

PROBLEMA BIOQUÍMICO
Estudio cinético de la cistationina β-sintasa de *Trypanosoma cruzi*

PROBLEMA BIOQUÍMICO

ESTUDIO CINÉTICO DE LA CISTATIONINA β -SINTASA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Andrea Nayeli González López (1), Samuel Baca Chiapa (1), César Pastrana Pineda (1),
Emma Saavedra (1), Javier Alejandro Belmont Díaz*(1)

(1) Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez. Ciudad de México, México.

*Autor de correspondencia correo E: javier.belmont@cardiologia.org.mx ; belmont81@hotmail.com

RESUMEN

La cistationina β -sintasa (CBS) es una enzima dependiente de piridoxal 5-fosfato que cataliza la condensación de una molécula de homocisteína con una molécula de serina para formar cistationina. Esta reacción constituye el primer paso de la vía de transulfuración, la cual tiene como producto final a la cisteína. La cisteína juega un papel clave en la defensa antioxidante de *Trypanosoma cruzi*, parásito hemoflagelado agente causal de la enfermedad de Chagas. Debido a la importancia que juega en el metabolismo antioxidante de *Trypanosoma cruzi* y a su gran diferencia estructural con su homólogo humano, la CBS es un buen candidato como blanco terapéutico contra la enfermedad de Chagas. En el presente trabajo se realiza un análisis cinético de la enzima cistationina β -sintasa (CBS) con el objetivo de explorar su mecanismo cinético.

PALABRAS CLAVE

Cinética enzimática, cistationina β -sintasa, vía de transulfuración, cisteína

ABSTRACT

Cystathionine β -synthase (CBS) is a pyridoxal 5-phosphate-dependent enzyme that catalyzes the condensation of a homocysteine molecule with a serine molecule to form cystathionine. This reaction constitutes the first step of the transsulfuration pathway, which has the formation of cysteine as its final product. Cysteine plays a key role in the antioxidant defense of *Trypanosoma cruzi*, the hemoflagellate parasite that causes Chagas disease. Due to the critical role of CBS in the antioxidant metabolism of *Trypanosoma cruzi* and its significant structural difference with its human counterpart, CBS is a good candidate as a therapeutic target against Chagas disease. In the present work, a kinetic analysis of the enzyme cystathionine β -synthase (CBS) is carried out with the aim of exploring its kinetic mechanism.

KEY WORDS

Enzyme kinetics, cystathionine β -synthase, transsulfuration pathway, cysteine

Introducción

Importancia de la cisteína en el sistema antioxidante de *Trypanosoma cruzi*. La cisteína (Cys) juega un papel fundamental en *T. cruzi* para el manejo del estrés oxidante, esto se debe a que es utilizada para sintetizar moléculas antioxidantes, como el glutatión (GSH) y el tripanotión $T(SH)_2$ que le permiten a la célula defenderse contra el daño oxidante provocado por especies químicas reactivas como son las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fig. 1) (1). El

grupo tiol (-SH) que contiene la Cys funciona como donador de electrones en las reacciones de óxido-reducción involucradas en la desintoxicación de dichas especies reactivas (Fig. 1). La síntesis de $T(SH)_2$ puede dividirse en dos etapas, la primera donde se condensan la Cys, el ácido glutámico (Glu) y la glicina (Gly), para formar glutatión (GSH) y una segunda etapa donde dos moléculas de GSH se condensan con una molécula de espermidina (Spd) para finalmente formar $T(SH)_2$ (Fig. 1) (1).

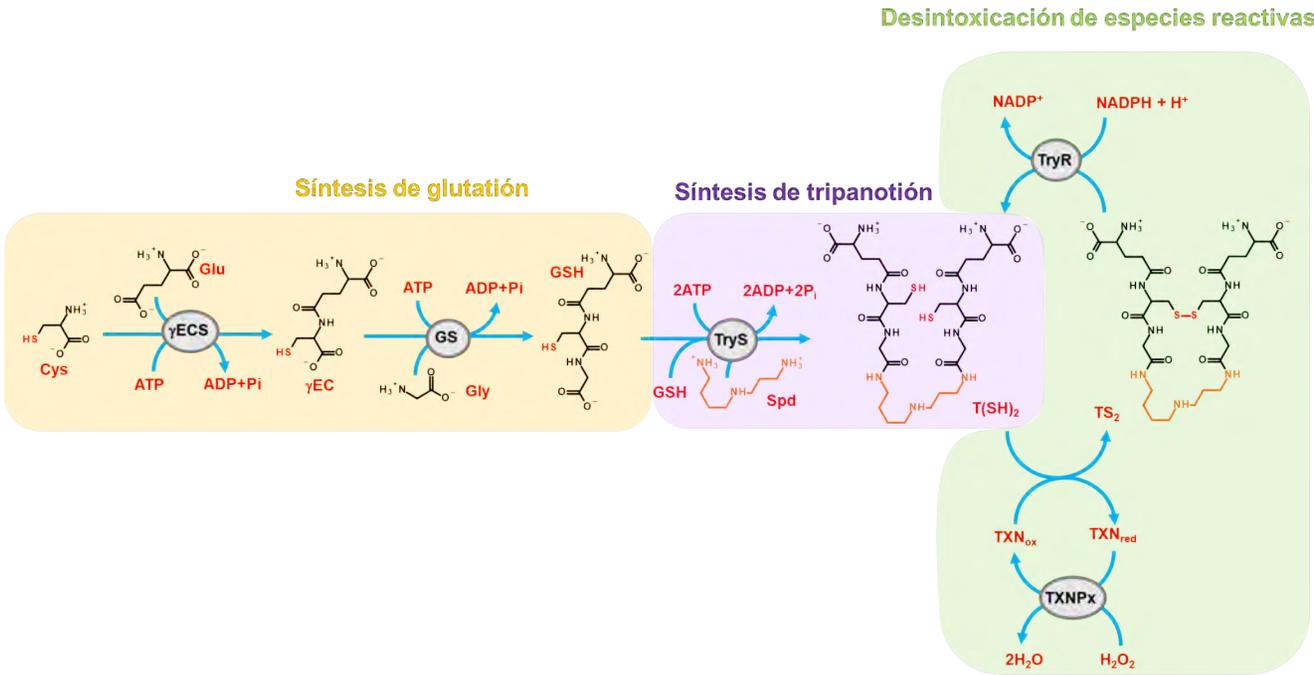


Figura 1. Síntesis de tripanotión. El tripanotión es el antioxidante más importante en *T. cruzi* y el átomo de azufre que contiene participa en reacciones redox, dicho átomo proviene de la cisteína, la cual puede ser sintetizada por la vía de transulfuración, la síntesis de *novo* y el transporte. Abreviaturas de sustratos: cisteína (Cys), glutamato (Glu), γ -glutamilcisteína (γ -EC), glicina (Gly), glutatión (GSH), espermidina (Spd), tripanotión reducido/oxidado ($T(SH)_2$ / TS_2), triparedoxina reducida/oxidada (TXN_{ox} / TXN_{red}). Abreviaturas de enzimas: γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS), glutatión sintetasa (GS), tripanotión reductasa (TryR), triparedoxina peroxidasa (TXNPx).

Experimentos de suplementación con Cys han demostrado un incremento de hasta cuatro veces la concentración intracelular de $T(SH)_2$ en epimastigotes de *T. cruzi*, lo cual sugiere que la Cys es limitante para la síntesis de $T(SH)_2$ (2), por lo que las enzimas que participan en el suministro de Cys son potenciales blancos farmacéuticos.

Suministro de Cys en *T. cruzi*. El suministro de Cys en *T. cruzi* es posible a través de tres vías (Fig. 2): 1) La Cys extracelular puede ingresar al parásito a través de un transportador membranal (3); 2) *T. cruzi* posee las enzimas para la síntesis de *novo* de Cys, la cual comienza con la conden-

sación de serina (Ser) con el grupo acetilo de la Acetil-CoA, lo que genera O-Acetilserina (OAS) en una reacción catalizada por la serina acetil transferasa (SAT). Finalmente, la OAS sufre un ataque nucleofílico por parte del bisulfuro (SH-) en una reacción catalizada por la cisteína sintasa (CS) (4); 3) La vía de transulfuración inicia con la condensación entre Ser y homocisteína (HCys), produciendo cistationina (Cth) en una reacción catalizada por la cistationina β -sintasa (CBS). Finalmente, la Cth es hidrolizada por la cistationina γ -liasa (CGL) lo que da como producto final a la Cys (5).

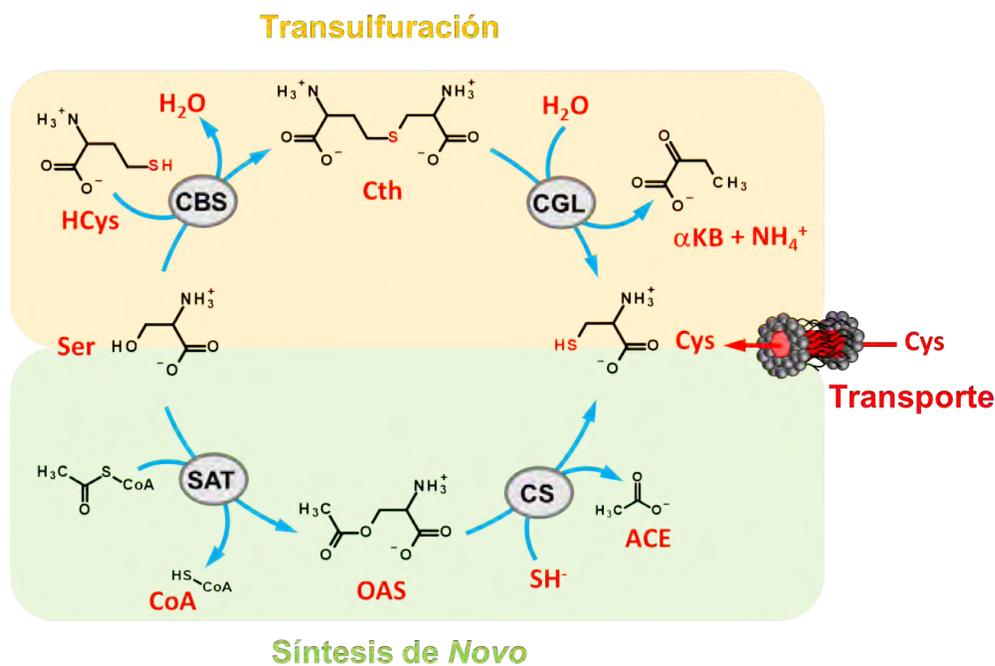


Figura 2. Vías de suministro de Cys en *T. cruzi*. La Cys intracelular de *T. cruzi*, es adquirida a partir de 3 vías. **1) Transporte:** El paso de Cys extracelular al interior de la célula a través de una proteína transmembranal. A partir de Ser en presencia de otras enzimas y metabolitos se da paso a **2) Síntesis de novo:** Con la condensación de Ser por SAT y el ataque nucleofílico de H₂S- a la OAS catalizado por CS. **3) Vía de transulfuración:** Parte de la condensación de Ser y HCys catalizada por CBS produce Cth; finalmente, la hidrólisis de Cth catalizada por CGL

produce Cys. Abreviaturas de sustratos: acetato (ACE), α-cetobutirato (αKB), cistationina (Cth), cisteína (Cys), homocisteína (HCys), O-acetilserina (OAS), serina (Ser). Abreviaturas de enzimas: cistationina β-sintasa (CBS), cistationina γ-liasa (CGL), cisteína sintasa (CS), serina acetil transferasa (SAT).

Estructura de la Cistationina β-sintasa (CBS).

La CBS es la enzima que cataliza la primera reacción de la vía de transulfuración para la síntesis de Cys. La catálisis mediada por CBS es una de las vías que permite la eliminación de homocisteína, aminoácido relacionado con enfermedades cardiovasculares, defectos del tubo neural y la enfermedad de Alzheimer en mamíferos (6). En humanos se encuentra en menor proporción en forma de monómero y homodímero,

mientras que en mayor proporción en forma de tetrámero. La proteína tiene un dominio hemo N-terminal de 70 aminoácidos, un dominio catalítico que se une a piridoxal 5-fosfato (PLP) y un dominio C-terminal que le confiere la unión a un activador alostérico, el AdoMet (6). La CBS de *T. cruzi* se encuentra en forma de homotetrámero con una masa molecular de 155 kDa y no presenta el dominio hemo N-terminal, ni el dominio de unión a AdoMet (4) (Fig. 3).

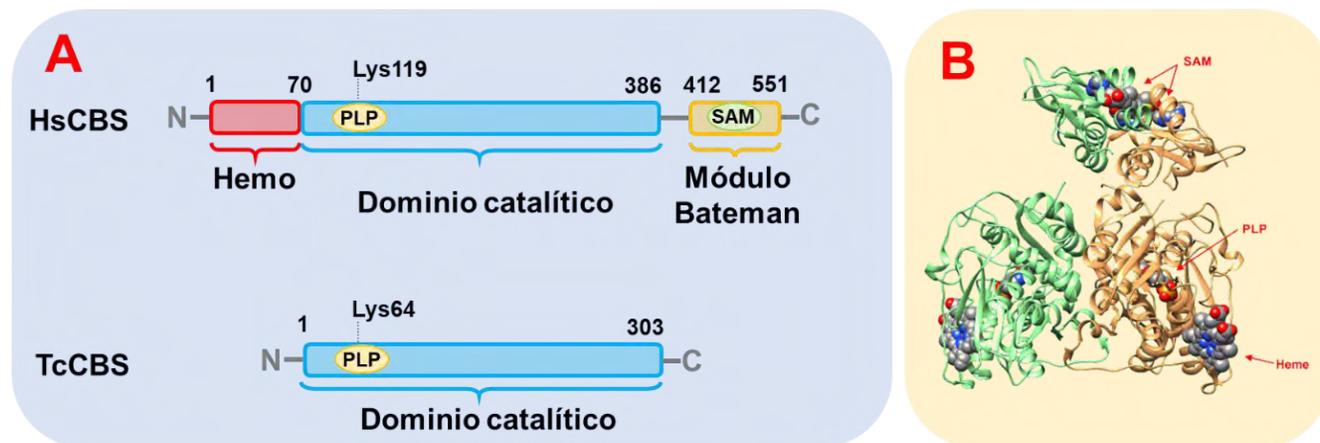


Figura 3. Comparación de la CBS humana (HsCBS) y la CBS de *T. cruzi* (TcCBS). **A)** Estructura básica de la secuencia de aminoácidos de HsCBS y TcCBS. **B)** Estructura tridimensional de HsCBS en su forma dimérica.

Ciclo catalítico de la CBS. La molécula de pirodoxal 5-fosfato (PLP) que contiene CBS forma una aldimina interna con el grupo amino del residuo de lisina (Lys) 119 en la CBS humana y de lisina 64 en *T. cruzi* que se encuentra en el sitio activo de la enzima (4, 6). La aldimina interna de CBS provoca que esta enzima posea un máximo de absorción a 412 nm (6). El ciclo catalítico inicia con la entrada de la Ser en el sitio activo de la CBS, desplazando la unión de PLP con Lys y dan-

do lugar a la formación de una aldimina externa. Posteriormente hay una disociación del grupo que se encuentra en el carbono β del aminoácido, formando un intermediario aminoacrilato. El ciclo continúa con el ataque nucleofílico por parte de la HCys sobre el carbono β del aminoacrilato, lo cual produce Cth formando una aldimina externa que al final del ciclo será desplazada por la Lys de la CBS (Fig. 4) (6).

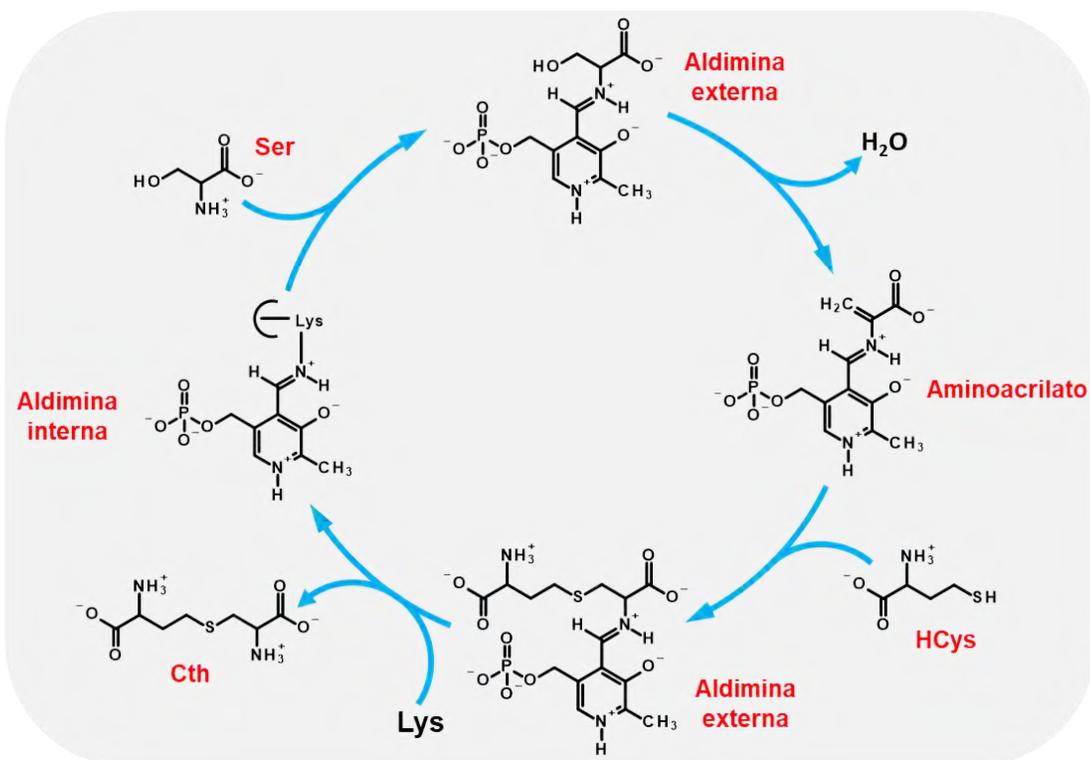


Figura 4. Ciclo catalítico de la CBS. La aldimina interna de la CBS tiene un dominio catalítico en el que el PLP forma una aldimina interna con un residuo de Lys. La unión de la serina (Ser) da lugar a una aldimina externa y al intermediario aminoacrilato. El ataque nucleofílico de la homocisteína (HCys) al carbono β del aminoacrilato produce cistationina (Cth) unida al PLP en forma de aldimina externa que al final del ciclo será desplazada por la Lys de la CBS.

Problema bioquímico

Los datos presentados en la tabla 1 corresponden a la velocidad específica de una preparación de CBS recombinante de *T. cruzi* con una pureza del

90% usando diferentes condiciones de sustratos (Ser y HCys). Utilizando estos datos deduce el mecanismo cinético y estima los parámetros catalíticos de V_m , K_{mSer} , K_{mHCys} y k_{cat} .

Tabla 1. Velocidad específica de la CBS al variar las concentraciones de Ser y HCys.

[Ser] (mM)	V ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)			
	[HCys] 1 mM	[HCys] 2 mM	[HCys] 5 mM	[HCys] 10 mM
0	0.000	0.000	0.000	0.000
0.5	0.156	0.184	0.175	0.198
1	0.260	0.361	0.343	0.434
2	0.310	0.498	0.572	0.624
5	0.420	0.601	0.642	0.802
10	0.333	0.641	0.800	0.934