzima TbTIM silvestre. Las 13 diferencias que se observan en la región 1 entre las enzimas silvestres TbTIM y TcTIM contribuyen de manera importante a la diferencia en la susceptibilidad a la inactivación que muestran estas dos enzimas a concentraciones de MMTS mayores a 50  $\mu\text{M}$ .

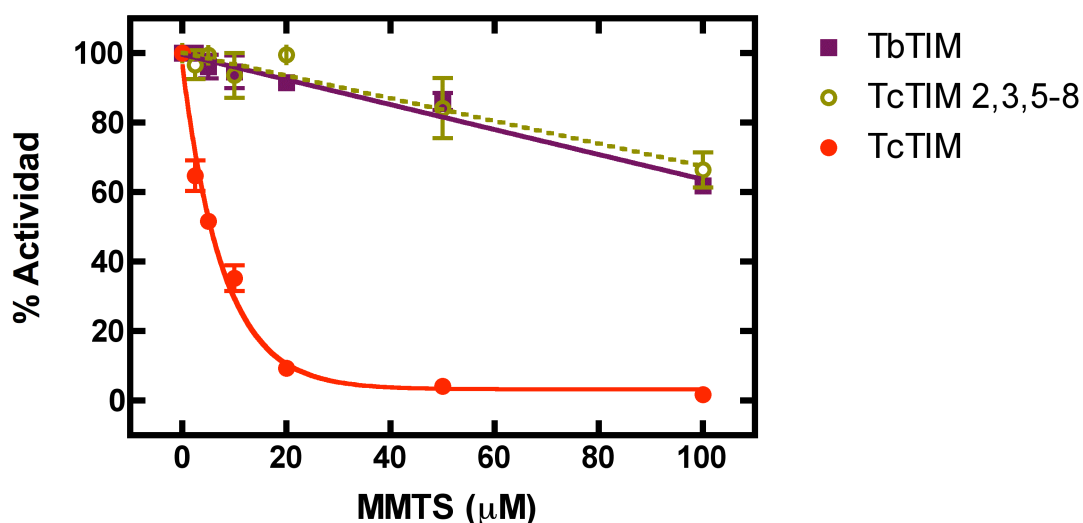


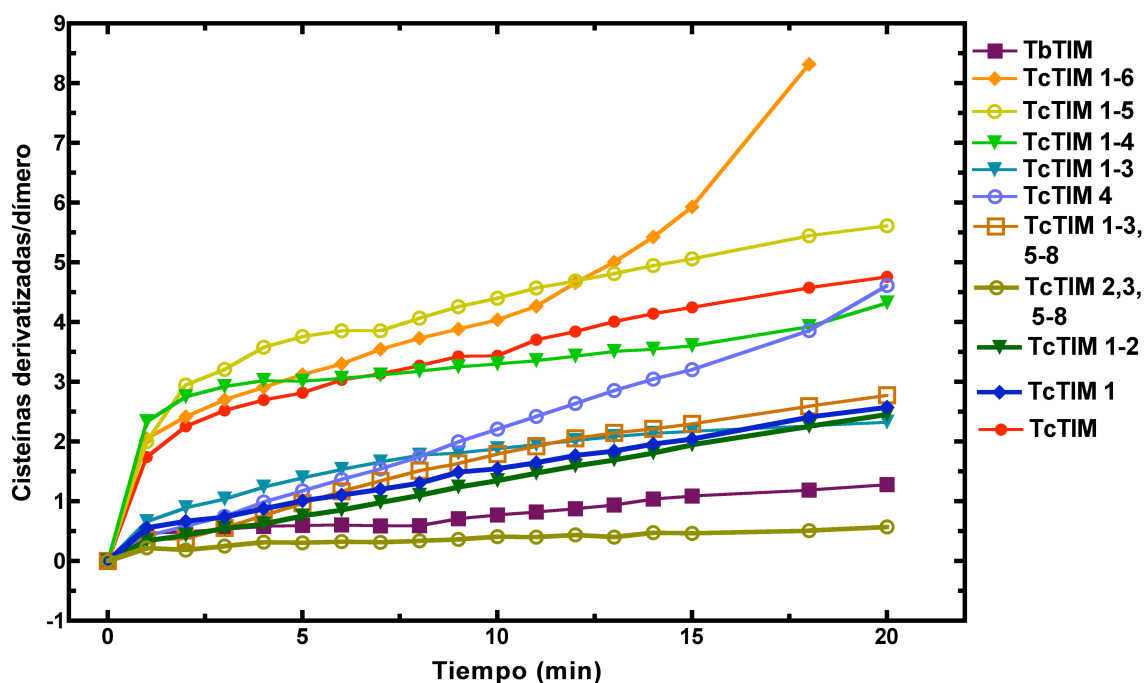
Figura 19. Inactivación por MMTS de TbTIM, TcTIM, y la quimera TcTIM 2,3,5-8.

## 5.6 Cuantificación de cisteínas derivatizadas con DTNB.

TbTIM y TcTIM no sólo presentan diferencias marcadas en su comportamiento frente a la inactivación por MMTS; cuando se probaron otros derivatizantes de grupo sulfhidrilo como el DTNB, también se observaron diferencias importantes. La constante de inactivación de TcTIM por el efecto del DTNB es alrededor de 160 veces mayor con respecto a la de TbTIM (Pérez-Montfort R., *et al.*, 1999). Para evaluar el efecto de este derivatizante en las quimeras, se hicieron ensayos de

derivatización de las cisteínas accesibles con DTNB en cada una de las proteínas quiméricas.

Una vez que este derivatizante reacciona equimolarmente con grupos sulfhidrilo libres, se libera el ácido 2-nitro-1-benzoico (TNB) que presenta un máximo de absorbancia a 412 nm, el cual puede ser monitoreado espectrofotométricamente. Se utilizó DTNB 1 mM para derivatizar tanto a las enzimas silvestres como a las quimeras. En la figura 20 se presenta el número de cisteínas derivatizadas en cada proteína con respecto al tiempo, hasta los 15 minutos; tiempo en el que se observa que algunas de las proteínas se habían inactivado por completo o incluso se observó agregación protéica en la celda.



**Figura 20. Cuantificación del número de cisteínas derivatizadas en TbTIM, TcTIM y las quimeras por efecto del DTNB.**

Claramente se observan dos tipos de comportamiento en las enzimas tratadas con DTNB. La derivatización de las cisteínas de TcTIM por efecto del DTNB es más rápida con respecto a la que presenta TbTIM. Desde los primeros minutos de

reacción, se derivatiza la primera cisteína (cisteína de interfase) y al cabo de 15 minutos de reacción se derivatizan 4 cisteínas. El comportamiento de TbTIM ante la derivatización por el DTNB es completamente diferente; después de 15 minutos de reacción con una concentración de DTNB de 1 mM, TbTIM apenas presenta una cisteína derivatizada. Las quimeras TcTIM 1-6, TcTIM 1-5 y TcTIM 1-4 presentan un comportamiento similar al de TcTIM. El efecto del DTNB sobre la quimera TcTIM 1-6 fue muy drástico, de tal manera que después de 10 minutos de reacción y de la derivatización de cuatro cisteínas, la inactivación es tal que promueve la agregación de la proteína. Esto produce como resultado valores altos de absorbancia que se reflejan en el aumento súbito de las cisteínas derivatizadas.

Es importante mencionar que el comportamiento de las quimeras de la región 4 ante la derivatización con el DTNB, apoya los resultados obtenidos con el MMTS de manera consistente (Figuras 15-17). La quimera TcTIM 1-3, que tiene las regiones 4-8 de TbTIM, en los primeros minutos presenta una derivatización de los residuos de cisteína lenta, tal y como lo presenta TbTIM, y, después de los 15 minutos de reacción, sólo se han derivatizado por completo dos cisteínas por dímero. La quimera TcTIM 4, presentó un comportamiento peculiar. A pesar de tener la región 4 de TcTIM, la derivatización de la primera cisteína resultó ser igual que en el caso de TbTIM; sin embargo la derivatización de las siguientes cisteínas presentó un comportamiento lineal. Después de 20 minutos de reacción se derivatizaron cuatro cisteínas de manera similar a lo observado en TcTIM y en las quimeras TcTIM 1-6, TcTIM1-5 y TcTIM1-4. La quimera TcTIM 1-3, 5-8, con la región 4 de TbTIM, presentó un comportamiento muy similar a la quimera TcTIM 1-3 ya que al final del experimento tan solo se derivatizaron dos residuos de cisteínas. Estos resultados confirman la importancia de la región 4 en la derivatización de las proteínas quiméricas, ya que aquellas que contienen la región 4 de TbTIM presentaron una mayor resistencia al efecto del DTNB de la misma forma a lo observado con el MMTS (Figuras 15-17).

Las quimeras TcTIM1-2, y TcTIM 1 presentaron un comportamiento similar a TbTIM, al final del experimento solo dos de sus cisteínas se derivatizaron por completo. La enzima TcTIM 2, 3, 5-8 , con solo dos regiones de TbTIM (regiones 1 y 4) presenta una derivatización muy lenta, incluso resultó más resistente que la propia TbTIM silvestre. Después de 25 minutos de reacción se puede decir que ninguna de sus cisteínas se ha derivatizado.

Este experimento, nos permitió poder clasificar a las proteínas quiméricas en dos grupos: aquellas que se comportaron como TbTIM ante la derivatización con DTNB (TcTIM 1-3, TcTIM 1-2, TcTIM 1, TcTIM 1-3, 5-8 y TcTIM 2, 3, 5-8) y el segundo grupo que lo conforman aquellas quimeras con comportamiento similar a TcTIM (TcTIM 1-6, TcTIM 1-5, TcTIM 1-4). La quimera TcTIM 4 presentó un comportamiento intermedio, sin embargo, al minuto 20 de reacción presentó el mismo número cisteínas derivatizadas que TcTIM.

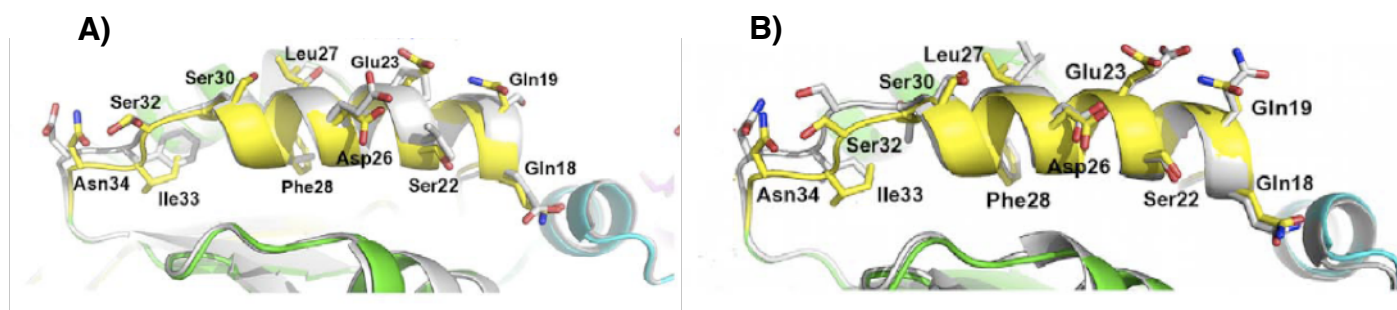
En la tabla 6 se hace énfasis al tiempo requerido para derivatizar la primera cisteína tanto en las enzimas silvestres como en las proteínas quiméricas. Así mismo, se presenta el número de cisteínas derivatizadas a los doce minutos, tiempo en el cual aún no se presenta agregación en la celda de reacción para ninguna proteína permitiendo una interpretación correcta de los datos.

<b>Enzima</b>	<b># Cisteínas por dímero</b>	<b>Tiempo de derivatización de la primer cisteína (Cys14 o 15)</b>	<b># de cisteínas derivatizadas por dímero después de 12 min de reacción con DTNB</b>
TbTIM	6	18 min	0.9
TcTIM	8	< 1 min	3.8
TcTIM 1-6	8	< 1min	4.7
TcTIM 1-5	8	< 1 min	4.7
TcTIM 1-4	8	< 1min	3.4
TcTIM 1-3	6	3 min	2.0
TcTIM 1-2	6	9 min	1.6
TcTIM 1	6	6 min	1.8
TcTIM 4	8	4 min	2.6
TcTIM 1-3, 5-8	6	6 min	2.0
TcTIM 2,3, 5-8	6	> 20 min	0.33

**Tabla 6. Cuantificación de cisteínas derivatizadas por efecto del DTNB en TbTIM y TcTIM silvestres y nueve enzimas quiméricas.**

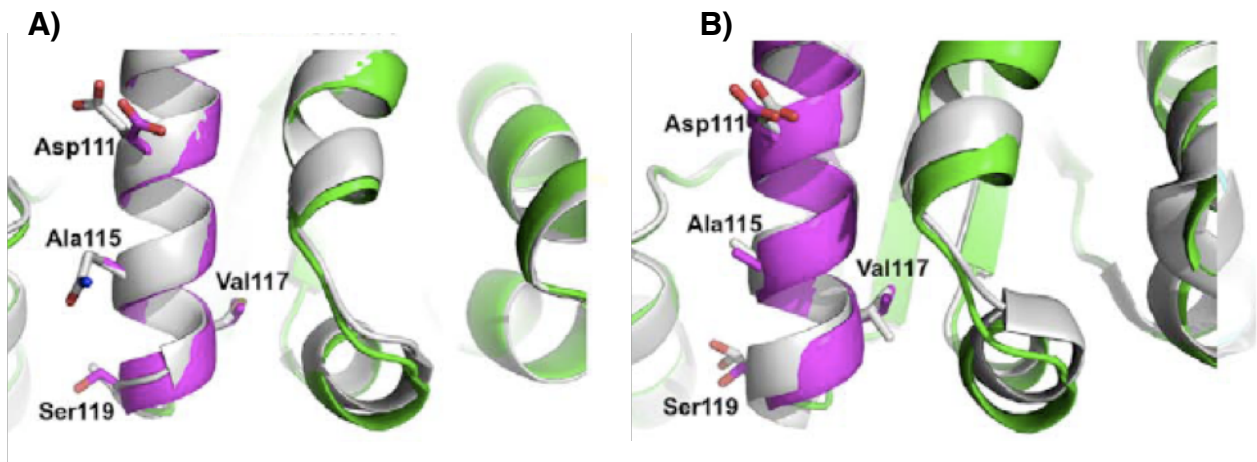
## 5.7 Análisis de las regiones 1 y 4 en TbTIM y TcTIM y la quimera TcTIM 2, 3, 5-8

La quimera TcTIM 2, 3, 5-8 (35 mg/mL), se cristalizó en presencia de 200 mM de malonato de sodio pH 7 y 20% de PEG 3350. El cristal fue difractado en el APS, Argonne, Illinois, USA. Se colectaron los datos de difracción a 1.65 Å de resolución y se encontraron 4 moléculas en la unidad asimétrica. Las coordenadas del cristal fueron depositadas en el Protein Data Bank con el código 3Q37. El análisis de la estructura se centró en las regiones 1 y 4 que son las que resultaron ser importantes en la diferencia de susceptibilidad ante el MMTS entre TbTIM y TcTIM. La estructura de la quimera TcTIM 2, 3, 5-8 se superpone con las estructuras cristalográficas de TbTIM (PDB:5TIM) y TcTIM (PDB:1TCD) con RMSDs de 0.437 y 0.385 Å, respectivamente. Sólo se observa un desplazamiento menor en el asa de la región 1 y en la región 6 que corresponde a los aminoácidos de el asa flexible involucrada en la catálisis enzimática (Malabanan MM., *et al.*, 2010). La región 1 de la TcTIM 2, 3, 5-8 se superpone con la región 1 de TcTIM y TbTIM con un RMSDs de 0.363 y 0.237 Å, respectivamente (Figuras 21 A y B). De manera similar la superposición de la región 4 de TcTIM 2, 3, 5-8 con TcTIM y TbTIM presentó valores de RMSDs de 0.219 y 0.150 Å, respectivamente (Figuras 22 A y B).



**Figura 21. Región 1 de la quimera TcTIM 2, 3, 5-8. A) Superposición de la región 1 de TcTIM 2, 3, 5-8 (color) con la región 1 de TcTIM (gris). B) Superposición de la región 1 de TcTIM 2, 3, 5-8 8 (color) con la región 1 de TbTIM (gris).**





**Figura 22. Región 4 de la quimera TcTIM 2, 3, 5-8. A) Superposición de la región 4 de TcTIM 2, 3, 5-8 (color) con la región 4 de TcTIM (gris). B) Superposición de la región 4 de TcTIM 2, 3, 5-8 (color) con la región 4 de TbTIM (gris).**

Debido a que no se encontraron diferencias importantes entre la estructura cristalográfica de TcTIM 2, 3, 5-8 y las enzimas silvestres se puede decir que las diferencias en susceptibilidad al MMTS, que confieren los cambios en las regiones 1 y 4, se debe a algún efecto en las cadenas laterales y no a un arreglo diferente en las cadenas principales de los aminoácidos de la enzima quimérica.

### **5.8 Determinación del pKa de la cisteína de interfase en la quimera TcTIM 2,3,5-8 y algunas otras quimeras.**

En trabajos anteriores, se reportó que un factor crucial que determina la diferencia de reactividad de las cisteínas de interfase de TcTIM y TbTIM era el pKa de su grupo tiol, el cual es 0.8 unidades de pH menor en TcTIM que en TbTIM (Reyes-Vivas *et al.*, 2001). Al determinar el pKa de la cisteína de interfase de la quimera TcTIM 2,3,5-8 resultó ser muy parecido al valor de TbTIM. De manera interesante, los valores de pKa de las quimeras de la región 4, que presentaron un

comportamiento intermedio entre TbTIM y TcTIM a la inactivación por MMTS, también resultaron ser intermedios a los obtenidos para las enzimas silvestres (Tabla 7).

<b>Enzima</b>	<b>pKa</b>
TbTIM	10.53 ± 0.06
TcTIM	9.27 ± 0.16
TcTIM 1-4	9.17 ± 0.12
TcTIM 1-3	9.86 ± 0.05
TcTIM 1-3, 5-8	9.59 ± 0.06
TcTIM 2, 3, 5-8	10.61 ± 0.06

**Tabla 7. Valores de pKa de la cisteína de interfase de TbTIM, TcTIM y algunas quimeras.**

En las siguientes gráficas se representa claramente que la inactivación de algunas quimeras y de las proteínas silvestres es directamente proporcional al valor del pKa de la cisteína de interfase. Conforme aumenta el valor del pKa, se presenta una resistencia notable a la derivatización e inactivación por el MMTS (Figuras 23 A, B y C). Se seleccionaron tres concentraciones de MMTS como las más representativas, ya que se puede ver el efecto a bajas concentraciones (20 µM), en la parte intermedia de las curvas de inactivación (50 µM) y en la máxima concentración probada (100 µM) para las quimeras y las enzimas silvestres.

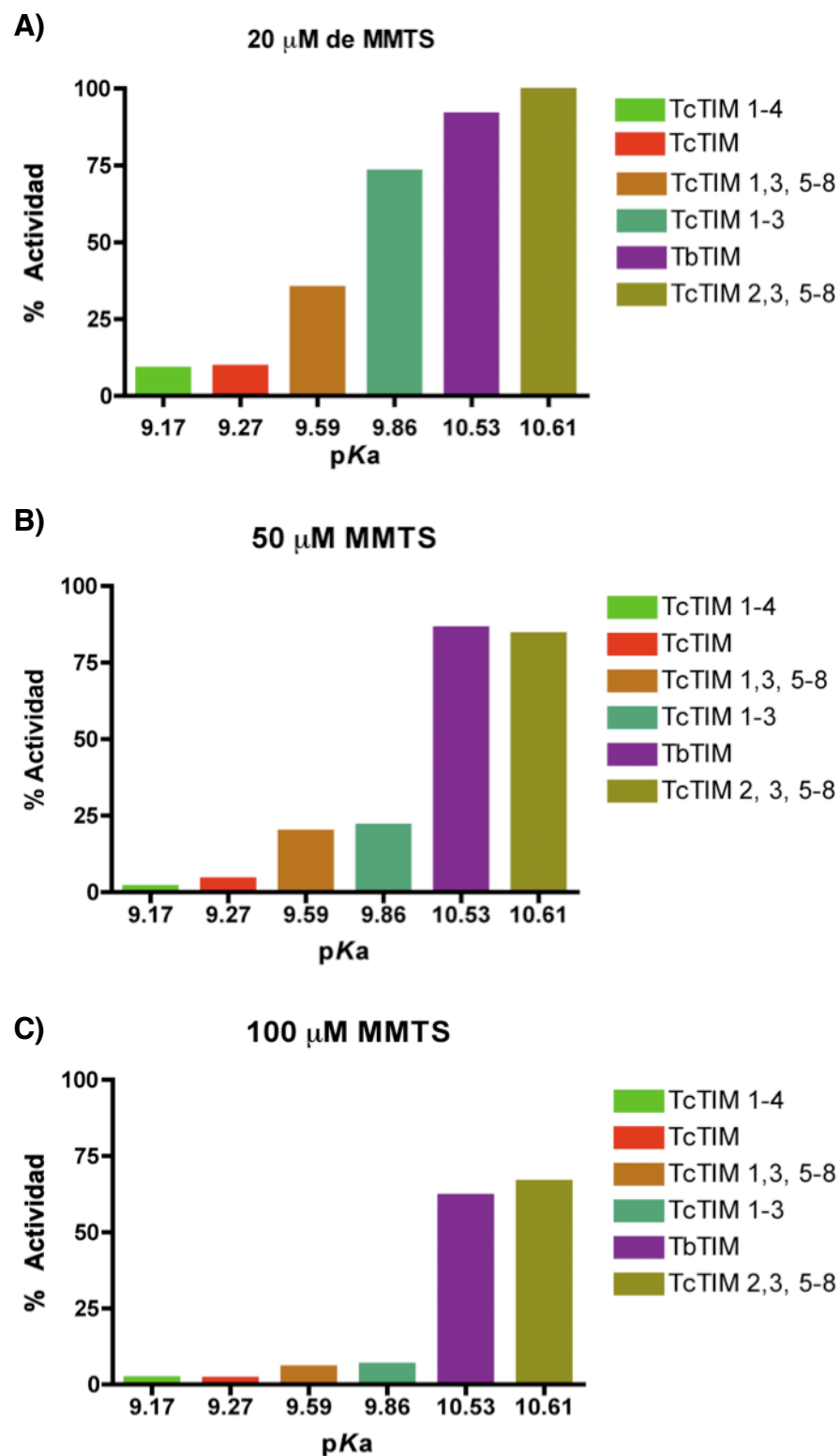
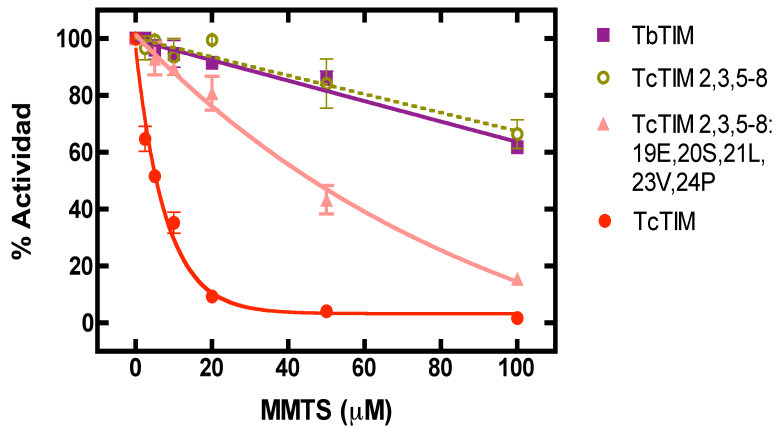


Figura 23. Dependencia de la inactivación por MMTS de algunas quimeras, TbTIM y TcTIM con el valor de pKa de la cisteína de interfase. Se muestran los % de actividad residual después de la incubación de las distintas proteínas a diferentes concentraciones de MMTS A) MMTS 20  $\mu$ M, B) MMTS 50  $\mu$ M, C) MMTS 100  $\mu$ M.

## **5.9 Avances en la identificación del número mínimo de aminoácidos involucrados en la diferencia de susceptibilidad de TcTIM y TbTIM ante el MMTS.**

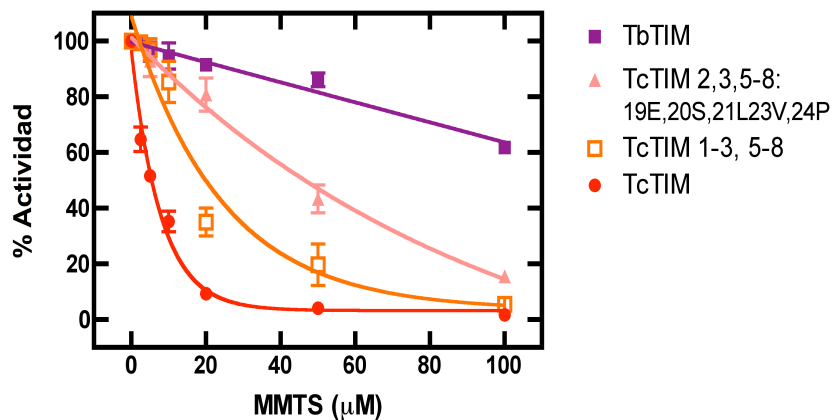
Con el objetivo de encontrar el número mínimo de aminoácidos requeridos para que TcTIM se comporte como TbTIM ante el efecto de los reactivos de grupo sulfhidrido se han construido algunas mutantes tanto de la región 1 como de la región 4. Algunos de estos datos fueron incluidos en el artículo derivado de este trabajo y que a su vez forman parte de proyectos alternos que se llevan a cabo en el laboratorio (Tesis de licenciatura Díaz-Mazariegos S. 2010 y tesis de licenciatura Rodríguez-Bolaños M. 2010). Algunas mutantes no han sido reportadas antes.

De las trece sustituciones que se encuentran en la región 1 entre la secuencia de aminoácidos de TcTIM y TbTIM, se seleccionaron los cinco aminoácidos que se encuentran al inicio de la hélice 1 para construir una quintuple mutante. Para construir esta mutante se tomó como molde a la quimera TcTIM 2, 3, 5-8 en la cual se sustituyeron los aminoácidos en las posiciones 19, 20, 21, 23 y 24 por los correspondientes en la secuencia de TcTIM. Es decir, a la quimera TcTIM 2, 3, 5-8, con las regiones 1 y 4 de TbTIM se le cambiaron cinco aminoácidos de la región 1, por aquellos que originalmente se encuentran en TcTIM. Con esa mutante se pretendía evaluar si estos cinco aminoácidos eran los responsables del efecto de la región 1 en la quimera TcTIM 2, 3, 5-8. De manera interesante, cuando se probó el efecto del MMTS en esta quimera, presentó un comportamiento intermedio entre TcTIM y TbTIM (Figura 24), es decir la quimera TcTIM 2,3, 5-8 al regresarle 5 aminoácidos de TcTIM en la región 1 ya no es una enzima resistente al efecto del MMTS como TbTIM. Este resultado indica que estos cinco aminoácidos juegan un papel importante en la inactivación por el agente derivatizante.



**Figura 24. Efecto del MMTS en la quimera TcTIM 2, 3, 5-8: 19E, 20S, 21L, 23V, 24P.**

En la figura 25 se grafica la quintuple mutante junto con la quimera TcTIM 1,3, 5,8. Se puede observar que el comportamiento de ambas quimeras ante el efecto del MMTS es intermedio entre TbTIM y TcTIM. La quimera TcTIM 1, 3, 5-8 sólo posee la región 4 de TbTIM, lo que le permite tener un comportamiento intermedio entre las dos enzimas silvestres. Esta observación apoya la aseveración de que los cinco aminoácidos mutados en la quintuple mutante son los responsables de la derivatización en la región 1, ya que al parecer en esta quintuple mutante sólo se observa el efecto de la región 4, al igual que en la quimera TcTIM 1, 3, 5-8.



**Figura 25. Efecto del MMTS en la quimera TcTIM 2, 3, 5-8: 19E, 20S, 21L, 23V, 24P y la quimera TcTIM 1,3, 5-8.**

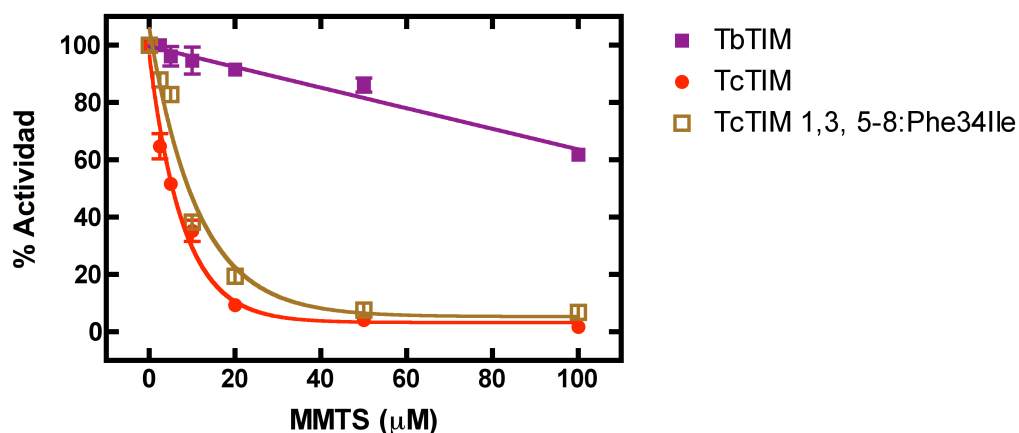
El análisis de la estructura cristalográfica de la quimera TcTIM 2, 3, 5-8 produjo algunos posibles candidatos para ser estudiados. Gracias a este análisis se pudo sugerir que los posibles aminoácidos involucrados en la derivatización por MMTS eran aquéllos que se encontraban más expuestos al solvente, mientras que los aminoácidos involucrados en la estabilidad intrínseca de la proteína no tenían una contribución importante en la derivatización de la cisteína de interfase por el MMTS.

De las trece diferencias que se encuentran en la región 1 entre TcTIM y TbTIM, cinco aminoácidos se encuentran expuestos al solvente y corresponden a los residuos en las posiciones 19, 20, 21, 23 y 24 que fueron mutados en la quintuple mutante de la cual se habló en el párrafo anterior. Hay dos aminoácidos, que de acuerdo a la estructura cristalográfica de la quimera TcTIM 2, 3, 5-8 se encuentran involucrados en la estabilidad interna de la proteína, son la Phe 29 y la Ile 34. Estos aminoácidos en la quimera TcTIM 2, 3, 5-8 corresponden a residuos de TbTIM, recordando que esta quimera posee las regiones 1 y 4 de TbTIM, en TcTIM estos aminoácidos corresponden a Leu y Phe respectivamente. Con el propósito de confirmar que estos aminoácidos se encontraban directamente involucrados en la estabilidad de la proteína y no en la inactivación por MMTS, se produjo la mutante TcTIM 1-3, 5-8: Phe34Ile, tomando como molde el DNA de la quimera TcTIM 1-3, 5-8 que sólo posee la región 4 de TbTIM; en la posición 34 se cambió el aminoácido correspondiente en TcTIM (Phe) por el que se encuentra en TbTIM (Ile).

El motivo principal para tomar como molde la quimera TcTIM 1,3, 5-8 fue que debido a que posee la región 4 de TbTIM y a que presentó un comportamiento intermedio entre TcTIM y TbTIM ante el MMTS (Figuras 16 y 17), era posible cambiar un solo residuo, en este caso en la posición 34, lo que permitiría ver su efecto en la susceptibilidad al MMTS, ya sea que la nueva quimera se comporte como TcTIM o como TbTIM.

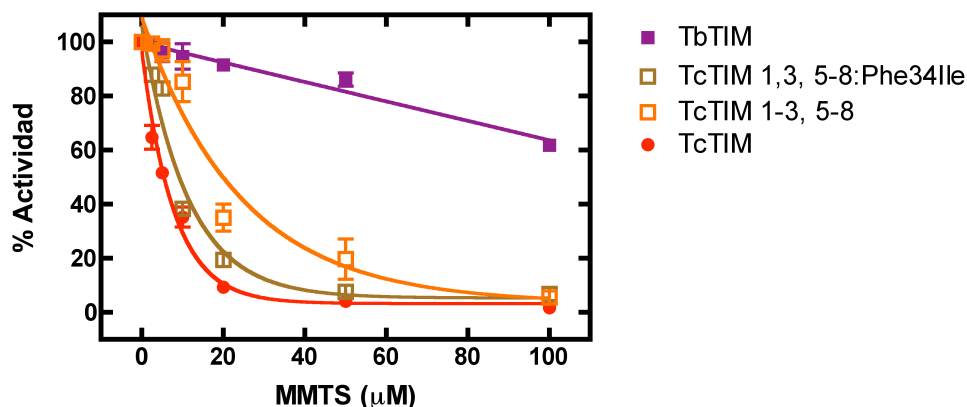
De esta manera, si el residuo en la posición 34 estuviera involucrado en la derivatización por MMTS, al cambiarlo por el correspondiente en TbTIM, el comportamiento de la quimera TcTIM 1-3, 5-8: Phe34Ile sería similar o cercano al de TbTIM. Por otro lado, si esta quimera se comportara de manera similar a la quimera TcTIM 1-3, 5-8 confirmaría que el aminoácido en la posición 34 sólo contribuye en la estabilidad intrínseca de la proteína y no en la inactivación por MMTS.

En la figura 26, se muestra el comportamiento de la quimera TcTIM 1-3, 5-8: Phe34Ile ante el efecto del MMTS.



**Figura 26. Efecto del MMTS en la quimera TcTIM 1- 3, 5-8: Phe34Ile**

El comportamiento de esta quimera ante el MMTS fue muy similar al de TcTIM, en las concentraciones menores de MMTS (2.5 y 5  $\mu\text{M}$ ) esta quimera mantiene porcentajes mayores de actividad, con respecto a los que presenta TcTIM; sin embargo ni siquiera se observa un comportamiento intermedio como la quimera antecesora (TcTIM 1-3, 5-8, Figura 27). Estos resultados demostraron que el aminoácido en la posición 34 no es importante para la inactivación por el MMTS, ya que esta sustitución consistió en cambiar el residuo existente en TcTIM por el correspondiente en TbTIM lo que podría conferir resistencia ante el MMTS, pero no fue así.



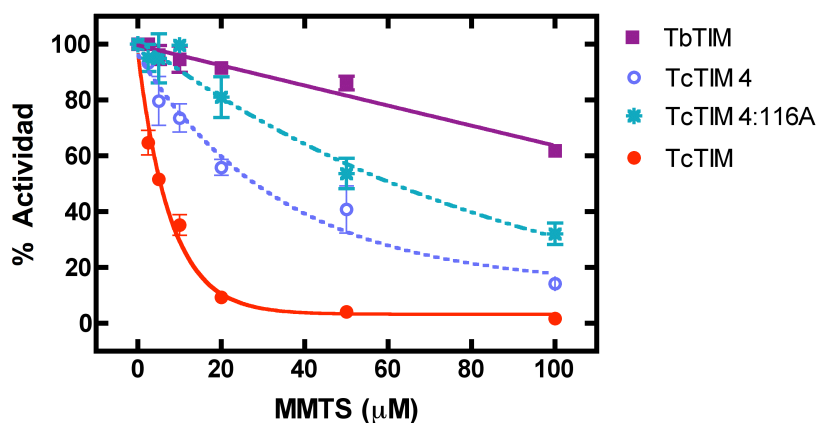
**Figura 27. Efecto del MMTS en la quimera TcTIM 1- 3, 5-8: Phe34Ile y la quimera TcTIM 1-3, 5-8.**

Con respecto a la región 4, se estudió otro aminoácido como posible candidato involucrado en el mecanismo de inactivación por MMTS. En TcTIM, en la posición 116 existe un Glu, mientras en TbTIM en esta posición se encuentra una Ala. En la estructura cristalográfica de la quimera TcTIM 2, 3, 5-8 este residuo se encuentra expuesto al solvente, de tal manera que se decidió probar esta posición y evaluar si este aminoácido se encontraba involucrado en la derivatización por MMTS.

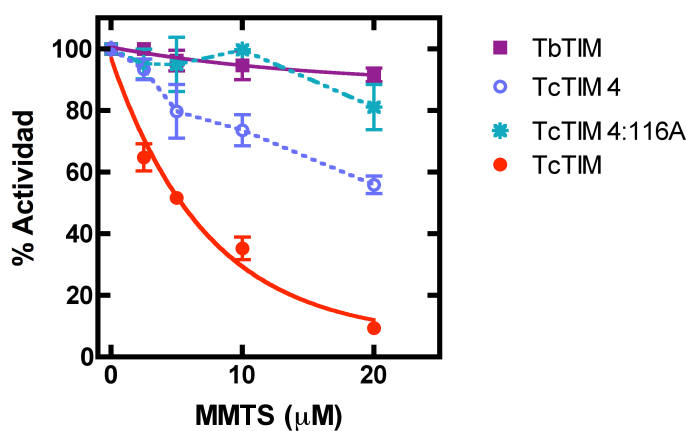
Tomando como molde el DNA de la quimera TcTIM 4, que sólo posee la región 4 de TcTIM y el resto de la secuencia de TbTIM, se cambió el aminoácido en la posición 116 (Glu) por una Ala, residuo que se encuentra originalmente en TbTIM para dar lugar a la quimera TcTIM4: 116A.

La quimera TcTIM 4 es una de las tres quimeras que presentaron un comportamiento intermedio entre TcTIM y TbTIM ante el MMTS (Figuras 16 y 17). De manera interesante la quimera TcTIM 4:116A recuperó la resistencia a bajas concentraciones de MMTS en comparación con la quimera TcTIM4 (Figuras. 28a y 28b) con lo que se confirmó el papel de este aminoácido en la susceptibilidad de TcTIM ante el MMTS. Este resultado también apoya la idea de que los aminoácidos expuestos al solvente son los que se encuentran involucrados directamente en el efecto del MMTS.





**Figura 28a. Efecto del MMTS en la quimera TcTIM 4 y la quimera TcTIM4:116A**



**Figura 28b. Acercamiento del efecto de bajas concentraciones de MMTS en la actividad de las quimeras TcTIM 4 y TcTIM4:116A**

Gracias a la quimera TcTIM 2, 3, 5-8 se encontró que dos regiones y un total de 18 diferencias son las responsables del distinto comportamiento ante los reactivos de grupo sulfhidriilo. Derivado de estos resultados, surgió la inquietud por saber si las mismas regiones serían determinantes para hacer susceptible a una TbTIM ante el MMTS con sólo las regiones 1 y 4 de TcTIM. De esta manera se construyó la quimera TcTIM 1, 4 (Rodríguez-Bolaños M., 2010). Se esperaba que esta quimera, al tener las regiones 1 y 4 de TcTIM y el resto de la secuencia de TbTIM, fuera una quimera susceptible al efecto del MMTS de manera similar a TcTIM,

pero esto no resultó así. Como se muestra en la figura 29, la quimera TcTIM 1, 4 si es más susceptible con respecto a TbTIM, pero no tanto como TcTIM.

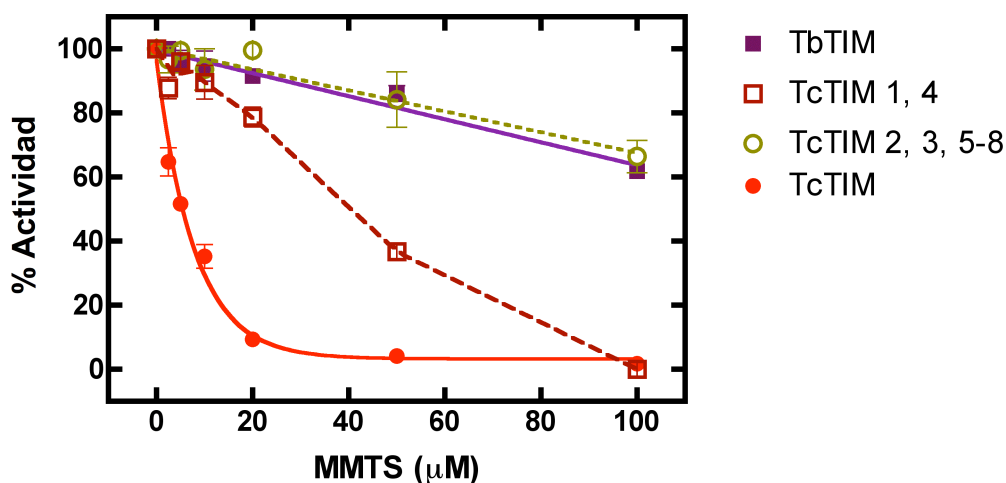


Figura 29. Efecto del MMTS en la quimera TcTIM 1,4.

La generación de nuevas quimeras ha permitido resolver algunas preguntas, pero también con los resultados obtenidos han surgido otros cuestionamientos; no obstante la TIM es un excelente modelo en que mediante la generación de mutantes y quimeras se pueden hacer un número ilimitado de combinaciones que generan conocimiento en cuanto a las propiedades, funciones y mecanismos que rigen a las proteínas.

## 6. Discusión.

### 6.1 Flexibilidad de la triosafosfato isomerasa para generar quimeras.

El plegamiento de tipo  $(\beta/\alpha)_8$  que presenta la TIM fue el origen de la idea de generar quimeras de TcTIM y TbTIM en este trabajo de investigación. Dividir a esta proteína en unidades estructurales conformadas por una hebra  $\beta$ , la hélice  $\alpha$  inmediata y el asa de unión permitió intercambiar regiones de dos proteínas homólogas con el fin de evaluar el efecto de cada región en el comportamiento de las quimeras obtenidas.

Estudios de mutagénesis dirigida exhaustiva han demostrado que algunas veces el cambio de un aminoácido clave afecta de tal forma la estructura y estabilidad de las mutantes que resulta imposible trabajar con ellas (Hernández-Alcántara G., *et al.*, 2002, Cabrera N., *et al.*, 2008). Sin embargo, en este estudio se demostró que todas las proteínas quiméricas obtenidas, a pesar de poseer diversos fragmentos de la correspondiente proteína homóloga, resultaron ser enzimas catalíticamente competentes a juzgar por los parámetros cinéticos presentados en la tabla 4. Ninguna de ellas se vió afectada significativamente en su valor de eficiencia catalítica ( $K_m/k_{cat}$ ). Con base en estos resultados se puede decir que todas las quimeras obtenidas conservaron su estructura terciaria adecuada para permitir que el mecanismo catalítico se diera eficientemente. Cabe mencionar que a pesar de que cada quimera incluía numerosos cambios, tanto los aminoácidos del sitio catalítico (Lys13, His95 y Glu167) como su ambiente circundante permanecieron intactos dando como consecuencia un comportamiento cinético muy similar al observado en las proteínas silvestres.

Se sugiere que este mismo acercamiento que involucra la generación de quimeras se puede llevar a cabo con pares de proteínas homólogas que presenten un alto grado de identidad. Por ejemplo es muy probable que quimeras de LmTIM y TbTIM o TcTIM sean exitosas ya que LmTIM posee un 69 y 68% de identidad con TbTIM y TcTIM respectivamente. Esto no se cumple con proteínas lejanas

evolutivamente, ya que cuando se intentó generar quimeras de humano con TcTIM dieron lugar a enzimas que se expresaban principalmente como cuerpos de inclusión (datos no publicados).

## **6.2 A partir de una secuencia de 251 aminoácidos fue posible disectar dos regiones cruciales en la inactivación de TbTIM y TcTIM por reactivos de grupo sulfhidrilo.**

Durante aproximadamente 15 años, se han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de encontrar los aminoácidos involucrados en el distinto comportamiento de TbTIM y TcTIM a la inactivación por reactivos de grupo sulfhidrilo. La mayoría de estos acercamientos, abordaron el problema mediante el análisis de mutaciones puntuales en estas dos enzimas. Entre los resultados más prometedores se encontró la triple mutante, una mutante de TcTIM en la cual se analizaron tres aminoácidos del asa 3 en las posiciones 70, 71 y 82, que fueron mutados por los correspondientes en TbTIM y LmTIM (Thr70Ala/Arg71Lys/Gln82Pro). Esta mutante resultó ser 3 veces más resistente al efecto del MMTS con respecto a TcTIM silvestre (Reyes-Vivas H., *et al.*, 2001). Estos fueron los primeros resultados que indicaban que las grandes diferencias entre estas dos enzimas no eran resultado de cambios puntuales, promoviendo así el desarrollo de una nueva estrategia experimental para abordar el problema.

En el esfuerzo por encontrar alguna región importante en las diferentes susceptibilidades entre TcTIM y TbTIM se monitorearon las diferencias en la interfase del dímero. Se construyeron dos séptuples mutantes de TcTIM y TbTIM respectivamente, las cuales solo indicaron que el efecto de los cambios en la interfase en las dos enzimas afectaba de manera parcial al distinto comportamiento de estas TIMs ante la derivatización. Debido a todos estos intentos fallidos, se decidió abordar esta pregunta con un enfoque gradual y sistemático que permitiera ver el efecto de cada región para su posterior disección en el número mínimo de aminoácidos involucrados.

La secuencia de la TIM se dividió en ocho regiones, de diferente longitud y también con diferente número de sustituciones, todas ellas estaban conformadas por el mismo motivo estructural (hebra $\beta$ -asa de unión-hélice  $\alpha$ ), gracias a este diseño se pudieron conocer las dos regiones involucradas en la diferente susceptibilidad de TbTIM y TcTIM al efecto del MMTS, las regiones 1 y 4.

Así, partiendo de dos proteínas con 250 y 251 residuos de aminoácidos (TbTIM y TcTIM, respectivamente) se lograron encontrar 18 aminoácidos que determinan la susceptibilidad a la inactivación de estas enzimas por el MMTS y el DTNB distribuidos en dos regiones. Trece de estos cambios se encuentran en la región 1 (del aminoácido 1-35) y 5 en la región 4 (del aminoácido 92-119).

### **6.3 Efecto de las regiones 1 y 4 en la inactivación de TcTIM y TbTIM por agentes derivatizantes.**

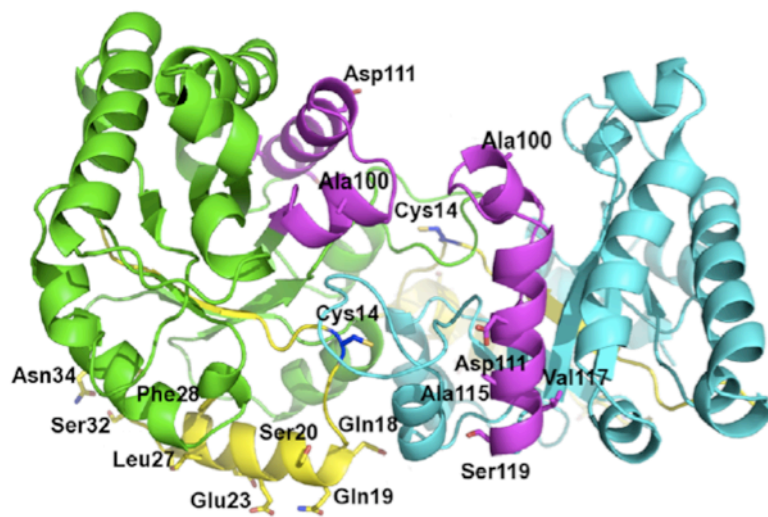
La forma en la que fueron diseñadas las quimeras representaba dos posibles escenarios. El primero de ellos está relacionado con la adición gradual de regiones de TbTIM en TcTIM, de esta forma se podría esperar que el efecto también fuera gradual; es decir que conforme se agregaran regiones de TbTIM a TcTIM su comportamiento ante el efecto del MMTS se pareciera cada vez más al de TbTIM, lo que indicaría que varios aminoácidos actuaran de manera concertada favoreciendo la derivatización. La segunda posibilidad consistía en que al agregar regiones de TbTIM a TcTIM hubiera un umbral o algún cambio crucial que desencadenara una diferencia en el patrón de inactivación por derivatización. Ambos escenarios eran interesantes y cada resultado tendría diferente interpretación; sin embargo con la segunda posibilidad se presentaría de inmediato la o las regiones responsables en la derivatización de TbTIM y TcTIM.

Los resultados mostraron el segundo escenario, en donde un cambio crucial, indicó los aminoácidos responsables en el comportamiento de TbTIM y TcTIM ante el MMTS. Este cambio crucial, fue la región 4. No fue hasta que la región 4 de TbTIM fue insertada en TcTIM (Quimera TcTIM 1-3, Figura 15) cuando se

presentó un cambio importante en el patrón de inactivación, ya que por ejemplo, la quimera TcTIM 1-4 (Figura 14) con las regiones 5-8 de TbTIM y 32 sustituciones de un total de 65 diferencias entre las dos enzimas silvestres no presentó un efecto importante en la reactividad de la cisteína de interfase con respecto a TcTIM. El hecho de que se confirmara la importancia de la región 4, con las quimeras que sólo tenían esta región y siete regiones ya sea de TcTIM o TbTIM (Figura 16) limitó el análisis a cinco residuos de aminoácidos.

Los resultados de los experimentos con las quimeras TcTIM 1-2 y TcTIM 1 (Figura 18) llevaron a la conclusión de que la región 1 juega un papel importante y fue constatado con la construcción de la quimera TcTIM 2, 3, 5-8, la cual resultó comportarse como una TbTIM silvestre ante el efecto del MMTS, con seis regiones de TcTIM y solo dos regiones de TbTIM (Figura 19). La región 1, junto con las regiones 5 y 6 son las que presentan mayor número de diferencias, 38 de un total de 65 diferencias entre las dos secuencias de TbTIM y TcTIM. Trece de ellas se encuentran en la región 1.

Ninguno de los aminoácidos involucrados de la región 1 o 4, hacen interacción alguna con la cisteína de interfase y tampoco existe alguna interacción entre ellos (Figura 30). En la tabla 8 y 9 se resumen las interacciones de los 18 aminoácidos involucrados y de la cisteína de interfase, con lo que se demuestra que el efecto de estas dos regiones en la reactividad de la cisteína de interfase podría ser debido a interacciones a larga distancia, descritas en numerosas ocasiones para explicar interacciones en las proteínas ( Vishveshwara S., *et al.*, 2009, Er T.K., *et al.*, 2011, Dubay, K.H., *et al.*, 2011).



**Figura 30. Localización tridimensional de las regiones 1(amarillo) y 4 (magenta).** Se presentan los 18 aminoácidos diferentes en estas regiones, así como la cisteína de interfase.

Aminoácido	Región	Interacciones con aminoácidos vecinos	
		Puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas
Cys14	1	Asn15A, Gly72B, Phe74B	Phe74B
Gln18	1	Gln19A, Ser22A, His47A, Asp85B, Tyr86B	His47A, Met50A, Tyr86B
Gln19	1	Ser17A, Ser20A, Ser22A, Glu23A, Asp85A	
Ser20	1	Ser17A, Leu21A, Glu23A, Leu24A	
Ser22	1	Gln18A, Gln23A, Ile25A, Asp26A, Arg55A	
Glu23	1	Gln19A, Leu24A, Asp26A, Leu27A	
Asp26	1	Ser22A, Leu27A, Asn29A, Ser30A, Arg54A	
Leu27	1	Glu23A, Leu24A, Phe28A, Ser30A, Thr31A	Leu24A, Phe28A, Pro240A, Val243A
Phe28	1	Leu24A, Asn29A, Thr31A, Asn31A	Ala10A, Leu24A, Ile25A, Leu27A, Val41A, Leu55A, Phe60A, Phe242A, Val243A, Ile246A
Ser30	1	Asp26A, Leu27A, Thr37A, Ser32A	
Thr31	1	Leu27A, Phe28A, Ser32A, Ile33A, Asn57A	Ile33A, Val243A, Ile246A
Ser32	1	Ser30A, Ile33A, Asn34A	
Ile33	1	Thr31A, Ser32A, Asn34A, Asn57A, Lys59A,	Thr31A, Val37A, Lys59A, Phe60A, Ile246A
Asn34	1	Ser32A, His35A	

**Tabla 8. Interacciones de los aminoácidos diferentes de la región 1 en la quimera TcTIM 2, 3, 5-8.** Los datos fueron obtenidos utilizando el servidor LPC-CSU, derivado del programa CSU (Sobolev V., *et al.*, 1999), utilizando las coordenadas del cristal de la quimera TcTIM 2, 3, 5-8. Código del PDB 3Q37. Se incluyen las interacciones de la Cys de interfase, aunque este aminoácido es el mismo en TcTIM y TbTIM



Aminoácido	Región	Interacciones con aminoácidos vecinos	
		Puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas
Ala100	4	Ser96A, Tyr101A, Gly103A	Tyr101A
Asp111	4	Glu107A, Lys112A, Ala114A, Ala115A, Lys153A	Thr69A, Lys112A
Ala115	4	Asp111A, Ala116A, Ala118A, Ser119A	Thr69A, Leu80A
Val117	4	Val113A, Ala118A, Gly120A, Arg161A	Val113A, Ala118A, Val123A, Leu154A, Ala158A, Arg161A, Val162A
Ser119	4	Lys84A, Ala115A, Gly120A, Phe121A	

**Tabla 9. Interacciones de los aminoácidos diferentes de la región 4 en la quimera TcTIM 2, 3, 5-8.** Los datos fueron obtenidos utilizando el servidor LPC-CSU, derivado del programa CSU (Sobolev V., *et al.*, 1999), utilizando las coordenadas del cristal de la quimera TcTIM2,3, 5-8. Código del PDB 3Q37.

## 6.4 Análisis de las regiones 1 y 4 de TcTIM y TbTIM.

### 6.4.1 Diferencias en las regiones 1 y 4 entre TcTIM y TbTIM.

Hasta el momento no sabemos como se relacionan las regiones 1 y 4 ni la manera en la que regulan el efecto del MMTS en la cisteína de interfase. Con el objetivo de saber más de estas regiones, se presenta un análisis de las sustituciones en cada región haciendo énfasis en la naturaleza de cada una, así como en su localización en la estructura y en el área de superficie accesible de cada aminoácido. En la región 1 existen 13 diferencias entre las secuencias de aminoácidos de TcTIM y TbTIM, de las cuales 8 son sustituciones conservativas, 1 aminoácido con sustitución semiconservativa y 4 aminoácidos sin homología (Tabla 10). La región 1 junto con las regiones 5 y 6 son las regiones que presentan más diferencias entre TcTIM y TbTIM.

Posición	Tipo de sustitución	aa en TbTIM	ASA Å <sup>2</sup>	aa en TcTIM	ASA Å <sup>2</sup>	Localización en la proteína
18	Conservativa	Gln	67.1	Glu	65.7	Hélice 1
19	Semiconservativa	Gln	126.8	Ser	92.8	Hélice 1
20	Sin homología	Ser	54.9	Leu	89.1	Hélice 1
22	Sin homología	Ser	15.1	Val	40.9	Hélice 1
23	Sin homología	Glu	116.7	Pro	75.2	Hélice 1
26	Conservativa	Asp	64.1	Glu	103.5	Hélice 1
27	Sin homología	Leu	62.1	Thr	46.2	Hélice 1
28	Conservativa	Phe	0	Leu	0.85	Hélice 1
30	Conservativa	Ser	87.8	Ala	86.5	Hélice 1
31	Conservativa	Thr	16.4	Ala	17.7	Asa 1-2
32	Conservativa	Ser	80.9	Thr	108.3	Asa 1-2
33	Conservativa	Ile	14.4	Phe	9.0	Asa 1-2
34	Conservativa	Asn	137.8	Asp	126.7	Asa 1-2

**Tabla 10. Diferencias en la región 1 entre TcTIM y TbTIM.** Se muestra el tipo de sustitución, así como el área de superficie expuesta (ASA) y la localización de cada aminoácido en la proteína. Los cálculos de ASA se realizaron con el programa GETAREA, reportado en Fraczkiwicz, R. y Braun, W., 1998

La mayoría de las sustituciones están concentradas en la primera hélice, algunas ya han sido estudiadas; por ejemplo en la quintuple mutante (Figuras 24 y 25) en donde se analizaron los cambios en las posiciones 18,19, 20, 22 y 23 (numeración de TbTIM). Siguiendo la teoría de que los aminoácidos involucrados en la acción del MMTS son aquellos que están expuestos al solvente, hace falta corroborar que aquellos que se encuentran ocultos no juegan un papel crucial en la derivatización. En este sentido ya se comprobó que el cambio en la posición 33 (Ile33Phe) no es importante como se mostró en la figuras 26 y 27 con la quimera TcTIM 1,3, 5-8;Phe34Ile.

La región 4 de TcTIM y TbTIM presenta cinco diferencias, de las cuales 3 sustituciones no tienen homología y 2 sustituciones son conservativas (Tabla 11).

Posición	Tipo de sustitución	aa en TbTIM	ASA Å <sup>2</sup>	aa en TcTIM	ASA Å <sup>2</sup>	Localización en la proteína
100	Sin homología	Ala	76.82	Leu	94.15	Hélice 4
111	Conservativa	Asp	71.08	Glu	93.31	Hélice 4
115	Sin homología	Ala	26.57	Gln	44.50	Hélice 4
117	Sin homología	Val	10.69	Cys	3.62	Hélice 4
119	Sin homología	Ser	26.20	Ala	18.96	Hélice 4

**Tabla 11. Diferencias en la región 4 entre TcTIM y TbTIM.** Se muestra el tipo de sustitución, así como el área de superficie expuesta (ASA) y la localización de cada aminoácido en la proteína. Los cálculos de ASA se realizaron con el programa GETAREA, reportado en Fraczekiewicz, R. y Braun, W.,1998

Las diferencias en esta región solo se limitan al estudio de cinco mutaciones, sin embargo, solo la posición 115 ha sido caracterizada con la mutante TcTIM 4:116A (Figura 28). Se observó que esta mutación era importante en el efecto del MMTS, pero también nos percatamos que este aminoácido no es el único involucrado, por lo que hace falta estudiar otras sustituciones y más aún hacer algunas

combinaciones de mutaciones para llegar al número mínimo de sustituciones involucradas en el mecanismo de derivatización de los agentes de grupo sulfhidrilo.

#### **6.4.2 Importancia de las regiones 1 y 4 en otras características de la TIM.**

En varios trabajos de investigación se ha demostrado que los aminoácidos en estas dos regiones son protagonistas de eventos importantes en la TIM. La región 1 abarca del residuo 1 (Met) al residuo 35 (His). En esta región se encuentra uno de los aminoácidos catalíticos, la Lys13 y algunos aminoácidos que forman parte de la interfase en las posiciones 11, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 entre ellos la cisteína de interfase (Cys14). Dentro de los 18 aminoácidos importantes en la inactivación de TcTIM y TbTIM por reactivos de grupo sulfhidrilo, sólo dos de ellos forman parte de la interfase, la Gln 18 y Gln 19 en TbTIM, que corresponden al Glu19 y a la Ser 20 en TcTIM.

La región 4 abarca del aminoácido 92 (Val) al 119 (Ala en TcTIM y Ser en TbTIM). A pesar de que en esta región sólo hay cinco diferencias entre la secuencia de aminoácidos de TbTIM y TcTIM; se ha demostrado que varios aminoácidos de esta región son cruciales en algunas características de estas dos enzimas. En TcTIM, en esta región se encuentra la Cys 117, residuo de cisteína adicional con respecto a las cisteínas que tiene TbTIM. En los primeros estudios fue mutado por un residuo de Val, aminoácido que se encuentra en TbTIM (Garza-Ramos G., *et al.*, 1998); sin embargo no hubo un cambio importante con respecto a su comportamiento en presencia del MMTS.

También en esta región se encuentran dos residuos de tirosina importantes, la Tyr101 y Tyr102, que han sido ampliamente estudiados por formar parte de una cavidad hidrofóbica que se conserva en algunas TIMs de parásitos como LmTIM, EhTIM y PfTIM (Olivares-Illana., *et al.*, 2006) y también en TcTIM y TbTIM. Cuando se cristalizó TcTIM en presencia de hexano, dentro de los siete aminoácidos que se encontraban a menos de 4 Å de una de las moléculas de

hexano, se encontraron estas tirosinas (Gao XG., *et al.*, 1999). Cuando se cristalizó TcTIM en presencia de un compuesto derivado del benzotiazol (el ácido 3-(2-benzotiazoliltio)1-propanosulfónico), resultó que también una de las tirosinas, la Tyr101 resultó a menos de 4 Å del compuesto en cuestión (Tellez-Valencia A., *et al.*, 2004).

Esta región también cobró importancia en el estudio de la mutación Glu104Asp de HuTIM (Rodríguez-Almazán C., *et al.*, 2008) que causa una severa deficiencia de TIM en humanos. En este trabajo se relacionó la mutación en la posición 104 (región 4) con una red de moléculas de agua conservadas que se sitúan en la interfase. Esta red de moléculas de agua se encuentra en una cavidad polar formada por 10 aminoácidos (5 de cada monómero) que se conservan en todas las secuencias de TIM reportadas, salvo en las enzimas de arqueobacterias. De los cinco aminoácidos que forman esta cavidad polar, tres de ellos se encuentran en la región 4 (Arg98, Glu104 y Lys112, numeración de HuTIM).

Todos estos eventos y particularidades que han sido caracterizadas en la TIM resaltan el interés de las regiones 1 y 4, no sólo en relación con el efecto de los reactivos de grupo sulfhidrilo si no en muchas otras características relevantes de esta enzima. Es importante recalcar que antes de este trabajo, ni la región 1, ni la región 4 habían cobrado tanto interés.

Dados los resultados aquí presentados podemos sugerir a estas dos regiones como posibles “hot points”, en donde se está afectando de manera importante la actividad de una enzima tan estudiada como lo es la TIM.

## 7. Conclusiones.

- El uso de quimeras permitió encontrar las regiones involucradas en el distinto comportamiento de TbTIM y TcTIM cuando se inactivan con el MMTS. Esta estrategia puede ser útil para estudiar proteínas homólogas.
- Se demostró que la diferencia de susceptibilidad al MMTS entre TbTIM y TcTIM no es debido a mutaciones puntuales, de manera contraria es un efecto concertado entre varios aminoácidos.
- Las diferencias en comportamiento de TbTIM y TcTIM en presencia del MMTS están dadas por 18 aminoácidos distribuidos en las regiones 1 y 4; entre los cuales no hay interacción alguna, ni tampoco interaccionan con la cisteína de interfase, lo que sugiere fuertemente que, el efecto de estas dos regiones, se debe a interacciones a larga distancia.
- Las 18 diferencias tienen como consecuencia un cambio en el  $pK_a$  de la cisteína de interfase.

## 8. Perspectivas.

Identificar los 18 aminoácidos responsables en la inactivación por MMTS, fue un gran avance en el estudio de las diferencias entre TcTIM y TbTIM; sin embargo aún no conocemos cual es el número mínimo de sustituciones que se requieren para que TcTIM presente el mismo comportamiento que TbTIM. Una vez que se encuentren los aminoácidos responsables tanto en la región 1 como en la región 4, sería importante identificar la combinación mínima necesaria entre los aminoácidos de la región 1 y 4 para que TcTIM sea resistente al efecto del MMTS como TbTIM. Para cumplir estos objetivos es necesario el diseño de nuevas quimeras.

La quimera TcTIM 2, 3, 5-8 que posee un comportamiento similar al de TbTIM, al menos en su susceptibilidad al MMTS y DTNB, resulta una enzima a la cual se le pueden estudiar numerosas características. Esta idea surge del hecho que en las condiciones utilizadas en los ensayos de MMTS y DTNB, esta quimera aparentemente es aún más resistente que TbTIM. Las preguntas que surgen de estos resultados son: ¿Las regiones 1 y 4 de TbTIM le confirieron ciertas características a TcTIM que la convierten en una enzima “mejorada” con respecto a las enzimas silvestres? ¿Qué otras características le confirieron estas dos regiones de TbTIM a TcTIM? Para abordar estos cuestionamientos se deben estudiar diversas propiedades de esta enzima, como por ejemplo la desnaturalización por diferentes agentes como la urea, guanidina y temperatura, la hidrólisis por subtilisina, así como ensayos de inhibición con los distintos compuestos derivados del benzotiazol que se han probado en TcTIM y TbTIM.

Es un hecho que este acercamiento resulta exitoso en proteínas con alto grado de identidad; en este sentido, resultaría relevante explorar las distintas regiones de LmTIM, ya que presenta un 68 y 69% de identidad con TcTIM y TbTIM respectivamente. LmTIM es una enzima que es resistente al efecto del MMTS, aún

más que TbTIM y la pregunta a responder sería si las regiones 1 y 4 también son determinantes para su inactivación por reactivos de grupo de sulfhidrilo.

Resolver el problema de la diferencia de susceptibilidad a los reactivos de grupo sulfhidrilo entre TcTIM y TbTIM es sólo una de las múltiples diferencias que presentan estas dos enzimas homólogas. Gracias a este trabajo de investigación sabemos que el diseño de proteínas quiméricas en enzimas homólogas como TbTIM y TcTIM para identificar alguna región determinante para una función específica, es factible. Por otro lado, es importante mencionar que todas las enzimas quiméricas con diferentes combinaciones de TcTIM y TbTIM, fueron proteínas solubles, catalíticamente eficientes y con importantes niveles de expresión. Todo lo anterior, nos permite sugerir el diseño de quimeras para abordar cualquier problema que involucre la identificación de alguna región importante para cierta función.

Por mencionar algunas diferencias por explorar, se encuentra el comportamiento de la cinética de reactivación de TbTIM y TcTIM después de la desnaturalización con guanidina, la diferente susceptibilidad a la digestión por subtilisina, la diferencia tan marcada ante el efecto de compuestos derivados benzotiazoles y la distinta energía de activación que presentan estas dos enzimas.



## 9. Referencias Bibliográficas.

Acosta H, Dubourdieu M, Quiñones W, Cáceres A, Bringaud F, Concepción JL. (2004) Pyruvate phosphate dikinase and pyrophosphate metabolism in the glycosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 138(4):347-56.

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.(2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):213-21.

Alahuhta M, Wierenga RK.(2010) Atomic resolution crystallography of a complex of triosephosphate isomerase with a reaction-intermediate analog: new insight in the proton transfer reaction mechanism. *Proteins.*78(8):1878-88.

Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman J.D, Offord RE, Priddle JD, Waley SG. (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature.* 255(5510):609-14.

Banerjee M, Balaram H, Joshi NV, Balaram P. (2011) Engineered dimer interface mutants of triosephosphate isomerase: the role of inter-subunit interactions in enzyme function and stability. *Protein Eng Des Sel.* 24(5):463-72.

Berriman M, *et al.*,(2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science.* 309(5733):416-22.

Blattner J, Helfert S, Michels P, Clayton C.(1998) Compartmentation of phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei* plays a critical role in parasite energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(20):11596-600.

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

Borchert TV, Abagyan R, Kishan KV, Zeelen JP, Wierenga RK. (1993b). The crystal structure of an engineered monomeric triosephosphate isomerase, monoTIM: the correct modelling of an eight-residue loop. *Structure.* 1(3):205-13.

Borchert TV, Abagyan R, Jaenicke R, Wierenga RK. (1994). Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(4):1515-8.

Cabrera N, Hernández-Alcántara G, Mendoza-Hernández G, Gómez-Puyou A, Perez-Montfort R. (2008). Key residues of loop 3 in the interaction with the interface residue at position 14 in triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry*. 47(11):3499-506.

Casteleijn MG, Alahuhta M, Groebel K, El-Sayed I, Augustyns K, Lambeir AM, Neubauer P, Wierenga RK.(2006). Functional role of the conserved active site proline of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*. 45(51):15483-94.

Cazzulo JJ. (1992). Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J*. 6(13):3153-61.

Chaudhuri M, Ajayi W, Hill GC. (1998). Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Mol Biochem Parasitol*. 95(1):53-68.

Chauhan SC, Padmanabhan PK, Madhubala R. (2008) Glyoxalase pathway of trypanosomatid parasites: a promising chemotherapeutic target. *Curr Drug Targets*. 9:957-965.

Collaborative Computational Project, Number 4. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 50(Pt 5):760-3.

Costas M, Rodríguez-Larrea D, De Maria L, Borchert TV, Gómez-Puyou A, Sanchez-Ruiz JM. (2009) Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *J Mol Biol*. 385(3):924-37.

de Souza W. (2002). Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res*. 88:1013-1025.

Díaz-Mazariegos S. (2010). Identificación de los aminoácidos de la región 1 responsables del distinto comportamiento entre TbTIM y TcTIM ante el efecto de los reactivos de grupo sulfhidrilo (MMTS). Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo) Facultad de Química. Universidad Autónoma de Chiapas.

Dosztányi Z, Fiser A, Simon I. (1997) Stabilization centers in proteins: identification, characterization and predictions. *J Mol Biol*. 272(4):597-612.

Dubay KH, Bothma JP, Geissler PL. (2011) Long-range intra-protein communication can be transmitted by correlated side-chain fluctuations alone *PLoS Comput Biol*. 7(9):e1002168.

Duffieux F, Van Roy J, Michels PA, Opperdoes FR.(2000) Molecular characterization of the first two enzymes of the pentose-phosphate pathway of *Trypanosoma brucei*. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconolactonase. *J Biol Chem*. 275(36):27559-65.

Enriquez-Flores S, Rodriguez-Romero A, Hernandez-Alcantara G, De la Mora-De la Mora I, Gutierrez-Castrellon P, Carvajal K, Lopez-Velazquez G, Reyes-Vivas H

(2008) Species-specific inhibition of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Mol Biochem Parasitol.* 157(2):179-86.

Er TK, Chen CC, Liu YY, Chang HC, Chien YH, Chang JG, Hwang JK, Jong YJ. (2011) Computational analysis of a novel mutation in ETFDH gene highlights its long-range effects on the FAD-binding motif. *BMC Struct Biol.* 11:43.

Fraczkiewicz, R. y Braun, W. (1998) "Exact and Efficient Analytical Calculation of the Accessible Surface Areas and Their Gradients for Macromolecules" *J. Comp. Chem.*, **19**, 319-333.

Furuya T, Kessler P, Jardim A, Schnauffer A, Crudder C, Parsons M. (2002) Glucose is toxic to glycosome-deficient trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(22):14177-82.

Gao XG, Maldonado E, Pérez-Montfort R, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A, Rodríguez-Romero A.(1999) Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 96(18):10062-7.

García-Torres I. (2006) Producción y caracterización de una triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* con la interfase de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Maestría (Maestría en Ciencias Bioquímicas), Facultad de Química, UNAM.

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(3):684-91.

Gómez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga RA, 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(12):847-55.

Guerra-Giraldez C, Quijada L, Clayton CE. (2002) Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci.* 115(Pt 13):2651-8.

Greig N, Wyllie S, Patterson S, Fairlamb AH. (2009) A comparative study of methylglyoxal metabolism in trypanosomatids. *FEBS J.* 276(2):376-86.

Haanstra JR, van Tuijl A, Kessler P, Reijnders W, Michels PA, Westerhoff HV, Parsons M, Bakker BM (2008). Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(46):17718-23.

Hajduk SL. (1984) Antigenic variation during the developmental cycle of *Trypanosoma brucei*. *J Protozool.* ;31(1):41-7.

Hammond DJ, Aman RA, Wang CC.(1985) The role of compartmentation and glycerol kinase in the synthesis of ATP within the glycosome of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 1985;260(29):15646-54.

Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR, Michels PA. (2003) Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biology and Disease.* 2(1):11.

Hannaert V, Saavedra E, Duffieux F, Szikora JP, Rigden DJ, Michels PA, Opperdoes FR. (2003) Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(3):1067-71.

Helfert S, Estévez AM, Bakker B, Michels P, Clayton C.(2001) Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* 357(Pt 1):117-25.

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(13): 4230-8.

Irsch T, Krauth-Siegel RL. (2004) Glyoxalase II of African trypanosomes is trypanothione-dependent. *J Biol Chem.* 279(21):22209-17.

Kannan N, Selvaraj S, Gromiha MM, Vishveshwara S. (2001). Clusters in alpha/beta barrel proteins: implications for protein structure, function, and folding: a graph theoretical approach. *Proteins.* 43(2): 103-12.

Kessler PS, Parsons M. (2005) Probing the role of compartmentation of glycolysis in procyclic form *Trypanosoma brucei*: RNA interference studies of PEX14, hexokinase, and phosphofructokinase. *J Biol Chem.* 280(10):9030-6.

Krazy H, Michels PA. (2006) Identification and characterization of three peroxins--PEX6, PEX10 and PEX12--involved in glycosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta.*1763(1):6-17.

Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C.(2000) Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Microbiol.* 35(3):542-52.

Kursula I, Partanen S, Lambeir AM, Antonov DM, Augustyns K, Wierenga RK. (2001) Structural determinants for ligand binding and catalysis of triosephosphate isomerase. *Eur J Biochem.* 268(19):5189-96.

Kursula I, Wierenga RK. (2003) Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83-Å resolution. *J Biol Chem.* 278(11):9544-51.

Kursula I, Salin M, Sun J, Norledge BV, Haapalainen AM, Sampson NS, Wierenga RK. (2004) Understanding protein lids: structural analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Protein Eng Des Sel.* 17(4):375-82.

Landa A, Rojo-Domínguez A, Jiménez L, Fernández-Velasco DA. (1997) Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur J Biochem.* 247(1):348-55.

Lamour N, Rivière L, Coustou V, Coombs GH, Barrett MP, Bringaud F. (2005) Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *J Biol Chem.* 280(12):11902-10.

Leslie AGW (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. Joint CCP4 + ESF-EAMCB. *Newsletter on Protein Crystallography* 26.

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(4):824-34.

Malabanan MM, Amyes TL, Richard JP. (2010) A role for flexible loops in enzyme catalysis. *Curr Opin Struct Biol.* 20(6):702-10.

Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Perez-Montfort R. (1998) Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J Mol Biol.* 283(1):193-203.

Mainfroid V, Terpstra P, Beauregard M, Frère JM, Mande SC, Hol WG, Martial JA, Goraj K. (1996). Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J Mol Biol.* 257(2):441-56.

Maithal K, Ravindra G, Balaram H, Balaram P. (2002) Inhibition of *Plasmodium falciparum* triose-phosphate isomerase by chemical modification of an interface cysteine. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of differential cysteine reactivities. *J Biol Chem.* 277:25106-14.

Mande SC, Mainfroid V, Kalk KH, Goraj K, Martial JA, Hol WG. (1994) Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Science.* 3(5):810-21.

- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr.* 40(Pt 4):658-674.
- Meziane-Cherif D, Aumercier M, Kora I, Sergheraert C, Tartar A, Dubremetz JF, Ouaissi MA. (1994) *Trypanosoma cruzi*: immunolocalization of trypanothione reductase. *Exp Parasitol.* 79(4):536-41.
- Michels PA, Hannaert V, Bringaud F. (2000) Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitology Today.* 16(11):482-9.
- Michels PA, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta.* 1763(12):1463-77.
- Morrison KL, Weiss GA. (2001) Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol.* 5(3):302-7.
- Moyersoer J, Choe J, Kumar A, Voncken FG, Hol WG, Michels PA. (2003) Characterization of *Trypanosoma brucei* PEX14 and its role in the import of glycosomal matrix proteins. *Eur J Biochem.* 270(9):2059-67.
- Müller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL.(2003) Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 19(7):320-8.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 53(Pt 3):240-55.
- Nagano N, Orengo CA, Thornton JM. (2002) One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J Mol Biol.* 321(5):741-65.
- Noble ME, Zeelen JP, Wierenga RK. (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(4):311-26.
- Nwagwu M, Opperdoes FR. (1982) Regulation of glycolysis in *Trypanosoma brucei*: hexokinase and phosphofructokinase activity. *Acta Trop.* 39(1):61-72.
- Olivares-Illana V, Pérez-Montfort R, López-Calahorra F, Costas M, Rodríguez-Romero A, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez Puyou A.(2006) Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor.*Biochemistry.* 45: 2556-2560.
- Olivares-Illana V, Rodríguez-Romero A, Becker I, Berzunza M, García J, Pérez-Montfort R, Cabrera N, López-Calahorra F, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A.(2007) Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 1(1): e01. doi:10.1371/journal.pntd.0000001

Opperdoes FR, Borst P.(1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.* 1977; 80(2): 360-4.

Opperdoes FR. (1984) Localization of the initial steps in alkoxyphospholipid biosynthesis in glycosomes (microbodies) of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 169(1): 35-9.

Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramírez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou M, Pérez-Montfort R. (1997) Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem.* 244(3):700-5.

Pérez-Montfort R, Garza-Ramos G, Alcántara GH, Reyes-Vivas H, Gao XG, Maldonado E, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A (1999). Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry.* 38(13):4114-20.

Pérez-Montfort R, de Gomez-Puyou MT, Gomez-Puyou A. (2002)The interfaces of oligomeric proteins as targets for drug design against enzymes from parasites. *Curr Top Med Chem.* 2(5):457-70.

Pompliano DL, Peyman A, Knowles JR. (1990).Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry.* 29(13):3186-94.

Ranie J, Kumar VP, Balaram H.(1993) Cloning of the triosephosphate isomerase gene of Plasmodium falciparum and expression in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol.* 61(2):159-69.

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

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

Roditi I, Lehane MJ. (2008) Interactions between trypanosomes and tsetse flies. *Curr Opin Microbiol.*11(4):345-51.

Rodríguez-Almazán C, Arreola R, Rodríguez-Larrea D, Aguirre-López B, de Gómez-Puyou MT, Pérez-Montfort R, Costas M, Gómez-Puyou A, Torres-Larios A.

(2008) Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *J Biol Chem.* 283(34): 23254-63.

Rodríguez-Bolaños M. (2010) Clonación, purificación y caracterización de una mutante de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*. Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo), Facultad de Química, UNAM

Rodríguez-Romero A, Hernández-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Kornhauser A, Fernández-Velasco DA (2002) Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J Mol Biol.* 322(4):669-75.

Rozovsky S, Jogl G, Tong L, McDermott AE.(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(1):271-80.

Schliebs W, Thanki N, Jaenicke R, Wierenga RK.(1997) A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry.* 36(32):9655-62.

Selvaraj S, Gromiha MM. (1998) Importance of long-range interactions in (alpha/beta)<sub>8</sub> barrel fold. *J Protein Chem.* 17(7):691-7.

Sheinerman FB, Brooks CL 3rd. (1998) Molecular picture of folding of a small alpha/beta protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(4):1562-7.

Smith K, Opperdoes FR, Fairlamb AH. (1991) Subcellular distribution of trypanothione reductase in bloodstream and procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 48(1):109-12.

Sobolev V, Sorokine A, Prilusky J, Abola EE, Edelman M. (1999) Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics.* 15:327-32.

Sommer JM, Wang CC. (1994) Targeting proteins to the glycosomes of African trypanosomes. *Annu Rev Microbiol.* 48:105-38.

Sun AQ, Yüksel KU, Gracy RW.(1992) Relationship between the catalytic center and the primary degradation site of triosephosphate isomerase: effects of active site modification and deamidation. *Arch Biochem Biophys.* 293(2):382-90.

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



Tielens AG, van Hellemond JJ. (2009) Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends Parasitol.* 25:482-90.

Thakur SS, Deepalakshmi PD, Gayathri P, Banerjee M, Murthy MR, Balaram P. (2009) Detection of the protein dimers, multiple monomeric states and hydrated forms of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in the gas phase. *Protein Eng Des Sel.* 22(5):289-304.

van Hellemond JJ, Bakker BM, Tielens AG. (2005) Energy metabolism and its compartmentation in *Trypanosoma brucei*. *Adv Microb Physiol.* 50:199-226.

van Hellemond JJ, Opperdoes FR, Tielens AG. (2005b) The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 5):967-71.

van Weelden SW, van Hellemond JJ, Opperdoes FR, Tielens AG. (2005) New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic *Trypanosoma brucei*, a cycle not operating as a cycle. *J Biol Chem.* 280(13):12451-60.

Vishveshwara S, Ghosh A, Hansia P. (2009) Intra and inter-molecular communications through protein structure network. *Curr Protein Pept Sci.* 10: 146-60.

Walden H, Bell GS, Russell RJ, Siebers B, Hensel R, Taylor GL. (2001) Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J Mol Biol.* 306(4):745-57.

Walden H, Taylor GL, Lorentzen E, Pohl E, Lilie H, Schramm A, Knura T, Stubbe K, Tjaden B, Hensel R. (2004) Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J Mol Biol.* 342(3):861-75.

Wang Y, Berlow RB, Loria JP. (2009). Role of loop-loop interactions in coordinating motions and enzymatic function in triosephosphate isomerase. *Biochemistry.* 48(21):4548-56.

Wierenga RK, Noble ME, Vriend G, Nauche S, Hol WG. (1991) Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J Mol Biol.* 220(4):995-1015.

Wiemer EA, IJlst L, van Roy J, Wanders RJ, Opperdoes FR. (1996) Identification of 2-enoyl coenzyme A hydratase and NADP(+)-dependent 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity in glycosomes of procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 82(1):107-11.

Wilkinson SR, Meyer DJ, Taylor MC, Bromley EV, Miles MA, Kelly JM.(2002) The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J Biol Chem.* 277(19):17062-71.

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

Zomosa-Signoret V, Aguirre-López B, Hernández-Alcántara G, Pérez-Montfort R, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A. (2007) Crosstalk between the subunits of the homodimeric enzyme triosephosphate isomerase. *Proteins*. 67(1):75-83.

## 10. Artículos publicados

**-García-Torres I.**, Cabrera N., Torres-Larios A., Martínez-Bolaños M., Díaz-Mazariegos S. Gomez-Puyou A., Perez-Montfort R. Identification of Amino Acids that Account for Long-Range Interactions in Two Triosephosphate Isomerases from Pathogenic Trypanosomes. *PLoS One*. 2011 Apr 18;6(4):e18791

**-García-Torres I.**, Pérez-Montfort R., Avances en la identificación de blancos terapéuticos y el diseño racional de fármacos contra la enfermedad de Chagas. *Revista de Educación Bioquímica* 30 (2): 68-81, 2011.

# Identification of Amino Acids that Account for Long-Range Interactions in Two Triosephosphate Isomerases from Pathogenic Trypanosomes

Itzhel García-Torres, Nallely Cabrera, Alfredo Torres-Larios, Mónica Rodríguez-Bolaños, Selma Díaz-Mazariegos, Armando Gómez-Puyou, Ruy Perez-Montfort\*

Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, México DF, Mexico

## Abstract

For a better comprehension of the structure-function relationship in proteins it is necessary to identify the amino acids that are relevant for measurable protein functions. Because of the numerous contacts that amino acids establish within proteins and the cooperative nature of their interactions, it is difficult to achieve this goal. Thus, the study of protein-ligand interactions is usually focused on local environmental structural differences. Here, using a pair of triosephosphate isomerase enzymes with extremely high homology from two different organisms, we demonstrate that the control of a seventy-fold difference in reactivity of the interface cysteine is located in several amino acids from two structurally unrelated regions that do not contact the cysteine sensitive to the sulfhydryl reagent methylmethane sulfonate, nor the residues in its immediate vicinity. The change in reactivity is due to an increase in the apparent pKa of the interface cysteine produced by the mutated residues. Our work, which involved grafting systematically portions of one protein into the other protein, revealed unsuspected and multisite long-range interactions that modulate the properties of the interface cysteines and has general implications for future studies on protein structure-function relationships.

**Citation:** García-Torres I, Cabrera N, Torres-Larios A, Rodríguez-Bolaños M, Díaz-Mazariegos S, et al. (2011) Identification of Amino Acids that Account for Long-Range Interactions in Two Triosephosphate Isomerases from Pathogenic Trypanosomes. *PLoS ONE* 6(4): e18791. doi:10.1371/journal.pone.0018791

**Editor:** Nai Sum Wong, University of Hong Kong, Hong Kong

**Received:** September 25, 2010; **Accepted:** March 18, 2011; **Published:** April 18, 2011

**Copyright:** © 2011 García-Torres et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IN200507 and IN202910) and by the Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (304/2009 and PIFUTP09-279) to RPM and ATL, respectively, and also by the Universidad Nacional Autónoma de México. IGT was the recipient of a fellowship from CONACyT (No. 177322). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: ruy@ifc.unam.mx

## Introduction

It is assumed that the structure-function relationship from similar protein sequences will usually yield similar physicochemical and functional properties. Take for example the glycolytic enzyme triosephosphate isomerase (TIM) from two evolutionarily related pathogenic parasites, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. These are two pathogenic protists of the order of the kinetoplastidae that cause sleeping sickness and Chagas disease in humans, respectively. Many of the proteins of these parasites have a high degree of sequence identity; in the case of the two trypanosomal TIMs it is 73.9%, with a sequence similarity of 92.4%. Both enzymes are homodimers whose three dimensional structures superpose with an RMS of 0.96 Å and both have an identical catalytic site in each monomer formed by residues K13, H95 and E167 (based on the numbering for the sequence of TIM from *T. brucei* (TbTIM)).

However, even though the two enzymes are markedly similar, there are several striking differences in several functional properties of the two proteins. For example, their susceptibility to digestion with subtilisin [1], their velocity and extent of reactivation from guanidine chloride unfolded monomers [2], and their susceptibility to inactivation by several low molecular weight agents [3]. Of particular relevance to this work is their remarkably different susceptibility to sulfhydryl reagents like methylmethane

thiosulfonate (MMTS): the enzyme from *T. cruzi* is 70 times more sensitive than the enzyme from *T. brucei* [4–8]. The initial site of action of the thiol reagent in both enzymes is their only interface cysteine (Cys), which is at position 14 or 15 of TbTIM and TIM from *T. cruzi* (TcTIM), respectively; it is surrounded by residues of loop 3 of the other subunit [4–11]. Since the three dimensional arrangements of the interface Cys relative to the other monomer are nearly identical in the two enzymes, the question arose as to which residues or parts of the enzymes are responsible for the different susceptibility to the thiol reagent.

The question of finding the amino acids in a protein sequence that have an influence on certain measurable protein functions has occupied protein chemists for many decades and, in consequence, numerous methods have been used to solve the problem [12–17]. Among the approaches to understand the relation between the structure and function of proteins, the use of chimeras has been rather frequent. Indeed, chimeras formed with different protein domains have been successfully used to ascertain the interplay between different portions of the protein and how each domain contributes to the overall function of the protein [18–20].

In this work, we show that by progressive grafting of different portions of a protein into equivalent regions of a homologous protein with a different trait, it is possible to ascertain the parts (and the amino acids) of the protein that participate in the expression of that feature.

# AVANCES EN LA IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS TERAPÉUTICOS Y EL DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS\*

Itzhel García-Torres, Ruy Pérez-Montfort

Departamento de Bioquímica y Biología Estructural. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior S/N. Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510. México D.F. Correo E: garcia.itzhel@gmail.com, ruy@ifc.unam.mx

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas, es considerada una de las enfermedades tropicales más olvidadas que afecta a más de 10 millones de personas alrededor del mundo. A más de 100 años de su descubrimiento, no se ha encontrado un fármaco que sea eficaz contra esta enfermedad en cualquiera de sus dos principales etapas. Se han realizado numerosos estudios alrededor del mundo enfocados en la selección de blancos potenciales para el desarrollo de fármacos contra la enfermedad de Chagas. En este trabajo realizamos una revisión acerca de estos estudios, haciendo énfasis en aquéllos basados en las diferencias presentadas en el metabolismo de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de esta enfermedad, con respecto al de su hospedero mamífero. Mediante el análisis detallado de estas diferencias metabólicas, se han revelado un importante número de blancos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos. De manera prometedora, el diseño racional de fármacos con base en el conocimiento de estas moléculas, ha permitido que algunos de estos nuevos compuestos, se encuentren en las primeras fases preclínicas.

## ABSTRACT

Chagas disease affects over 10 million people around the world, and it is considered one of the most neglected tropical diseases. Even though this disease was discovered more than 100 years ago, there is not an effective drug against Chagas in any of its two main stages. There are several studies around the world focused on the selection of potential targets for drug development against Chagas disease. In this work, we made a revision of these attempts with emphasis in those works based on the metabolic differences between *Trypanosoma cruzi* (the etiological agent of chagas disease) and its mammalian host. As a result of the detailed analysis of these metabolic differences, a great number of potential targets for rational drug design have been revealed, and some of the most promising molecules designed are now being tested in early preclinical studies.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es considerada por la Organización Mundial de la Salud como parte de las 13 enfermedades tropicales más olvidadas, entre las que también se encuentran la enfermedad del sueño y varios tipos de leishmaniasis. Esta enfermedad representa un problema tanto de salud como económico principalmente para varios

países de Latinoamérica. La enfermedad de Chagas también llamada tripanosomiasis americana es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, que fue descubierto por el médico brasileño Carlos Chagas en 1909. A pesar de que han transcurrido un poco más de 100 años después del descubrimiento de la enfermedad, se han recuperado DNA de *T. cruzi* de momias humanas en estudios paleontológicos que demuestran que

## PALABRAS

### CLAVE:

Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, blanco terapéutico, diseño racional de fármacos

### KEY WORDS:

Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, therapeutic target, rational drug design

\*Recibido: 10 de mayo de 2011 Aceptado: 14 de junio de 2011