



11281  
41  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

DISEÑO DE FARMACOS ANTIPARASITARIOS.  
INACTIVACION ALTAMENTE ESPECIFICA DE LA  
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Trypanosoma cruzi*.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
P R E S E N T A :  
ALFREDO TELLEZ VALENCIA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

JUNIO 2003



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.

Este trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Armando Gómez Puyou en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Durante sus estudios de doctorado Alfredo Téllez Valencia recibió una beca de CONACyT con No. de Registro 113401.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Señor, concédeme Serenidad para  
aceptar las cosas que no puedo cambiar,  
Valor para cambiar las que si puedo y  
Sabiduría para distinguir la diferencia.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**A MI ESPOSA CLAUDIA**

**Tantos siglos, tantos mundos,  
tanto espacio .....y coincidir.**

**TE AMO**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

D

**Al Sr. Jaime Téllez, Sra. Gloria Valencia y Cristóbal**

**Al Sr. Manuel Avitia, Sra. Gracia Domínguez, Manuel, Marce y Mario**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

E

## AGRADECIMIENTOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Al Dr. Armando Gómez Puyou por todo su apoyo, sus invaluable consejos y contagiarme su pasión por la ciencia.

A mi comité tutorial:

Dra. Adela Rodríguez Romero

Dr. Ruy Pérez Montfort

A mi jurado de examen:

Dra. Marietta Tuena Sangri Dr. Ruy Pérez Montfort, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Arturo Rojo Domínguez, Dr. Rafael Zubillaga Luna, Dr. Andrés Hernández Arana y Dr. Francisco López Calahorra.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero y la Dra. Alejandra Hernández Santoyo por su valiosa asesoría durante mi etapa de cristalógrafo de proteínas.

Al Dr. Francisco López Calahorra por su valiosa asesoría durante la síntesis de los derivados de benzotiazol.

La Dra. Marietta Tuena, el Dr. Arturo Rojo y el Dr. Miguel Costas por sus comentarios y sugerencias para este trabajo.

Mis compañeros del laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona: Raquel, Leo, Meri, Toni Segade, Toni Sánchez y Albert.

Para el gremio tímologo: Viviana, Bety, Gabriel, Horacio, Gloria, Geo, Alejandro.

Los atpasólogos: Gerardo, Lenin, Cony.

Grandes amigos: Jesús Oria, Leticia Ramírez, Nallely Cabrera, Marcela Varela, María Elena Chánez, Edgar Vázquez, Adelaida Díaz, Gladis Martínez, Adelma Escobar, Cesar, Pablo, David.

De manera muy especial a la Sra. María Elena Orduña.

A mis amigos de toda la vida: Francisco Iturriaga, Adrián Chacón, Arcelia Chacón, Norma Urtiz, Norma Ramírez, José Salas, Ada Sandoval, Francisco Castellanos.

A mis padrinos: Dr. Mario Pedraza y M. en C. Juan Manuel Mendoza.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*No me importa la proteína,  
lo que me interesa es saber la verdad.*

**Dra. Marietta Tuena Sangri**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

G

## ÍNDICE

	Página
RESUMEN.	1
ABSTRACT.	2
ABREVIATURAS.	3
INTRODUCCIÓN.	4
TRIPANOSOMIASIS AMERICANA O "ENFERMEDAD DE CHAGAS".	5
Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	5
Enfermedad de Chagas en México.	6
Fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.	8
LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA COMO BLANCO PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS.	9
Estructura general de la TIM.	11
Catálisis y cambios conformacionales.	13
LA INTERFASE DE ENZIMAS OLIGOMÉRICAS COMO BLANCO PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS.	15
Características de las interfases y su perturbación	16
Interfase de la TcTIM.	17
BENZOTIAZOLES.	19
OBJETIVOS.	21
MATERIAL Y MÉTODOS.	22
RESULTADOS.	30
Compuestos que inactivan a la triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	30
Inactivación de la TcTIM por los benzotiazoles.	30
Efecto de los benzotiazoles en las TIMs de humano, levadura y <i>T. brucei</i> .	33
Efecto de los benzotiazoles a diferentes concentraciones de TcTIM.	35

	Página
La cisteína de interfase de la TcTIM en la inactivación por los benzotiazoles.	35
Efecto de los benzotiazoles en la estructura cuaternaria de la TcTIM y en su contenido de cisteínas.	37
Estructura cristalográfica del complejo formado por la TcTIM y el compuesto 8.	39
Complejo TcTIM-8.	39
Comparación de las estructuras cristalográficas de la TcTIM, TcTIM en hexano y el complejo TcTIM-8.	39
Heteroátomos y sitios de unión del compuesto 8.	42
Efecto de los compuestos análogos al 8 y al 9 en la estabilidad de la TcTIM.	48
DISCUSIÓN.	51
Inactivación de la TcTIM por derivados de benzotiazol.	51
Estructura cristalográfica del complejo TcTIM- 8.	52
Efecto de los derivados de benzotiazol sintetizados.	52
PERSPECTIVAS.	54
REFERENCIAS.	56

I

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

En este trabajo se buscaron moléculas que inactivaran selectivamente la enzima homodimérica triosafosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), el parásito que causa la enfermedad de Chagas. Se encontró que algunos derivados de benzotiazol inactivan la TcTIM. Las moléculas más potentes fueron el 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propansulfonato sódico, el ácido 2-(p-aminofenil)-6-metilbenzotiazol-7-sulfónico, y el 2-(2-(4-aminofenil)benzotiazol)-6-metilbenzotiazol-7-sulfonato sódico, (compuestos **8**, **9** y **10**, respectivamente). La concentración que inactivó al 50% ( $I_{50}$ ) la TcTIM fue de 33  $\mu\text{M}$ , 56  $\mu\text{M}$  y 8  $\mu\text{M}$  para el **8**, **9** y **10**, respectivamente. Las respectivas  $I_{50}$  para la enzima del humano (hTIM) fueron de 422  $\mu\text{M}$ , 3.3 mM y 1.6 mM para el **8**, **9** y **10**. Además, se encontró que el efecto de estos compuestos sobre la TcTIM fue irreversible. Las curvas de inactivación a diferente concentración de **8** y **9** mostraron un perfil sigmoidal con número de Hill ( $n$ ) cercano a 2. Esto indica que la inactivación fue debida a la acción de al menos 2 moléculas de benzotiazol. La curva de inactivación con el **10** que tiene dos moléculas de benzotiazol unidas covalentemente fue hiperbólica, con un valor del Hill cercano a 1. Por lo tanto, parecería que los dos grupos benzotiazol del **10** ocupan simultáneamente los dos sitios de unión en la TcTIM, y se comporta como un agente inactivador de un solo sitio. La inactivación de la TcTIM por los benzotiazoles también fue dependiente del tiempo. Los gráficos de las  $k_{obs}$  a diferente concentración de los compuestos **8**, **9** y **10** no fueron lineales. La forma de las curvas refleja un proceso en el cual la unión inicial del ligando es seguida por la inactivación de la enzima en el complejo enzima-ligando. El efecto de los compuestos a diferente concentración de proteína sugieren que los benzotiazoles actúan sobre la interfase perturbando la asociación de los monómeros. La TcTIM tiene una cisteína en la interfase (Cys15), mientras que la enzima del humano tiene una metionina (Met15). La enzima mutante M15ChTIM fue más sensible a los benzotiazoles que la silvestre. La estructura cristalográfica del complejo TcTIM-**8** mostró la unión de una molécula del **8** en la interfase de la TcTIM. El compuesto se localiza a  $<4$  Å de la Arg71 y la Phe75 del monómero A y la Tyr102 del monómero B. En la estructura cristalográfica el grupo sulfonato del compuesto **8** se orientó hacia el solvente. Esto sugería que posiblemente el sulfonato impedía la penetración del benzotiazol hacia el interior de la interfase. Por lo tanto, se sintetizaron análogos al **8** con diferente grupo funcional en la posición del grupo sulfonato. El efecto de estos compuestos en la TcTIM demostró que el sulfonato es importante en la inactivación por los benzotiazoles. Además, se sintetizaron análogos del compuesto **9** con el grupo sulfonato en diferente posición. Los resultados indicaron que la posición del grupo sulfonato también es importante para la inactivación de la TcTIM. Por lo tanto, los datos en conjunto sugieren que el grupo sulfonato orienta al benzotiazol hacia regiones específicas de la interfase.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ABSTRACT

In this work we searched for molecules that selectively inactivate homodimeric triosephosphate isomerase (TIM) from *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), the parasite that causes Chagas' disease. We found that some benzothiazoles inactivate the enzyme. The most potent were 3-(2-benzothiazolylthio)-1-propanesulfonic acid, sodium salt, 2-(p-aminophenyl)-6-methylbenzothiazole-7-sulfonic acid, and 2-(2-(p-aminophenyl)benzothiazole)-6-methylbenzothiazole sulfonic acid, sodium salt, (compounds **8**, **9** and **10**, respectively). Half maximal inactivation ( $I_{50}$ ) of TcTIM was achieved with 33  $\mu$ M, 56  $\mu$ M and 8  $\mu$ M of **8**, **9** and **10**, respectively. In human TIM (hTIM) the respective  $I_{50}$  were 422  $\mu$ M, 3.3 mM and 1.6 mM. We also found that the effect of these compounds on TcTIM was irreversible. The curves of inactivation versus concentration of **8** and **9** were sigmoidal with Hill number ( $n$ ) in the range of 2. This indicates that inactivation was due to the action of at least two benzothiazole molecules. The inactivation curve with **10** that has two covalently linked benzothiazole molecules was hyperbolic, with a Hill value in the range of 1. Therefore, it seems that the two benzothiazole groups in **10** occupy simultaneously the two sites in TcTIM, and thus behaves as a single-site inactivating agent. Inactivation of TcTIM by benzothiazoles was time dependent. The plots of  $k_{obs}$  at different concentrations of compound **8**, **9** and **10** were not linear. This behavior is indicative of a process in which initial ligand binding is followed by enzyme inactivation in the enzyme-ligand complex. The effect of benzothiazoles with different protein concentrations suggested that benzothiazoles perturb monomer association. TcTIM has a cysteine (Cys15) at the dimer interface, whereas human TIM has a methionine (Met15). M15ChTIM was more sensitive to benzothiazoles than the wild type. The crystallographic structure of TcTIM-**8** complex showed one molecule of **8** at the TcTIM interface. The compound localized at  $<4$  Å from Arg71 and Phe74 of monomer A and Tyr102 of monomer B. In the crystal structure the sulfonate group is solvent exposed. This suggests that the sulfonate group hindered the penetration of benzothiazole into a more internal portion of the interface. Therefore, analogues of **8** with different functional groups at the position of the sulfonate were synthesized. The effect of these compounds on TcTIM showed that sulfonate is important for inactivation by benzothiazoles. Analogues of compound **9** with sulfonate group in different positions were synthesized. The results indicated that the position of the sulfonate is important for TcTIM inactivation. Therefore, the overall data suggest that the sulfonate group orients the benzothiazole groups toward specific regions of the interface.

## ABREVIATURAS

<b>TIM</b>	triosafosfato isomerasa
<b>TbTIM</b>	triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
<b>TcTIM</b>	triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>hTIM</b>	triosafosfato isomerasa de humano
<b>yTIM</b>	triosafosfato isomerasa de levadura
<b><math>\alpha</math>GDH</b>	$\alpha$ -glicerolfosfato deshidrogenasa
<b>DHAP</b>	dihidroxiacetona fosfato
<b>DMF</b>	dimetilformamida
<b>DTNB</b>	ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzónico)
<b>EDTA</b>	ácido etilendiamintetracético
<b>EM</b>	espectrometría de masas
<b>GAP</b>	gliceraldehido-3-fosfato
<b>HEPES</b>	ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etano sulfónico
<b>IR</b>	espectroscopia de infrarojo
<b>NADH</b>	dinucleotido de nicotinamina adenina reducido
<b>PEG</b>	polietilenglicol
<b>RMN <math>H^1</math></b>	resonancia magnética nuclear de protón
<b>RMN <math>C^{13}</math></b>	resonancia magnética nuclear de carbono
<b>SDS</b>	dodecilsulfato de sodio
<b>THF</b>	tetrahidrofurano
<b>TNB</b>	ácido 5-tio-2-nitrobenzónico

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias se encuentran entre las enfermedades más comunes del ser humano. Se calcula que unos 350 millones de personas padecen infecciones por parásitos protozoarios. Los parásitos también infectan al ganado y ejercen un fuerte impacto económico en diferentes partes del mundo. En muchas de las parasitosis la batería actual de antiparasitarios no es efectiva. Además, empiezan a aparecer cepas de parásitos que son resistentes a fármacos previamente exitosos, por ejemplo la resistencia a cloroquina en la malaria. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos fármacos en contra de enfermedades causadas por parásitos es imperativo.

El desarrollo de nuevos fármacos para tratar una enfermedad puede dividirse en los siguientes pasos: 1) Identificación del blanco; en esta tesis, blanco se refiere a una enzima que es fundamental en la vida del parásito. 2) Validación del blanco; dado que el desarrollo de inhibidores específicos de una enzima es un proceso difícil y costoso, es necesario conocer si la enzima sobre la que se va a trabajar es realmente necesaria para la vida del parásito que se desea atacar. 3) Obtención de inhibidores o agentes inactivantes que sirvan como molécula guía para el desarrollo de compuestos con potencial farmacológico.

En esta tesis se describe el trabajo que se realizó para obtener moléculas que inactiven específicamente a la triosafosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), el agente causal de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. Por lo tanto, se considera apropiado describir brevemente la enfermedad y el ciclo de vida del parásito. A continuación se revisarán la estructura y las características funcionales de la TIM. También se describirá por qué consideramos a esta enzima como un buen blanco para el diseño de inhibidores con capacidad potencial para convertirse en fármacos.

## **TRIPANOSOMIASIS AMERICANA O “ENFERMEDAD DE CHAGAS”**

*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas. Ésta es endémica en América Latina. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente 18 millones de personas padecen tripanosomiasis americana; se calcula que cada año mueren 21,000 personas y aparecen 300,000 nuevos casos. Además, alrededor de 120 millones se encuentran en riesgo de contagio (WHO, 2002). La enfermedad es transmitida por chinches triatóminas, aunque existen reportes de infección como resultado de transfusiones sanguíneas, transmisión congénita, trasplante de órganos e inoculación accidental. Algunos animales domésticos, roedores y algunas especies silvestres sirven como reservorios. La tripanosomiasis tiene tres fases definidas: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda se caracteriza por síntomas tales como dolor de cabeza, fiebre, anemia y malestar general. En muchos casos la infección tiene una fase indeterminada durante la cual no se presentan síntomas; esta puede durar varios años o el resto de la vida del paciente. Alrededor del 30% de los infectados desarrollan una forma crónica progresiva asociada con miocarditis y/o megacolon en el sistema digestivo. En el estado crónico, la enfermedad es incurable.

### **Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

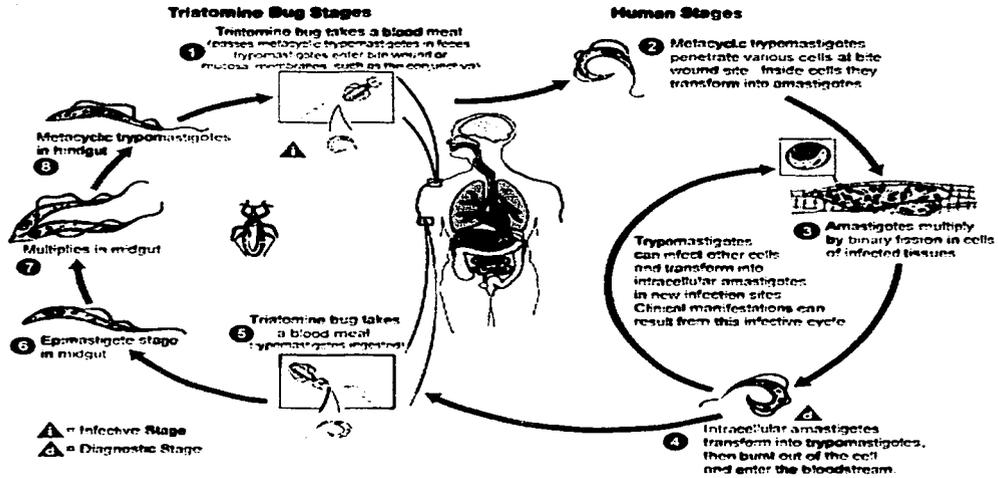
En el diseño de fármacos antiparasitarios es necesario conocer el ciclo de vida del parásito que se desea combatir. Esto es importante ya que los parásitos en cada uno de sus estadios tienen morfologías características y vías metabólicas particulares. Por lo tanto, el conocimiento de los requerimientos del parásito y sus rutas metabólicas son necesarios para elegir con mayor precisión la enzima blanco.

El ciclo de vida de *T. cruzi* tiene tres estados morfológicos muy bien definidos; epimastigote, amastigote y tripomastigote. Cuando una chinche infestada se alimenta con la sangre del hospedero, deposita sobre la piel del

humano tripanosomas metacíclicos que van en las heces del triatómino. Después de atravesar la piel a través de una herida, raspadura o mucosa, el tripomastigote llega a la sangre del hospedero. Posteriormente invade las células. Una vez dentro de la célula, los tripomastigotes se transforman en amastigotes; éstos son la forma reproductiva del parásito. Su reproducción es por fisión binaria y ésta continúa hasta que la célula es destruida y los parásitos se liberan como tripomastigotes. Estos invaden las células vecinas y también permanecen en el torrente sanguíneo de donde pueden ser ingeridos por otras chinches triatóminas. En el intestino del insecto, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes y se dividen por fisión binaria. Los parásitos migran hacia el intestino posterior y se transforman en la forma tripomastigote metacíclica (Tyler *et al.*, 2001). El ciclo continúa cuando la chinche se alimenta con la sangre de un futuro hospedero (Fig. 1).

#### **Enfermedad de Chagas en México**

La encuesta seroepidemiológica llevada a cabo entre 1987 y 1989 con aproximadamente 70,000 individuos de todos los estados del país (Velasco-Castrejón *et al.*, 1992) mostró que la seroprevalencia nacional de anticuerpos anti-*T. cruzi* fue de 1.6%. Con estos datos, se calculó el número de individuos infectados con *T. cruzi* en México (Tabla 1). Estos estudios han servido para que se apruebe el análisis serológico en los donadores de sangre, programas para el control del vector y estudios sobre la virulencia de las cepas mexicanas de *T. cruzi*. Se espera que estas medidas ayuden al control de la enfermedad de Chagas en México (Guzmán-Bracho, 2001).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de la página del Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas, División de Enfermedades Parasitarias ([www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm)).**

**Tabla 1. Población estimada en riesgo de infección por *Trypanosoma cruzi* en México. Tomado de Guzmán-Bracho, 2001.**

	Población estimada en México en el 2000 <sup>a</sup> (x 10 <sup>6</sup> )	Número estimado de individuos infectados (x 10 <sup>3</sup> )	Prevalencia de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i> <sup>b</sup> (%)
Población total	97.4	1564.8	1.6
Total de hombres	47.4	758.4	1.6
Total de mujeres	50.2	750.0	1.5
Población Urbana	72.7	1235.9	1.7
Población Rural	24.7	370.5	1.5
Niños (< 5 años)	11.1 <sup>c</sup>	155.4	1.4
Niños (5-14 años)	21.7 <sup>c</sup>	238.7	1.1
Mujeres (15-45 años)	22.6 <sup>c</sup>	316.4	1.4
Individuos (15-59 años)	42.9 <sup>c</sup>	986.7	2.3
Individuos (> 60 años)	5.6 <sup>c</sup>	128.8	2.3
Donadores de sangre	1.2	18.0	1.5

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Geografía e Informática. Censo Nacional de Población y Vivienda 2000.

<sup>b</sup> Velasco-Castrejón *et al.*, 1992; Guzmán-Bracho, *et al.*, 1998.

<sup>c</sup> Secretaría de Salud (1998) *Estadísticas vitales. Dirección General de Estadística e Informática.*

### Fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas

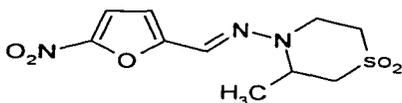
Desde 1978 el nifurtimox y el benznidazol (Fig. 2) se han utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, el nifurtimox ya no se produce. Ambas drogas son activas contra los tripomastigotes y amastigotes, y sólo son útiles en la fase aguda, que es la primera etapa de la enfermedad. En esta etapa la sintomatología es vaga y general a otras enfermedades, aunque en muchas ocasiones se presenta el llamado signo de Romaña.

El nifurtimox se absorbe después de la administración oral y se metaboliza rápidamente. Su mecanismo de acción no es muy claro, pero en cultivos de *T. cruzi* induce un incremento en la velocidad de respiración y la liberación de peróxido de hidrógeno (Docampo *et al.*, 1979, 1981). Esto se ha relacionado con la falta de catalasa en el parásito; varios investigadores piensan que en ausencia de

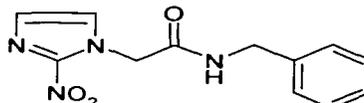
catalasa, *T. cruzi* caerá en un estado de estrés oxidativo que puede causar su muerte. El benznidazol, igual que el nifurtimox después de ser absorbido, se distribuye a los tejidos. Se han reportado efectos sinérgicos del benznidazol con otros agentes quimioterapéuticos (Araujo *et al.*, 2000). Tanto el benznidazol como el nifurtimox producen anorexia, efectos tóxicos neurológicos, debilidad, pérdida de peso, vómito, pérdida de la memoria y depresión de la médula ósea (Cerecetto *et al.*, 2002).

Es pertinente añadir que el violeta de genciana se utiliza en los bancos de sangre para eliminar los tripomastigotes (Cerecetto *et al.*, 2002).

Dado lo limitado de la farmacología para la enfermedad de Chagas es claro que además de las medidas de control existe una necesidad urgente de nuevos fármacos.



Nifurtimox



Benznidazol

**Figura 2.** Estructura de los dos fármacos utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

## LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA COMO BLANCO PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS

En términos generales varios grupos de investigadores consideran a las enzimas de la glicólisis anaeróbica como buenos blancos para el diseño de fármacos en contra de parásitos tripanosomátidos. Esto es particularmente cierto para *Trypanosoma brucei*, ya que en su etapa infectiva, estos organismos carecen de mitocondrias funcionales. Respecto a la glicólisis anaeróbica, es importante

recordar que en los tripanosomas las 7 primeras enzimas de la ruta se encuentran localizadas en un organelo, aparentemente único en los tripanosomátidos, que se ha llamado glicosoma. La Figura 3 muestra la localización de las enzimas de la glicólisis anaeróbica en *T. brucei*. En *T. cruzi* la distribución de las enzimas es similar. Además, varios de los mecanismos de regulación no son operantes en las enzimas de los tripanosomas debido a que las enzimas de este organismo tienen características estructurales y/o cinéticas distintas a las de los mamíferos.

Varios investigadores han propuesto a la TIM como blanco para el diseño de fármacos contra los tripanosomátidos (Noble *et al.*, 1991; Gómez-Puyou *et al.*, 1995; Velanker *et al.*, 1997). En relación a la TIM, los estudios de flujo metabólico de la glucólisis en el tripanosoma y en glicosomas muestran que la TIM no es un punto de control en el flujo de la ruta (Bakker *et al.*, 1999), y por tanto no sería un buen blanco. En contraste con la conclusión de estos autores, se observó que la TIM es esencial para la supervivencia de la forma sanguínea del tripanosoma (Helfert *et al.*, 2001). También Helfert y colaboradores (2001) encontraron que con menos del 15% de la actividad de los controles, los tripanosomas no sobreviven. Los autores ofrecen dos posibles explicaciones de por qué la TIM es esencial para el parásito. Mediante un modelo computacional del flujo metabólico se predice que en ausencia de la TIM, los tripanosomas en su fase infectiva no producen suficiente ATP. Esto podría ser mortal para el tripanosoma. Por otra parte, a concentraciones bajas de TIM se acumula dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en el glicosoma, que inhibe la aldolasa (Fig. 3). Además, la DHAP se puede convertir espontáneamente a metilglioxal, que es tóxico para el parásito.

En este contexto es apropiado recordar que se han descrito casos de enfermos que se deben a alteraciones en la función de la TIM. Los estudios de éstos muestran que su deficiencia aumenta los niveles de DHAP, causando anemia hemolítica crónica, crecimiento retardado, incremento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas y trastornos neuromusculares (Maquat *et al.*, 1985). Solo pocos de ellos llegan a la edad adulta. Los estudios sobre la TIM

de estos enfermos muestran que la causa es la mutación del ácido glutámico 104 a aspártico. También es de interés para nuestro trabajo (ver abajo) que esta mutación disminuye la estabilidad de la enzima (Daar *et al.*, 1986; Repiso *et al.*, 2002).

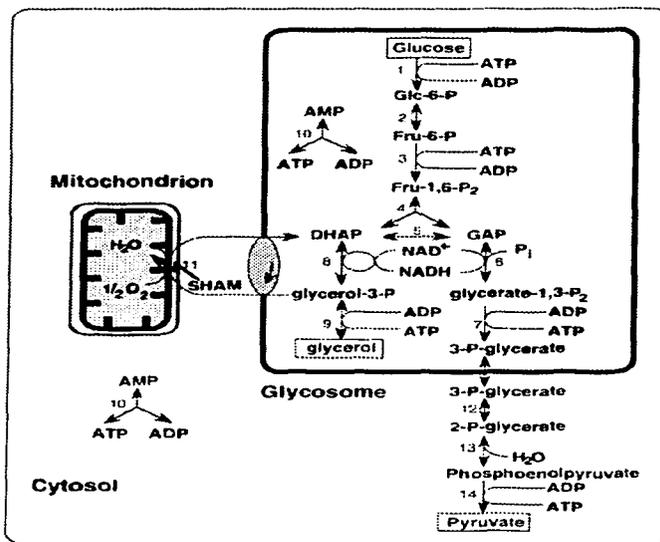
### Estructura general de la TIM

La TIM es una enzima homodimérica de la vía glucolítica (Fig. 3). Cada monómero está formado por unos 250 residuos de aminoácidos. La TIM cataliza la interconversión entre el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona fosfato. Se conoce la secuencia de aminoácidos de la TIM de aproximadamente 180 especies y la estructura tridimensional de la TIM de pollo (Banner *et al.*, 1975), levadura (Lolis *et al.*, 1990), *Trypanosoma brucei* (Wierenga *et al.*, 1991), *Escherichia coli* (Noble *et al.*, 1993), humano (Mande *et al.*, 1994), *Bacillus stearothermophilus* (Delboni *et al.*, 1995), *Plasmodium falciparum* (Velanker *et al.*, 1997), *Vibrio marinus* (Alvarez *et al.*, 1998), *Trypanosoma cruzi* (Maldonado *et al.*, 1998), *Leishmania mexicana* (Williams *et al.*, 1999), *Thermotoga maritima* (Maes *et al.*, 1999), *Pyrococcus woesei* (Walden *et al.*, 2001), *Entamoeba histolytica* (Rodríguez-Romero *et al.*, 2002) y *Caenorhabditis elegans* (Symersky *et al.*, 2003).

Excepto por la TIM de *Methanothermus fervidus* (Kohlhoff *et al.*, 1996), y *Pyrococcus woesei* (Walden *et al.*, 2001) que son tetrámeros y de *Thermotoga maritima* que es un dímero fusionado con la fosfoglicerato cinasa (Maes *et al.*, 1999), todas las demás TIMs son homodímeros. Cada subunidad se compone de 8 hebras  $\beta$ -plegadas y 8  $\alpha$ -hélices intercaladas; las hebras y las hélices están unidas por giros o asas (Fig. 4). A esta enzima se le considera el prototipo de la familia de proteínas con estructura de barril ( $\alpha$ - $\beta$ )<sub>8</sub>.

La interfase entre los dos monómeros es relativamente grande, aproximadamente 1400 Å<sup>2</sup>. Está formada principalmente por el asa 3. Para este trabajo es importante señalar que en la TIM de humano, el asa 3 tiene un residuo más que la de TcTIM. En ambos casos, sin embargo, el asa de una subunidad se internaliza en la otra y rodea la cadena lateral del residuo en la posición 15 de la

otra subunidad. Además, en la TcTIM el residuo 15 es una cisteína (Cys15), mientras que en la TIM del humano este residuo es una metionina (Met15).



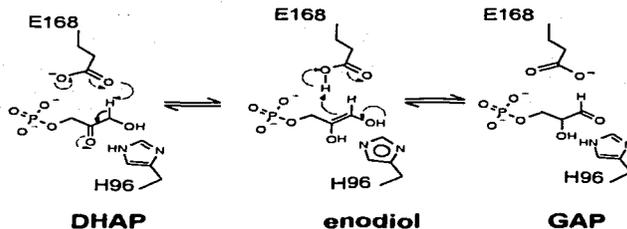
**Figura 3. Organización de las enzimas glicolíticas en el tripanosoma. 1.** Hexocinasa, **2.** Hexosa fosfato isomerasa, **3.** Fosfofructocinasa, **4.** Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa **5.** Triosafosfato isomerasa **6.** Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, **7.** Fosfoglicerato cinasa, **8.** Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, **9.** Glicerol cinasa, **10.** Adenilato cinasa, **11.** Glicerol-3-fosfato cinasa, **12.** Fosfoglicerato mutasa, **13.** Enolasa, **14.** Piruvato cinasa, **SHAM** ácido salicilhidroxámico. Tomado de Opperdoes et al., 2001. Es necesario recordar que en su etapa infectiva *T. brucei* carece de mitocondrias funcionales. Es importante mencionar que es muy probable que la TIM en *T. cruzi* se distribuya tanto en el citosol como en el glicosoma (datos no publicados).



**Figura 4. Estructura de la triosa fosfato isomerasa.** Los monómeros A y B se muestran en color azul marino y azul claro respectivamente. La Cys15 del monómero A se muestra en naranja y el asa 3 del monómero B en amarillo. Se muestran los residuos catalíticos del monómero A.

#### **Catálisis y cambios conformacionales**

El mecanismo por el cual la TIM cataliza la interconversión entre gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y la DHAP (Fig. 5) se ha establecido mediante técnicas bioquímicas (Albery *et al.*, 1976; Knowles 1991), cristalografía de proteínas (Lolis *et al.*, 1990; Davenport *et al.*, 1991; Parthasarathy *et al.*, 2002; Jogi *et al.*, 2003; Kursula *et al.*, 2003), resonancia magnética nuclear (Harris *et al.*, 1998) y mecánica cuántica (Marín-Sanguino *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Alagona *et al.*, 2003).



**Figura 5. Mecanismo de reacción de la triosafosfato isomerasa.**

En la reacción de isomerización no enzimática con bases orgánicas como catalizadores, se demostró que la eliminación de un protón del sustrato forma un intermediario enodiolato. La formación de este intermediario conduce a una reacción de  $\omega$ -eliminación en la cual se forma metilglioxal y fosfato inorgánico. En el caso de la reacción enzimática, la TIM cataliza la isomerización de un intermediario enodiol, en un proceso en que la producción de metilglioxal es muy limitada. El metilglioxal que se logra producir está a una concentración inferior a sus niveles tóxicos (Lolis *et al.*, 1990). Los valores de la eficiencia catalítica para las reacciones de isomerización y eliminación son de  $10^6$  a  $10^9$   $M^{-1} s^{-1}$  y 2 a  $14 M^{-1} s^{-1}$ , respectivamente (Sun *et al.*, 1999). Como la reacción enzimática es de  $10^9$  a  $10^{10}$  veces más rápida que la reacción no catalizada (Richard, 1984) y su velocidad catalítica esta limitada por difusión, a la TIM se le considera un catalizador perfecto (Albery *et al.*, 1976; Knowles, 1991).

Tres son los residuos que participan directamente en la reacción de isomerización. Siguiendo la numeración de la TIM de *T. cruzi* (TcTIM) éstos son el Glu168, His96 y Lys14. En el sentido de DHAP a GAP, el carboxilato del Glu168 actúa como base, sustrayendo un protón del sustrato. El anillo imidazol de la His96, actúa como electrófilo polarizando el grupo carbonilo del sustrato, dando lugar a la reacción de enolización. La Lys14 es el residuo que confiere la especificidad por el sustrato (Schliebs *et al.*, 1996; Wierenga *et al.*, 1992).

El asa 6, conocida como asa catalítica (residuos 171-178), sufre un desplazamiento de 7Å y cubre el ligando unido al sitio catalítico (Mande *et al.*, 1994). Este movimiento se produce por cambios en el ángulo de torsión de la cadena primaria de algunos residuos que funcionan como "bisagra" (Sun *et al.*, 1998). Se sabe que dicho desplazamiento aísla el sitio activo del disolvente, y ayuda a establecer un puente de hidrógeno entre la Gly172 y el grupo fosfato del enodiol. Esto favorece la transformación eficiente del sustrato provocando una disminución de la reacción de eliminación del grupo fosfato del intermediario, previniendo así la formación de metilglioxal (Pompliano *et al.*, 1990; Joseph *et al.*, 1990; Richard 1984, 1991; Knowles 1991).

## LA INTERFASE DE ENZIMAS OLIGOMÉRICAS COMO BLANCO PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS

Si se acepta que la TIM puede ser un buen blanco para el desarrollo de moléculas que interfieran con su función, es necesario entonces determinar el sitio sobre el cual se va a diseñar una molécula inhibitoria o desestabilizante de su estructura. Muchos de los intentos por inhibir la función biológica de las proteínas por agentes químicos se han enfocado al desarrollo de moléculas que actúen a nivel del sitio catalítico de las enzimas, o en los sitios de unión para los agonistas o antagonistas en los receptores. Ambos criterios se han utilizado cuando el interés es encontrar agentes con potencial uso terapéutico contra parásitos. Sin embargo, se sabe que los sitios catalíticos son ampliamente conservados. Por lo tanto, puede ser que las diferencias entre los sitios activos de enzimas homólogas sean pequeñas o irrelevantes. Estas observaciones indican que no todas las enzimas de los parásitos pueden ser buenos candidatos para diseñar moléculas dirigidas al sitio catalítico (Pérez-Montfort *et al.*, 2002).

Es entonces necesario buscar si otros sitios de las enzimas se pueden utilizar en la búsqueda de moléculas que perturben su función. En este punto se recuerda que la TIM sólo es activa en su forma dimérica (Waley, 1973; Zabori *et*

*al.*, 1980). Por lo tanto, la perturbación de la asociación entre sus monómeros por una molécula pequeña debe acabar con su función catalítica. A continuación se hace una breve descripción de las interfases en general, y de los agentes que se ha visto perturban la asociación entre proteínas. Después se verá con más detalle la interfase de la TcTIM.

### **Características de las interfases y su perturbación**

La mayoría de las proteínas que existen en los organismos vivos son oligoméricas y sus interfases han sido objeto de múltiples estudios (Grishin *et al.*, 1994; Valdar *et al.*, 2001; Nooren *et al.*, 2003). En vista de esta preferencia y dado que las interacciones proteína-proteína son necesarias para la función y regulación de muchas de ellas, se han hecho estudios para saber si existe una regla general para su asociación. Hace varios años se propuso que las interacciones proteína-proteína estaban relacionadas con el área hidrofóbica oculta (Chotia *et al.*, 1975). Más tarde se observó que los porcentajes de residuos polares y no polares en las interfases de muchas proteínas son más o menos constantes (Janin *et al.*, 1988). En años más recientes se encontró que las interfases son ricas en residuos cargados y polares (Tsai *et al.*, 1997). De estos y otros trabajos (Larsen *et al.*, 1998) se puede concluir que no existe una regla general para la distribución de residuos particulares en la interfase.

En algunos estudios sobre la contribución de distintos residuos a la estabilidad entre dos proteínas, se encontró que a pesar del gran número de contactos entre los residuos de una proteína y otra, sólo unos cuantos contribuyen de manera predominante a la energía libre de unión entre las dos (Claxton *et al.*, 1995). A estos residuos se les ha llamado "puntos calientes" (Bogan *et al.*, 1998). No obstante, existen datos que indican que en algunos oligómeros no hay residuos que sean particularmente importantes para la asociación de los monómeros. En estas proteínas la energía de interacción se debe a la suma de todas las interacciones que se establecen entre los residuos de la interfase (Myers *et al.*, 2001).

En vista de las numerosas interacciones proteína-proteína que existen en los organismos vivos (Uetz *et al.*, 2000; Schwikowski *et al.*, 2000), varios grupos han contemplado la opción de utilizar como blanco las interfases proteína-proteína para la inhibición de las enzimas y por consiguiente de las funciones celulares. Bajo este enfoque se ha tratado de encontrar agentes que prevengan o induzcan la asociación de proteínas que inicien o estén involucradas en las vías de transducción de señales. De igual forma se han tratado de encontrar moléculas que perturben la asociación de monómeros en enzimas que sólo son activas en estado oligomérico.

En algunos estudios se buscaron moléculas pequeñas (péptidos imitadores o miméticos) que reproduzcan las interacciones de una proteína con otra. Se ha tenido éxito con la proteasa del VIH (Zutshi *et al.*, 1997), la ribonucleótido reductasa del virus *Herpes simplex* (Liuzzi *et al.*, 1994) y la DNA polimerasa HSV (Digard *et al.*, 1995). También se ha interferido exitosamente con los contactos proteína-proteína por medio de moléculas no peptídicas. Dos de estos ejemplos son la sintetasa del óxido nítrico (McMillan *et al.*, 2000) y la transtirretina (Peterson *et al.*, 1998). Todos estos datos apoyan la idea de que es posible interferir en la asociación entre los monómeros de proteínas oligoméricas.

### **Interfase de la TcTIM**

La importancia de la interfase en la estabilidad y catálisis de la TIM, se ha estudiado en la enzimas de *T. brucei*, humano y en la TcTIM. Los resultados mostraron que la sustitución del residuo en la posición 15 por otros residuos, causa cambios estructurales muy drásticos y pérdida total de la actividad catalítica (Gómez-Puyou *et al.*, 1995; Hernández-Alcantara *et al.*, 2002). Además, se ha descrito que la modificación de los residuos del asa 3 genera enzimas con constantes de asociación bajas (Schliebs *et al.*, 1997; Mainfroid *et al.*, 1996). Este mismo fenómeno se observa cuando la Cys15 se modifica químicamente (Gómez-Puyou *et al.*, 1995; Garza-Ramos *et al.*, 1996; Rodríguez-Romero *et al.*,

2002; Maithal *et al.*, 2002). También es de interés que un péptido con la secuencia de aminoácidos del asa 3 en la TIM de *Plasmodium falciparum* causa la inactivación de la enzima (Singh *et al.*, 2001). Por otro lado, existen datos que indican que esta porción de la interfase juega un papel dinámico en la catálisis enzimática (Pérez-Montfort *et al.*, 1999).

Los datos anteriores sugieren que esta región en la TcTIM es fundamental para mantener la integridad del dímero, y que ésta puede ser un blanco para perturbar su función. En este sentido, una observación alentadora y útil la hizo Gao y colaboradores (1999). Los autores determinaron la estructura cristalográfica de un cristal de TcTIM "remojado" en hexano y observaron que una de las moléculas de hexano se unió en la superficie de la proteína, y otras dos en la interfase. Estas dos últimas moléculas están en contacto con residuos del asa 3 y cerca de la Cys15 (Fig. 6). Esto indica que la TcTIM tiene en la interfase, sitios de unión para moléculas hidrofóbicas. De acuerdo con Ringe y Mattos (Ringe, 1995; Mattos *et al.*, 1996) un sitio con la capacidad de unir moléculas hidrofóbicas es un sitio potencial para el diseño de fármacos.

Como se discutirá en la sección de resultados, logramos encontrar moléculas que se unen a ese sitio, y afectan la estabilidad de la TcTIM. Estas moléculas contienen el núcleo benzotiazol. Por lo tanto, se hace una pequeña revisión sobre los benzotiazoles.



**Figura 6. Estructura cristalográfica de la TcTIM en hexano. Las moléculas de hexano se muestran en rojo y la Cys15 de cada monómero se muestra en naranja.**

## **BENZOTIAZOLES**

Los benzotiazoles se encuentran naturalmente en algunos organismos. Forman parte de la estructura de la luciferina de la luciérnaga. Además, el benzotiazol y el 2-metilbenzotiazol son conocidos como constituyentes del aroma de las hojas del té (Vitzthum *et al.*, 1975) y el 2-mercaptobenzotiazol en arándanos (Anjou *et al.*, 1967). El benzotiazol también se encuentra en los hongos *Polyporus frondosus* y *Aspergillus clavatus* (Seifert *et al.*, 1982; Gallois *et al.*, 1990). El 2-hidroxi-, 2-mercapto-, y 2- metilbenzotiazol, así como la 6-hidroxi-3-metil-2-benzotiazolona son productos de fermentación en extractos de un simbiote del género *Micrococcus* de la esponja *Tedania ignis* (Stierle *et al.*, 1991).

El benzotiazol y sus derivados se fabrican en todo el mundo debido a sus múltiples aplicaciones. Pueden actuar como fungicidas y herbicidas (De Wever *et al.*, 1997). También se aplican como inhibidores de la corrosión por el agua en la refrigeración y en los anticongelantes para automóvil (Brownlee *et al.*, 1992). Uno de sus usos principales es acelerar la vulcanización en la producción de caucho, catalizando la formación de puentes disulfuro entre los polímeros elastoméricos con la finalidad de obtener un material entrecruzado flexible y elástico (De Wever *et al.*, 1997).

Con fines terapéuticos, los derivados de benzotiazol se han propuesto como posibles agentes para el tratamiento de la diabetes, vía la inhibición de la aldolasa reductasa (Aotsuka *et al.*, 1997). También se han descrito algunos derivados del benzotiazol que actúan como antagonistas del receptor B2 de bradiquinina (Heitsch *et al.*, 1999). Así mismo, se ha propuesto que algunos derivados del benzotiazol pueden actuar como inhibidores de la agregación de la poliglutamina en la enfermedad de Huntington (Heiser *et al.*, 2002). En la búsqueda de agentes antitumorales se encontró un derivado de benzotiazol que está en la primera fase de evaluación clínica (Hutchinson *et al.*, 2002).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## OBJETIVOS

1. Encontrar, por selección al azar o síntesis, moléculas que desestabilicen a la TcTIM. Estas moléculas deben unirse a la interfase y perturbar las interacciones entre los monómeros de la enzima; su unión debe desestabilizar la estructura de la TIM de *T. cruzi*, y provocar su inactivación. Finalmente y en relación a la enzima de los humanos, las moléculas deben ser altamente selectivas para la TcTIM.

2. Determinar la estructura cristalográfica del complejo TcTIM-molécula desestabilizante.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Enzimas.** Todas las TIMs utilizadas en este estudio fueron recombinantes. Se purificaron a homogeneidad mediante las técnicas reportadas. Para la purificación de la TcTIM, la TIM de humano (hTIM), la TIM de *T. brucei* (TbTIM) y la TIM de levadura (yTIM) se utilizaron las metodologías descritas por los autores en las referencias respectivas (Ostoa-Saloma *et al*, 1997; Mande *et al*, 1994; Borchert *et al*, 1993; Vázquez-Contreras *et al.*, 2000). La mutante M15C de la hTIM (Ávila-Ríos, 2001) se preparó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el "Expand High Fidelity PCR System" (Boehringer). Los oligonucleótidos mutagénicos fueron, el directo 5'-ACTGGAAGTGCAACGGGCGGAAGC-3' y el reverso 5'-GCTTCCGCCCGTTGCACTTCCAGT-3'. El producto de PCR se ligó al vector pCR2.1 (Invitrogen) y se secuenció. Una vez que se obtuvo el gen con la mutación deseada, se subclonó en el plásmido pET3a y se introdujo por transformación en las células BL21(DE3)pLysS (Novagen). La purificación de la enzima se realizó de igual forma que para la silvestre (Mande *et al*, 1994).

**Actividad.** La actividad de la TcTIM se midió con un sistema acoplado utilizando  $\alpha$ -glicerol fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ GDH), en la dirección de GAP a DHAP a 25 °C en 1 ml de medio a pH 7.4, que contenía 100 mM de trietanolamina, 10 mM de ácido etilendiamintetracético (EDTA), 0.2 mM de NADH, 0.9 unidades de  $\alpha$ GDH, y 1 mM de GAP. La reacción se inició con la TcTIM, generalmente 5 ng. La  $\alpha$ GDH reduce la DHAP producida por la TcTIM a glicerol-3-fosfato utilizando NADH que se oxida a NAD<sup>+</sup>. El NADH absorbe a 340 nm, el decremento en absorbencia a 340 nm respecto al tiempo se utilizó para calcular la actividad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Ensayos de inactivación.** Las enzimas se incubaron a una concentración de 5 µg/ml en trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4 y la concentración indicada de los compuestos. La incubación se llevó a cabo a 36 °C por 2 horas. Al término, se tomó una alícuota de 1 µL para medir su actividad. Antes de realizar el experimento se confirmó que los compuestos no afectarían la actividad de la enzima acoplante αGDH; estas medidas mostraron que a las concentraciones ensayadas, los compuestos no afectan la actividad de la αGDH.

La concentración que inactiva al 50% la TcTIM se calculó mediante el ajuste de las curvas de inactivación de cada compuesto a la siguiente ecuación (Tovar-Méndez *et al*, 2000):

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

donde  $V_i$  indica la actividad a la concentración dada del compuesto,  $V_o$  es la actividad inicial,  $I_{50}$  la concentración del compuesto que induce el 50% de inactivación,  $I$  la concentración del compuesto ensayado, y  $n$  es el número de Hill.

**Determinación del número de cisteínas.** La TcTIM a 67 µg/mL se mezcló con dodecil sulfato de sodio (SDS, 1% concentración final) y se transfirió a una celda de espectrofotómetro. Después de registrar la absorbencia basal a 412 nm por 1 min, se le adicionó ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzónico) (DTNB) a una concentración final de 1 mM y se registró el aumento de la absorbencia hasta que se alcanzó un nivel constante. La absorbencia del DTNB (en ausencia de enzima) se restó de la absorbencia en presencia de ésta. De la diferencia, se calculó el número total de cisteínas por dímero utilizando el coeficiente de absorbencia del ácido 5-tio-2-nitrobenzónico (TNB), 13600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Ellman, 1958).

## **Obtención del complejo cristalográfico de la TcTIM y el compuesto 8.**

La obtención y resolución de la estructura cristalográfica del complejo entre la TcTIM y el compuesto 8 se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Adela Rodríguez Romero y la Dra. Alejandra Hernández Santoyo.

**Condiciones de cristalización.** Se obtuvieron cristales del complejo TcTIM-8 por cocrystalización mediante la técnica de la gota colgante. Se crecieron a 18 °C mezclando 4 µL de TcTIM (9.8 mg/mL en trietanolamina 25 mM pH 8), 1 µL del compuesto 8 (2 mM en trietanolamina 25 mM pH 8) y 5 µL de la solución cristalizante (2% PEG 400, 0.1 M HEPES pH 7.5, 2.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Los cristales aparecieron a los 15 días después de preparar las pruebas de cristalización.

**Colección y procesamiento de datos.** Los datos se colectaron de un monocristal a -165 °C utilizando glicerol al 30% como agente crioprotector, en un generador de rayos-x de ánodo rotatorio RIGAKU con un detector de placa R-AXIS IIC. La reducción de los datos se llevó a cabo con DENZO (Otwinowski *et al.*, 1997) y el escalamiento con los programas de CCP4 (Colaborative Computational Project, Number 4, 1994).

**Resolución de la estructura y afinamiento.** El reemplazo molecular se realizó con CNS 1.0 (Brünger *et al.*, 1998) teniendo como modelo inicial la estructura de la TcTIM nativa (PDB ID 1tcd, Maldonado *et al.*, 1998); 10% de las reflexiones se seleccionaron al azar y se utilizaron para la validación del modelo durante el afinamiento (Brünger, 1992). La construcción del modelo, las correcciones, así como la de los mapas de diferencia 2Fo-Fc y Fo-Fc se llevaron a cabo en QUANTA 98 (Accelrys). En la parte final del afinamiento se adicionaron moléculas de agua mediante un procedimiento de búsqueda con base en la intensidad de los picos en los mapas de diferencia y con el criterio de longitud de enlace. La estereoquímica del modelo fue analizada con PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Compuestos químicos ensayados en la inactivación de la TcTIM**

**Compuestos comerciales.** Los diferentes benzotiazoles que se ensayaron en la Tabla 2 se compraron en Aldrich, excepto el compuesto **10** que se obtuvo de ICN. Los compuestos **9** y **10** se purificaron antes de usarse. Para el compuesto **9**, 500 mg del producto se agitaron con 40 ml de cloroformo. La parte del producto que no se disolvió se colectó y se eliminó el exceso de disolvente. En el caso del compuesto **10**, 250 mg se mezclaron con 20 ml de acetonitrilo en agitación por 1 hora. Lo que no se disolvió se resuspendió en metanol y se aplicó a una placa preparativa de sílica. La placa se corrió en una mezcla de cloroformo:metanol (2:1). El compuesto deseado permanece en el origen, se extrajo de la placa con metanol y se evapora el disolvente.

**Compuestos sintetizados.** La síntesis de los análogos de los compuestos **8** y **9** se hizo en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona, España bajo la asesoría del Dr. Francisco López Calahorra. Todos los reactivos que se utilizaron en la síntesis se compraron en la compañía Aldrich. Las reacciones y separaciones cromatográficas en columna se siguieron por cromatografía en capa fina usando gel de sílice sobre placas de aluminio. La estructura de los compuestos se confirmó mediante análisis de IR, EM, RMN  $H^1$  y  $C^{13}$ . Las preparaciones que se describen no fueron optimizadas, sino que se llevaron a cabo con el objetivo de obtener el máximo número de productos en el menor tiempo posible.

**1a. 3-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-propan-1-ol.-** En un matraz de 100 mL provisto de refrigerante de reflujo y agitación magnética se introdujeron 2-mercapto-benzotiazol (1 g), 3-cloro-propanol (500  $\mu$ L) y trietilamina (4.2 mL) y DMF (50 mL). La disolución se hirvió por 5 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida, el residuo se suspendió en agua (20 mL), se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó con  $MgSO_4$  anhidro, se filtró, se eliminó el disolvente a

presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, con acetato de etilo como eluyente. Se aislaron 800 mg de **1a** puro (rendimiento: 59%).

**2a. 2a 3-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-propil-formamida.-** En un matraz de 100 mL, provisto de refrigerante de reflujo y agitación magnética se mezclaron 2-mercaptobenzotiazol (1 g), hidrobromuro de 3-bromo-propilamina (1.31 g) y DMF (50 mL.). La mezcla de reacción se reflujo por 2 h, pasadas las cuales se eliminó el disolvente a presión reducida, se disolvió el residuo en agua, se extrajo con diclorometano; la capa orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con acetato de etilo como eluyente. Se obtuvo **2a** como resultado de la reacción de transamidación del grupo amina con la DMF en el medio ácido en que tuvo lugar el proceso. Se aislaron 500 mg de **2a** puro (rendimiento: 33%).

**3a. 3-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-propilamina.-** En un matraz de 50 mL provisto de refrigerante de reflujo y agitación magnética, se disolvieron 400 mg de **2a** en una disolución al 10 % de hidróxido potásico en etanol/agua. La reacción se puso a ebullición por 2 h, se eliminó el etanol a presión reducida, y la suspensión acuosa resultante se extrajo con diclorometano. La disolución orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente, obteniéndose 300 mg de **3a** puro (rendimiento: 84%).

**4a. 4-(Benzotiazol-2-ilsulfanil)butanoato de metilo.-** En un matraz de 100 mL con refrigerante de reflujo y agitación magnética se disolvieron en DMF (50 mL) 2-mercapto-benzotiazol (1 g), metil-4-clorobutirato (730 µL) y trietilamina (4.2 mL). La disolución se calentó a ebullición por 2 h tras las cuales se eliminó el disolvente a presión reducida, se disolvió el residuo en agua, se extrajo con

diclorometano; la capa orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con una mezcla de diclorometano:acetato de etilo (95:5) como eluyente. Se aislaron 600 mg de **4a** puro (rendimiento: 38%).

**5a. Ácido 4-(benzotiazol-2-ilsulfanil)butanoico.**-En un matraz de 50 mL provisto de refrigerante de reflujo y agitación magnética, se disolvieron 500 mg de **4a** en una disolución al 10 % de hidróxido potásico en etanol/agua. La reacción se puso a ebullición por 2 h, se eliminó el etanol a presión reducida, y la suspensión acuosa resultante se extrajo con diclorometano previa adición de HCl al 5 % hasta pH ácido. La disolución orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente, obteniéndose 350 mg de **5a** puro (rendimiento: 74%).

**6a. Bromuro de 3-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-propiltrimetilamonio.**- En un matraz de 20 mL, provisto de refrigerante de reflujo y agitación magnética se mezclaron 2-mercaptobenzotiazol (300 mg), bromuro de 3-bromo-propiltrimetilamonio (156 mg) y DMF (6 mL). La mezcla de reacción se reflujoó por 3 h, pasadas las cuales se eliminó el disolvente a presión reducida, se disolvió el residuo en agua, se extrajo con diclorometano; la capa orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se obtuvieron 200 mg de **6a** puro (rendimiento: 32%).

**8a. Ácido [4-(6-metil-benzotiazol-2-il)-fenilamino]acético.**- En un matraz de 20 mL, provisto de refrigerante de reflujo y agitación magnética se disolvieron 4-(6-metil-benzotiazol-2-il)-fenilamina (500 mg) y bromoacetato de metilo (222.5  $\mu\text{L}$ ) en DMF (12 mL). La reacción se puso a ebullición por 2 h, tras las cuales se eliminó el disolvente a presión reducida, se suspendió el residuo en

agua, se extrajo con diclorometano; la capa orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con acetato de etilo como eluyente. El residuo se introdujo en un matraz de 50 ml junto con 1mL de una mezcla a partes iguales de etanol: NaOH 2M. La suspensión se hirvió durante 2h, se enfrió, se acidificó con HCl 5%, y se extrajo con diclorometano; la capa orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se aislaron 300 mg de **8a** puro (rendimiento: 48%).

**9a. [4-(6-Metil-benzotiazol-2-il)-fenilamino]-metanosulfonato sódico.-**

En un matraz de 50 mL provisto de refrigerante de reflujo y agitación magnética, se disolvieron 4-(6-metil-benzotiazol-2-il)-fenilamina (500 mg), y formaldehído bisulfito de sodio (320 mg) en DMF (20 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a 100 °C durante 14 h tras las cuales se eliminó el disolvente a presión reducida, se suspendió el residuo en agua y se extrajo con diclorometano; la capa orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con metanol como eluyente, obteniéndose 60 mg de **9a** de pureza suficiente (rendimiento: 8%).

**10a. [4-(6-Metil-benzotiazol-2-il)-fenilamino]sulfamato sódico.-** En un matraz de 50 mL provisto de agitación magnética se mezclaron 4-(6-metil-benzotiazol-2-il)-fenilamina (500 mg) y clorosulfonato de trimetilsilicio (362  $\mu\text{L}$ ) en DMF (20 mL). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente toda la noche, tras las cuales se eliminó el disolvente a presión reducida, se disolvió el residuo en agua y se extrajo con diclorometano. Se eliminó el agua de la capa acuosa a presión reducida y se aislaron 400 mg de **10a** de pureza suficiente (rendimiento: 56%).

**11a. Ácido benzotiazol-2-sulfónico.-** En un matraz de 50 mL provisto de agitación magnética, atmósfera inerte de N<sub>2</sub> y un baño exterior de acetona/nieve carbónica se disolvió 2-mercapto benzotiazol (1 g) en THF anhidro (10 mL), se bajó la temperatura a -78 °C y se adicionó terbutil-litio en hexano (4.35 mL) a través de un septum . La mezcla se agitó por 30 min tras lo que se le dejó calentar hasta temperatura ambiente. Nuevamente la mezcla se enfrió a -78 °C , se le añadió clorosulfonato de trimetilsilicio (1.14 mL), se calentó la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se mantuvo en agitación por 1 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida, el residuo se disolvió en agua y la disolución acuosa se lavó con éter etílico. Se eliminó el agua a presión reducida y se aislaron 400 mg de **11a** de pureza suficiente (rendimiento: 28%).

## RESULTADOS

### *Compuestos que inactivan a la triosafosfato isomerasa de Trypanosoma cruzi.*

En la búsqueda de compuestos que inactiven a la TcTIM, se ensayaron unos 150 compuestos a concentración de 100  $\mu\text{M}$  y 250  $\mu\text{M}$  siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos. Se encontró que a la concentración de 250  $\mu\text{M}$  el benzotiazol y algunos de sus derivados inactivan a la TcTIM (Tabla 2). Los resultados mostraron que el grado de inactivación depende de la estructura del compuesto. Por ejemplo, el compuesto 2 no afectó a la enzima y el 1 causó una moderada inactivación. Los compuestos 8, 9 y 10, sin embargo, ocasionaron una fuerte inactivación de la enzima. A partir de estas observaciones, se decidió estudiar con mas detalle el mecanismo por el que las moléculas más potentes (8, 9 y 10) inactivan la TcTIM. También se hicieron algunos experimentos con el compuesto 1.

### **Inactivación de la TcTIM por los benzotiazoles.**

El efecto de los compuestos 8, 9 y 10 sobre la TcTIM fue dependiente de su concentración (Fig. 7). Las curvas de concentración para los compuestos 1, 8 y 9 mostraron un perfil sigmoidal debido a que a bajas concentraciones los compuestos no afectaron, o afectaron poco a la enzima (Fig. 7 A, B y C). El patrón de inactivación para el 10 fue diferente, la curva de concentración fue hiperbólica (Fig. 7 D). De estas gráficas se calculó la  $I_{50}$ , es decir, la concentración necesaria para inactivar un 50% la TcTIM. Para el compuesto 1 la  $I_{50}$  fue de 433  $\mu\text{M}$ , la de los compuestos 8, 9 y 10 fue mucho menor. Los valores se muestran en la Tabla 3.

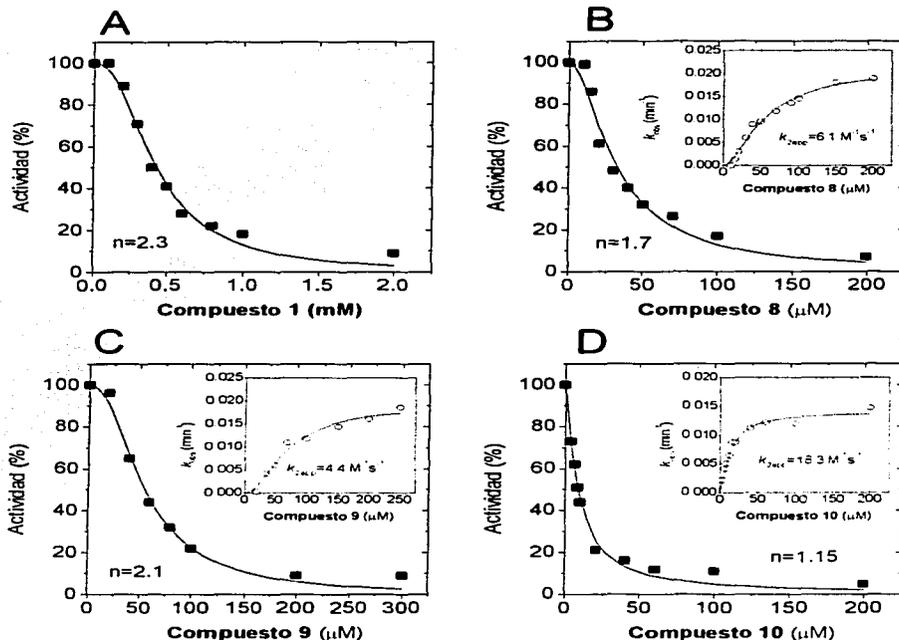
La inactivación de la TcTIM por los benzotiazoles también fue dependiente del tiempo. En todos los casos la inactivación fue mayor conforme aumentaba el tiempo de incubación. De las curvas de pérdida de actividad con respecto al tiempo a diferentes concentraciones de los compuestos 8, 9 y 10, se calcularon las constantes de velocidad de pseudo-primer orden ( $k_{obs}$ ). Los gráficos de las  $k_{obs}$  contra las diferentes concentraciones de los compuestos 8, 9 y

10 no fueron lineales. Los puntos cayeron en una curva que se desviaba hacia abajo hasta que finalmente llegó a una velocidad que fue independiente de la concentración de los compuestos (recuadros, Fig. 7 B, C y D, respectivamente).

**Tabla 2. Efecto del benzotiazol y algunos de sus derivados en la TcTIM.**

No. de Compuesto	Estructura	% Inactivación
1		25
2		0
3		0
4		14
5		4
6		47
7		8
8		95
9		91
10		95

Los compuestos se incubaron a 250  $\mu$ M. Las condiciones se describen en Material y Métodos. 1. Benzotiazol, 2. 2-metilbenzotiazol, 3. 3-metil-2(3H)-benzotiazolona, 4. 3-metilbenzotiazol-2-tiona, 5. 5-fluoro-2-metilbenzotiazol, 6. 2,5-dimetilbenzotiazol, 7. 2-(metiltio) benzotiazol, 8. c



**Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de los compuestos 1 (A), 8 (B), 9 (C) y 10 (D) en la TcTIM.** Las condiciones experimentales se describen en Material y Métodos. Los recuadros muestran las gráficas de las constantes de velocidad de pseudo-primer orden a diferentes concentraciones de los compuestos 8, 9 y 10.

La forma de las curvas refleja un proceso en el cual la unión inicial del ligando es seguida por la inactivación de la enzima en el complejo enzima-ligando (Pettigrew, 1986). De las gráficas de las  $k_{\text{obs}}$  a diferentes concentraciones del agente inactivante, se obtuvieron las constantes aparentes de velocidad de segundo orden ( $k_{2\text{app}}$ ). Para los cálculos, las curvas se ajustaron a la ecuación de

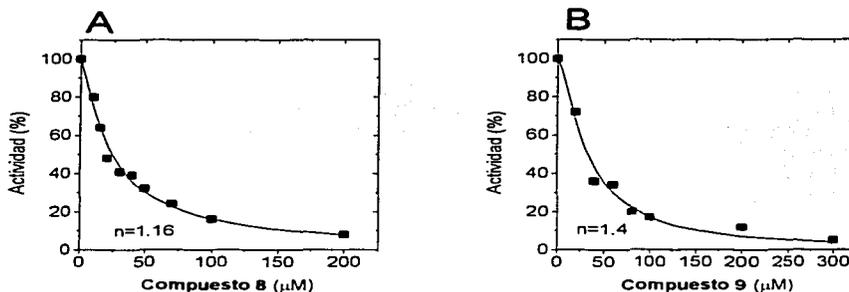
Hill, donde la  $k_{2app} = k_{obs\ max}/K_d$ . La constante de inactivación más alta la mostró el compuesto **10** (ver los valores en la figura 7).

El perfil sigmoidal de las curvas de inactivación de la TcTIM con diferentes concentraciones de los compuestos **8** y **9** tuvieron valores del número de Hill ( $n$ ) cercanos a 2 (Fig. 7). Esto indica que la inactivación para el **8** y **9** se acompañó de la unión de al menos 2 moléculas de benzotiazol. Estos resultados sugieren que la presencia de un benzotiazol debe afectar la inactivación de la TcTIM por otro benzotiazol. De hecho, cuando se determinó el efecto de diferentes concentraciones de los compuestos **8** y **9** en presencia de una concentración fija de benzotiazol (compuesto **1**), se encontró que las curvas de concentración de los compuestos fueron hiperbólicas con un número de Hill cercano a 1 (Fig. 8, A y B). Por lo tanto, los datos sugieren que la inactivación de la TcTIM por los compuestos **8** y **9** es el resultado de la unión secuencial de dos moléculas. De acuerdo con este razonamiento, las características del compuesto **10** son particularmente relevantes. Este es un compuesto en el que dos moléculas de benzotiazol están covalentemente unidas. La curva de inactivación de la TcTIM por diferentes concentraciones del compuesto **10** fue hiperbólica con un número de Hill de 1 (Fig. 7 D). Por lo tanto, en el **10** parecería que los dos grupos benzotiazol ocupan simultáneamente los dos sitios de unión en la TcTIM, y se comporta como un agente inactivador de un solo sitio.

#### **Efecto de los benzotiazoles en las TIMs de humano, levadura y *T. brucei*.**

Como la TIM es una enzima que se encuentra tanto en el parásito como en el humano; uno de los objetivos de este trabajo fue encontrar moléculas que selectivamente inactivaran la TIM del parásito y no la del humano, se estudió el efecto de los compuestos **8**, **9** y **10** en la TIM de humano (hTIM), y en la de otros organismos (Tabla 3). Los resultados, comparados con la TcTIM, mostraron que los compuestos inactivan a la hTIM, pero a concentraciones mucho mayores que a la TcTIM. La relación entre la  $I_{50}$  de la enzima del humano y la del parásito se

utilizó como un índice de selectividad de los compuestos por la enzima del parásito. Este valor fue desde 13 para el compuesto 8, 59 para el 9 y 200 para el 10.



**Figura 8. Efecto de los compuestos 8 (A) y 9 (B) en presencia de una concentración fija de benzotiazol.** Las condiciones experimentales se describen en Material y Métodos, excepto que la mezcla de incubación contenía benzotiazol a 300 µM. Se muestra el valor del número de Hill para cada compuesto en la presencia de benzotiazol.

El efecto de estas moléculas en la TIM de *T. brucei* (TbTIM) y levadura ( $\gamma$ TIM) se muestra en la Tabla 3. Los benzotiazoles inactivaron la TbTIM, pero su  $I_{50}$  fue mucho mayor que en la TcTIM. Se encontró además que la enzima de levadura fue muy insensible a todos los benzotiazoles; aún a concentraciones milimolares los compuestos no producen efectos apreciables en la  $\gamma$ TIM. En su conjunto los datos de la Tabla 3 indican que el efecto de los benzotiazoles depende de las diferencias estructurales de cada enzima y que por lo tanto es posible afectar selectivamente las enzimas de distintos organismos.

**Tabla 3. I<sub>50</sub> para los compuestos 8, 9 y 10 en la TcTIM, hTIM, M15ChTIM, yTIM y TbTIM.**

Compuesto	TcTIM <sup>a</sup>	hTIM <sup>b</sup>	M15ChTIM	TbTIM	yTIM	b/a
8	33 $\mu$ M	422 $\mu$ M	120 $\mu$ M	4 mM	>4 mM	13
9	56 $\mu$ M	3.3 mM	321 $\mu$ M	4 mM	>4 mM	59
10	8 $\mu$ M	1.6 mM	74 $\mu$ M	100 $\mu$ M	>900 $\mu$ M	200

Las condiciones experimentales se describen en Material y Métodos, excepto que se utilizaron las enzimas indicadas. La última columna muestra la relación entre la I<sub>50</sub> del humano y la TcTIM.

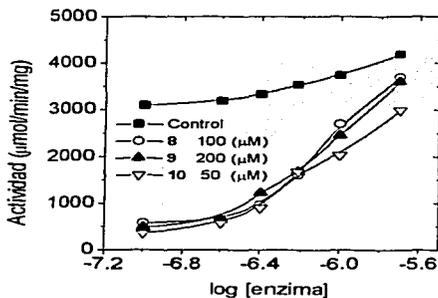
#### **Efecto de los benzotiazoles a diferentes concentraciones de TcTIM.**

En la determinación del mecanismo de acción de los benzotiazoles, se consideró de importancia explorar si éstos actuaban en la interfase del dímero de TcTIM. La relación entre el estado monomérico y dímérico de la TcTIM depende de la constante de asociación entre los monómeros, y de la concentración de proteína. Como se puede ver en la figura 9, el efecto de los compuestos fue mayor entre más baja fue la concentración de proteína. Estos datos sugieren que los benzotiazoles actúan sobre la interfase perturbando la asociación de los monómeros.

#### **La cisteína de interfase de la TcTIM en la inactivación por los benzotiazoles.**

Los datos de la figura 9 sugieren que los benzotiazoles interfieren con los contactos entre los dos monómeros de la TcTIM y la Tabla 3 muestra que dentro de las enzimas que se estudiaron, la TcTIM es la más sensible a la inactivación por los benzotiazoles. Todo esto indica que el efecto de tales compuestos depende de las diferencias estructurales de cada enzima, y que algunas de estas diferencias pueden localizarse en la interfase del dímero. A este respecto, una diferencia notable es que la TcTIM y la TbTIM tienen una cisteína (Cys15) en la interfase, mientras que la enzima de humano posee una metionina y la de levadura tiene una leucina. Además se recuerda que entre las TIMs que tienen

cisteína de interfase, la TcTIM es la más sensible a los agentes derivatizantes de grupo sulfhidrilo (Garza-Ramos *et al.*, 1998, Rodríguez-Romero *et al.*, 2002; Maithal *et al.*, 2002). Por lo tanto, se estudió si la inactivación por benzotiazoles estaba relacionada con la existencia de la cisteína de interfase. Para esto, se construyó una mutante de la enzima de humano a la cual se le cambió la metionina en la posición 15 por cisteína (M15ChTIM). Las propiedades cinéticas de la mutante M15C de la TIM de humano fueron similares a las de la enzima silvestre. La  $K_m$  y la  $V_{max}$  de la enzima silvestre fueron 0.55 mM y 7550  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , mientras que la  $K_m$  y  $V_{max}$  de la mutante fueron 0.62 mM y 9670  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . Los resultados mostraron que la enzima mutante se volvió de 3, 10 y 21 veces más sensible al efecto de los compuestos 8, 9 y 10, respectivamente (Tabla 3). Esto sugiere que la existencia de una cisteína en la posición 15 es fundamental para la selectividad y la acción de los benzotiazoles.



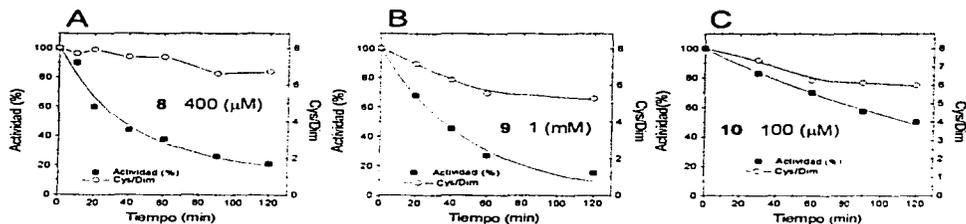
**Figura 9. Efecto de los compuestos 8, 9 y 10 a diferentes concentraciones de TcTIM.**

## **Efecto de los benzotiazoles en la estructura cuaternaria de la TcTIM y en su contenido de cisteínas.**

Existen varios trabajos (Garza-Ramos *et al.*, 1998; Rodríguez-Romero *et al.*, 2002; Maithal *et al.*, 2002) que indican que la disociación de los monómeros de la TIM producida por agentes químicos que modifican específicamente a la cisteína de la interfase, induce agregación de la proteína o formación de monómeros estables. También se ha visto que estos cambios causan la formación de uniones disulfuro entre los monómeros de la TIM. En el mecanismo por el que los benzotiazoles inactivan a la TcTIM consideramos de interés explorar si estos agentes inducen cambios drásticos en la estructura de la enzima. En la interpretación de los resultados que se obtuvieron es importante recordar que los benzotiazoles no son agentes oxidantes. Para estos experimentos, la TcTIM se incubó con los compuestos **8**, **9** y **10**, y a diferentes tiempos se tomaron alícuotas para medir la actividad y el número de cisteínas por dímero de enzima. La TcTIM tiene 8 cisteínas por dímero (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997). Se encontró que el compuesto **8** induce pérdida de cisteínas, sin embargo es importante notar que la pérdida de cisteínas ocurrió después de que la enzima se había inactivado en un 80% (Fig. 10 A). Es decir, la pérdida de cisteínas fue posterior a la inactivación de la enzima. Con los compuestos **9** y **10** el comportamiento fue diferente, hubo pérdida de cisteínas durante el curso de la inactivación (Fig. 10 B y C). Una observación interesante es que durante el curso de la inactivación por estos compuestos fue visible la formación de agregados. Lo cual es una evidencia fuerte de que la enzima experimentó alteraciones estructurales importantes.

La inactivación por los compuestos **9** y **10** pero no por el **8**, se acompaña de pérdida de cisteínas. Esto podría indicar que hay diferencias en el mecanismo de inactivación para distintos benzotiazoles. Sin embargo, también es posible que los tres inactiven la TIM bajo el mismo mecanismo, pero que después de que ha ocurrido la inactivación, los compuestos **9** y **10** induzcan cambios estructurales diferentes a los que induce el **8**.

En este sentido es importante mencionar que el número de cisteínas continúa disminuyendo aún después de que la enzima se ha inactivado completamente. Por ejemplo, después de 24 h de incubación con el compuesto **10** el número de cisteínas por dímero fue de 1. De manera similar para el **8** el número de cisteínas por dímero fue de 4. Además, en un gel de SDS corrido bajo condiciones no reductoras, la TcTIM incubada con el compuesto **9** exhibe bandas de pesos moleculares que son múltiplos del peso del monómero; si la misma muestra se corre en condiciones reductoras las bandas no se observan. Esto sugiere que la pérdida de cisteínas está relacionada, cuando menos en parte, con la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Estos experimentos indican que los benzotiazoles producen cambios muy drásticos en la estructura de la enzima. En este sentido se hace énfasis en que los cambios que inducen los benzotiazoles no son reversibles. Por lo tanto, los benzotiazoles son agentes que causan alteraciones estructurales irreversibles.



**Figura 10. Efecto de los compuestos 8 (A), 9 (B) y 10 (C), en el contenido de cisteínas durante la inactivación de la TcTIM.** Las condiciones experimentales están descritas en Material y Métodos, excepto que la TcTIM se incubó a una concentración de 67 μg/ml con las concentraciones indicadas de cada compuesto. A cada tiempo, se tomaron alícuotas de la mezcla para determinar actividad (cuadros) y contenido de cisteínas (círculos).

### ***Estructura cristalográfica del complejo formado por la TcTIM y el compuesto 8.***

Los resultados que se han narrado muestran que los benzotiazoles tienen un alto grado de selectividad por la TcTIM y que, posiblemente, actúan perturbando las interacciones entre los dos monómeros. Sin embargo, para poder diseñar moléculas más afines es necesario conocer el sitio de unión de los benzotiazoles en la TcTIM. Para ello, se resolvió la estructura cristalográfica del complejo de la TcTIM y el compuesto **8**. También se realizaron intentos por obtener el cristal del complejo de la TcTIM con el **9** ó **10**. Desafortunadamente estos compuestos no fueron solubles en las soluciones de cristalización y por lo tanto no fue posible obtener la estructura del complejo TcTIM con el **9** y el **10**.

### **Complejo TcTIM-8.**

La obtención del cristal así como los programas que se utilizaron para la resolución de la estructura cristalográfica se detallan en Material y Métodos. Se obtuvieron cristales de la enzima expuesta a 200 y 400  $\mu\text{M}$  del compuesto **8**. Es importante señalar que los cristales que se formaron en presencia de 400  $\mu\text{M}$  fueron muy frágiles y no fue posible coleccionar datos del complejo. Sin embargo, si se pudo analizar la TcTIM que se cristalizó en presencia de 200  $\mu\text{M}$  del compuesto **8**. La estadística sobre la colección y la reducción de los datos, así como el afinamiento de la estructura del complejo de la TcTIM y el compuesto **8** a 200  $\mu\text{M}$  se muestran en la tabla 4.

### **Comparación de las estructuras cristalográficas de la TcTIM, TcTIM en hexano y el complejo TcTIM-8.**

En la estructura cristalográfica del complejo TcTIM-8 se obtuvieron densidades electrónicas para cada uno de los residuos de proteína. De hecho, se encontraron densidades que correspondían a conformaciones alternas de las cadenas laterales de los residuos Glu17, Glu27, Ser97 y Glu245 del monómero A, así como Glu19, Val42, Gln158 y Arg196 del monómero B.

**Tabla 4. Estadística del procesamiento de datos y afinamiento de la estructura del complejo TcTIM-8.**

<b>Colección y Reducción de datos</b>	
Grupo Espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Celda Unitaria (Å) a,b,c	42.867, 75.578, 146.451
Reflexiones totales	144901
Reflexiones Únicas	32729
Resolución (Å)	2.0
Completeness (%)	88.7
R <sub>sym</sub> (%)	4.4
Redundancia	2.5
<b>Afinamiento</b>	
Límites de resolución para el afinamiento (Å)	23.0-2.0
No. de reflexiones (afinamiento)	29330
R/Rfree	18.1/22.4
No. de moléculas de compuesto 8	1
No. de iones sulfato	6
No. de moléculas de agua	369
<b>Desviaciones rms</b>	
Enlaces (Å)	0.004
Angulos (deg.)	1.2
Torsiones (deg.)	21.6

Existen dos estructuras cristalográficas de la TcTIM, una de ellas en su forma nativa (Maldonado *et al.*, 1998) y la otra en presencia de hexano (Gao *et al.*, 1999). Un resumen de los datos cristalográficos más importantes de estas dos estructuras y la del complejo TcTIM-8 se muestra en la tabla 5. Cabe mencionar que el regulador de cristalización y la solución cristalizante fueron los mismos en los tres casos. Sin embargo, se recuerda que para la colección de datos en la estructura nativa y la de hexano, los cristales se difractaron a 18 °C, mientras que en la del complejo con el compuesto 8 la colección se hizo a -165°C. En los tres casos la red cristalina y el grupo espacial fueron iguales (Tabla 5). No obstante, la celda unitaria del cristal del complejo TcTIM-8 fue más pequeña y el número de moléculas de agua fue mayor. Esto probablemente se debe a las condiciones de colección de datos, y a que la baja temperatura a la cual se difractó el cristal del

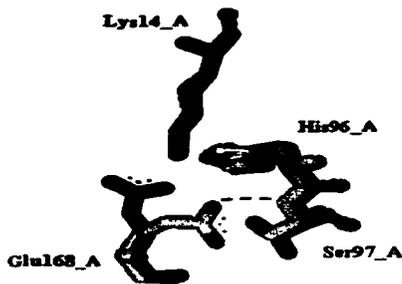
complejo TcTIM-8 pudo ocasionar una contracción de la celda unitaria, y la fijación de un mayor número de moléculas de agua.

**Tabla 5. Comparación de los datos cristalográficos de las tres estructuras de TcTIM.**

	TcTIM nativa	TcTIM en hexano	complejo TcTIM-8
<b>Red cristalina</b>	Ortorrómbica	Ortorrómbica	Ortorrómbica
<b>Grupo espacial</b>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Resolución</b>	1.83 Å	2.0 Å	2.0 Å
<b>T de colección</b>	18 °C	18 °C	-165 °C
<b>Celda unitaria</b>	a= 43.71 Å b= 77.65 Å c= 149.54 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a= 43.7 Å b= 77.7 Å c= 149.2 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a= 42.867 Å b= 75.578 Å c= 146.451 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
<b>Moléculas de agua</b>	165	236	369
<b>Heteroátomos</b>		3 hexanos	6 iones sulfato 1 compuesto 8

El alineamiento de las tres estructuras mostró que la cadena principal no sufrió cambios de importancia. La desviación rms entre los C $\alpha$  de cadena principal del complejo TcTIM-8 y los de la TcTIM nativa fue de 0.396 Å; al compararse con la estructura en hexano el rms fue de 0.381 Å. Tampoco se modificaron las orientaciones de las cadenas laterales de los residuos catalíticos (Lys14, His96 y Glu168) del monómero B. Sin embargo, se observó que la cadena lateral del Glu 168 del monómero A sufrió un desplazamiento de 3.6 Å con respecto a su posición en la estructura nativa. El cambio de orientación de este

residuo se acompañó de la pérdida de un puente de hidrógeno entre el O $\epsilon$ 2 del Glu168 y el N de la Ser97 de la misma subunidad (Fig. 11). Cabe mencionar que en la estructura con hexano, este residuo también sufrió un desplazamiento, pero el puente de hidrógeno con la Ser97 se conservó.



**Figura 11. Residuos catalíticos del monómero A.** En la imagen se muestra el puente de hidrógeno entre el O $\epsilon$ 2 del Glu168 y el N de la Ser97 en la estructura TcTIM nativa. Los residuos de la estructura del complejo están en azul.

#### **Heteroátomos y sitios de unión del compuesto 8**

Como se señala en la Tabla 5, en la estructura del complejo se encontraron 6 iones sulfato. Cuatro de ellos se agrupan en la superficie del monómero A, interactuando con una red de moléculas de agua. Estos sulfatos están en la cercanía de las argininas 193, 196 y 227; estos residuos tienen sus cadenas laterales orientadas hacia el solvente (Fig. 13). También se encontró una molécula de sulfato en el centro del barril de cada uno de los monómeros. Estos interactúan con los residuos catalíticos a través de moléculas de agua (Fig. 12).



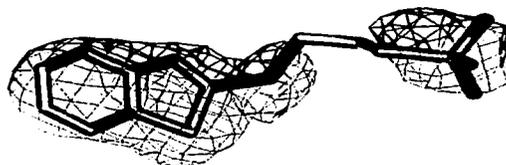
**Figura 12. Posición de los sulfatos en la estructura del complejo. En la imagen se pudo apreciar la posición del sulfato que se encuentra en el centro del barril del monómero A (azulmarino).**

Desde nuestro punto de vista, el hallazgo más importante fue que en la estructura del complejo TcTIM-8 hay una molécula del compuesto 8 por dímero de TcTIM (Fig. 13). Durante la resolución de la estructura sólo se observó densidad electrónica para el compuesto en la región del anillo de benzotiazol y su grupo sulfonato, no así en la cadena de carbonos cuando el contorno fue de  $1\sigma$

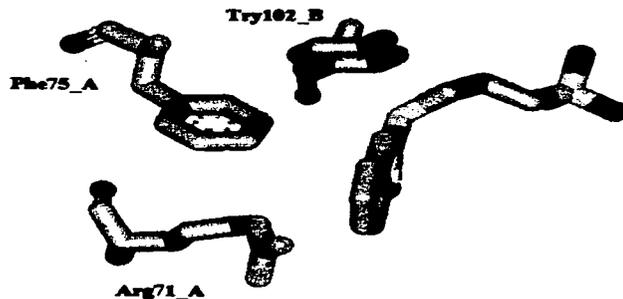
(Fig. 14). El compuesto 8 se localiza claramente en una zona de la interfase. Los residuos de proteína que se encuentran a menos de 4 Å del compuesto son: la Arg71 y la Phe75 del monómero A y la Tyr102 del monómero B (Fig. 15). Una peculiaridad de la estructura cristalográfica es que la cadena lateral de la Arg71 del monómero A se desplazó 5.1 Å con respecto a la posición de la cadena lateral de este residuo en la estructura nativa (Fig. 16).



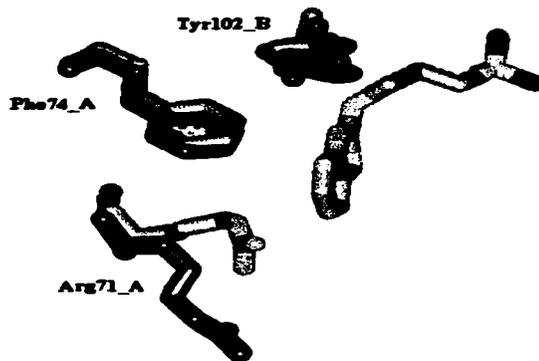
**Figura 13. Sitio de unión de la molécula del compuesto 8 en la estructura del complejo TcTIM-8.**



**Figura 14. Mapa de densidad electrónica ( $2F_o - F_c$ ) con un contorno de  $1\sigma$  del compuesto 8 en la estructura cristalográfica del complejo TcTIM-8.**



**Figura 15. Residuos que se encuentran a menos de 4 Å del compuesto 8 en la estructura del complejo.**



**Figura 16. Desplazamiento de la Arg71 del monómero A. En la imagen también se muestra la posición de los otros dos residuos en la estructura nativa (verde).**

También consideramos de importancia señalar que la región de la interfase donde se localiza la molécula del compuesto 8 corresponde a la región donde se encontraron las moléculas de hexano. Los residuos que se encuentran a menos de 4 Å de los hexanos son Ile69, Phe75, Tyr103, Glu104, Ile109 y Lys 113 del monómero A, Tyr 102 y Tyr 103 del monómero B. (Fig. 17). Por lo tanto, el conjunto de datos cristalográficos de la TcTIM en hexano y con el compuesto 8 indican que en esta región de la enzima existe un hueco hidrofóbico formado por residuos de las dos subunidades. Adicionalmente, los resultados indican que esta zona de la TcTIM tiene la capacidad de unir moléculas orgánicas. Por lo tanto, esta región podría ser el sitio para diseñar moléculas, que en comparación con el 8, se unan con mayor afinidad e inactiven a la TcTIM.



**Figura 17. Comparación del sitio de unión en la interfase de la TcTIM de las moléculas de hexano y el compuesto 8.**

Un punto de interés de la estructura cristalográfica es que el grupo sulfonato del compuesto 8 se orientó hacia el solvente, sin hacer contacto con algún residuo de la proteína. Debido a esto, pensamos que tal vez el sulfonato impedía una mayor penetración del 8 hacia el interior de la interfase. De esta manera, consideramos que si se cambiaba el grupo sulfonato por un grupo menos hidrofílico se podría aumentar la capacidad inactivante del 8. Para lo cual se sintetizaron moléculas en que diferentes sustituyentes se colocaron en el sitio del sulfonato.

### ***Efecto de los compuestos análogos al 8 y al 9 en la estabilidad de la TcTIM.***

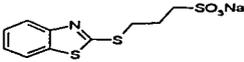
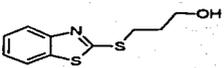
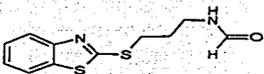
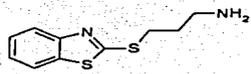
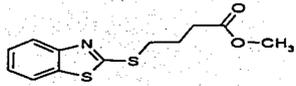
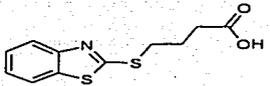
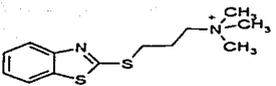
Se sintetizaron seis compuestos con diferentes grupos funcionales en la posición del sulfonato, estos fueron; alcohol, amida, amina, éster, carboxilo, y amonio. La síntesis de los derivados de benzotiazol se describe en Material y Métodos. La concentración a la que los compuestos inactivaron a la enzima un 50% ( $I_{50}$ ) se muestra en la tabla 6. Los resultados fueron claros; ninguno de los compuestos sintetizados fue más activo que el 8. Por lo tanto, los datos indican de manera muy convincente que el grupo sulfonato es necesario para la acción inactivante de los benzotiazoles.

De hecho esta conclusión se confirmó con la síntesis y el ensayo de compuestos derivados del 9. En esta serie, el grupo sulfonato se sustituyó por un carboxilo, también se sintetizaron compuestos en los que el sulfonato se colocó en un sitio diferente. Los resultados con estos compuestos se muestran en la Tabla 7.

De estos resultados se puede concluir que el sulfonato es importante en la inactivación de la TcTIM debido a que:

- a) no hemos encontrado ninguna molécula sin sulfonato que a concentraciones relativamente bajas ejerza un efecto inactivante importante.
- b) cuando se substituye el sulfonato por un carboxilo o algún otro grupo funcional, la molécula pierde capacidad para inactivar a la enzima. Por ejemplo, la  $I_{50}$  del compuesto 5a que es análogo del 8 (que tiene una  $I_{50}$  de 33  $\mu$ M) pero contiene un carboxilo en lugar del grupo sulfonato, fue más de 2 mM. De la misma manera, la  $I_{50}$  del compuesto 8a que es un derivado del 9, pero tiene un carboxilo en lugar del sulfonato, fue 8 veces mayor que la del 9.

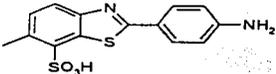
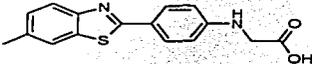
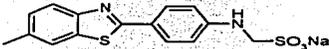
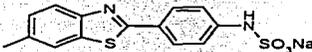
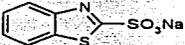
**Tabla 6. I<sub>50</sub> para los compuestos 1a-6a en la TcTIM.**

No. de Compuesto	Estructura	I <sub>50</sub>
8		33 μM
1a		>2 mM
2a		ND
3a		ND
4a		>2 mM
5a		>2 mM
6a		236 μM

ND. No determinado debido a problemas de solubilidad. 8. 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propansulfonato sódico, 1a. 3-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-propan-1-ol, 2a. N-[3-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-propil]-formamida, 3a. 3-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-propilamina, 4a. 4-(benzotiazol-2-ilsulfanil)butanoato de metilo, 5a. ácido 4-(benzotiazol-2-ilsulfanil)butanoico, 6a. Bromuro de 3-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-propiltrimetilamonio.

Adicionalmente, los datos en la Tabla 5 indican que la posición del sulfonato también es importante. El mejor ejemplo de esto es el compuesto **10a**. Este difiere del compuesto **9** en la posición del sulfonato, y su  $I_{50}$  fue significativamente mayor.

**Tabla 7.  $I_{50}$  para los compuestos 8a-11a en la TcTIM.**

No. de Compuesto	Estructura	$I_{50}$
9		55 $\mu\text{M}$
8a		414 $\mu\text{M}$
9a		100 $\mu\text{M}$
10a		344 $\mu\text{M}$
11a		227 $\mu\text{M}$

9. ácido 2-(p-aminofenil)-6-metilbenzotiazol-7- sulfónico, **8a**. ácido [4-(6-metil-benzotiazol-2-il)-fenilamino]acético, **9a**. [4-(6-metil-benzotiazol-2-il)-fenilamino]metanosulfonato sódico, sal de sodio, **10a**. [4-(6-metil-benzotiazol-2-il)-fenilamino]-ácido sulfámico, sal de sodio, **11a**. ácido benzotiazol-2- sulfónico.

## DISCUSIÓN

### *Inactivación de la TcTIM por derivados de benzotiazol.*

Los resultados de este trabajo indican que ciertos derivados de benzotiazol inactivan a la TcTIM a concentraciones  $\mu\text{M}$ . Su efecto es dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de enzima; esto último sugiere que los compuestos interfieren en la asociación de los monómeros. Además, los resultados mostraron que la TcTIM es mucho más sensible que la del humano. De hecho, con el compuesto **10** la selectividad es de 200 veces.

La cinética de inactivación de los compuestos **1**, **8** y **9** indica que se requiere la unión de dos moléculas para la inactivación de la TcTIM. La unión de las dos moléculas es un proceso secuencial, en el cual la segunda molécula no se une hasta que el primer sitio ha sido ocupado por una molécula de benzotiazol. Esta conclusión se confirma por los experimentos que se hicieron con el compuesto **10**. Éste es un compuesto formado por dos grupos benzotiazol unidos covalentemente. Con el **10** la cinética de inactivación se ajusta a un modelo en el cual la inactivación resulta de la unión de una sola molécula. Estos datos también sugieren que los dos sitios de benzotiazol se encuentran a una distancia de un enlace carbono-carbono.

Los estudios sobre el efecto inactivador de los benzotiazoles en la TIM de diferentes especies sugirieron que la cisteína de interfase de la TcTIM está involucrada en su efecto. Lo anterior fue confirmado con una mutante de la TIM de humano en la cual su Met15 fue cambiada por cisteína. La sensibilidad de la enzima mutante a los benzotiazoles fue significativamente mayor que en la silvestre, indicando que la cisteína de interfase de la TcTIM tiene un papel central en la acción de estos compuestos que no derivatizan cisteínas.

### ***Estructura cristalográfica del complejo TcTIM- 8.***

Con la finalidad de conocer el sitio de unión de los benzotiazoles en la TcTIM, se resolvió la estructura cristalográfica del complejo TcTIM-8. Los resultados mostraron la unión de una molécula por dímero de TcTIM. La molécula se localizó en la parte externa de la interfase. No se encontró ninguna interacción fuerte con algún residuo de la proteína. Inclusive el sulfonato no tuvo ninguna interacción con algún residuo o red de moléculas de agua. No obstante, cabe mencionar que en las moléculas generadas por simetría el grupo sulfonato está cerca del dipolo positivo de la hélice 5 de uno de los monómeros. Esto puede sugerir que en solución, la interacción del 8 con la enzima sea más favorable.

La cinética de inactivación por los compuestos 8 y 9 mostró que se requieren dos moléculas del compuesto para inactivar a la enzima. Lo anterior está de acuerdo con un modelo cinético de dos etapas; en la primera, una molécula se une a la TcTIM de manera reversible. La segunda es irreversible y lleva a la inactivación de la enzima. Por lo tanto, es posible que lo observado en el cristal corresponda al intermediario reversible, en el cual la enzima aún no sufre grandes alteraciones estructurales, ya que la segunda molécula no se ha unido. De hecho, consideramos que sería muy difícil obtener datos estructurales del complejo de la TcTIM con dos moléculas de benzotiazol unidas, ya que la unión de ellas ocasionaría alteraciones drásticas en la estructura. En este contexto se recuerda que los cristales del complejo que se formaron con una concentración de 400  $\mu$ M del compuesto 8 fueron muy frágiles y no fue posible coleccionar datos cristalográficos.

### ***Efecto de los derivados de benzotiazol sintetizados.***

De acuerdo con los datos cristalográficos, inicialmente pensamos que el grupo sulfonato impedía una mayor penetración de la molécula hacia el interior de la interfase. Debido a esto, estudiamos el efecto de análogos del compuesto 8 que carecen del grupo sulfonato. Los derivados del compuesto 8, con diferentes

grupos funcionales en la posición del sulfonato no tuvieron un efecto importante en la TcTIM. Esto indica que el sulfonato es necesario en la acción de los benzotiazoles. Sin embargo, aún no está claro el papel que juega el sulfonato. Una posible explicación es que el grupo sulfonato favorezca las interacciones hidrofóbicas de la molécula con la enzima (sugerencia del Dr. Miguel Costas).

También es importante notar que la posición del sulfonato es fundamental. Los datos obtenidos con los análogos del compuesto **9** indican que el sulfonato debe estar unido al anillo de benzotiazol. Esta conclusión se observa claramente con el compuesto **10a**. Éste difiere del **9** en la posición del sulfonato. Sin embargo, el **10a** es siete veces menos activo. De cualquier forma, llama la atención que en el compuesto **8** el sulfonato no está unido al benzotiazol.

Por otro lado, el compuesto **11a** en comparación con el **1** y el **8** muestra que el grupo sulfonato es necesario, pero que se requiere algo más en la posición **2** del anillo de benzotiazol para provocar una inactivación importante a concentraciones bajas. Entonces la pregunta que surge es ¿son las características del sustituyente en la posición **2** del anillo de benzotiazol las que determinan la efectividad de la molécula? En este sentido, el compuesto **10** que tiene un grupo sulfonato y un sustituyente grande e hidrofóbico en la posición **2** resultó ser muy efectivo. Además, su índice de selectividad entre la enzima del parásito y la del humano fue de 200 veces. En base a lo observado en el cristal del complejo TcTIM-8, es posible que el grupo sulfonato que se localiza en el solvente oriente la penetración de la molécula en la interfase.

Hasta el momento no podemos definir exactamente la importancia de la posición del grupo sulfonato, ni las características del sustituyente en la posición **2** del anillo de benzotiazol. Sin embargo, los datos que hemos obtenido nos permiten definir cuales son las moléculas que se deben probar en la TcTIM.

## PERSPECTIVAS

En este trabajo hemos demostrado que los benzotiazoles inactivan selectivamente la TcTIM. Por lo tanto, pueden utilizarse como guía para el diseño de nuevas moléculas con mayor capacidad de inactivación. En este sentido queda por determinar:

**La distancia óptima entre las dos unidades de benzotiazol.** Con el compuesto **10** se demostró que probablemente los dos sitios se encuentren a una distancia de un enlace C-C. Sin embargo, no sabemos la efectividad de moléculas que tengan una mayor separación entre los benzotiazoles. Sería muy interesante estudiar este tipo de moléculas ya que las unidades de benzotiazol tendrían la posibilidad de tener varias orientaciones.

**Número de unidades de benzotiazol.** Los estudios de inactivación de la TcTIM por los benzotiazoles mostraron que se requieren 2 moléculas de benzotiazol. No obstante, es necesario saber si, por ejemplo, un tercer anillo en el compuesto **10** puede aumentar la potencia de la molécula. A este respecto existen dos posibilidades, i) sintetizar un derivado del compuesto **10** al cual se le adicione un tercer benzotiazol o ii) cambiar la parte del grupo fenilamino por un anillo de benzotiazol. Los resultados podrían aclarar si en realidad existe un compromiso entre el tamaño y las características del sustituyente en la posición 2 del anillo de benzotiazol.

**Número de grupos sulfonato.** En este trabajo se demostró que el grupo sulfonato es importante para la acción de los benzotiazoles. Sin embargo, sólo se han estudiado moléculas con un único grupo sulfonato. Por lo tanto, también se debe determinar si un grupo sulfonato adicional aumenta la potencia de los benzotiazoles. Sin embargo desconocemos cual es el lugar en el que debe introducirse el sulfonato.

**Efecto de los benzotiazoles *in vivo*.** Para que estos compuestos puedan llegar hasta la enzima en el tripanosoma necesitan pasar dos barreras. Una de ellas es la membrana del parásito y la otra es la membrana del glicosoma. Por lo tanto, es necesario saber si los compuestos pueden llegar a su blanco, o si hay barreras de permeabilidad que impidan su penetración al interior de la célula. De hecho, es muy posible que las moléculas con un grupo sulfonato no puedan pasar las membranas biológicas. Sin embargo, se sabe que uno de los fármacos más usados en el tratamiento de la tripanosomiasis africana, el suramin, tiene 6 grupos sulfonato y se ha visto que este puede alcanzar concentraciones micromolares en el interior del tripanosoma.

De cualquier forma pensamos que una vez que tengamos compuestos que actúen a concentraciones nM, nos tendremos que enfrentar al problema de su penetración en las membranas biológicas del tripanosoma.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## REFERENCIAS

**Alagona, G., Ghio, C., Kollman, P. A. (2003)** The intramolecular mechanism for the second proton transfer in triosephosphate isomerase (TIM): A QM/FE approach. *J. Comput. Chem.* **24**, 46-56.

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

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

**Anjou, K., Von Sydow, E. (1967)** The aroma of cranberries. II. Vaccinium macrocarpon Ait. *Acta Chem. Scand.* **21**, 2076-2082.

**Aotsuka, T., Abe, N., Fukushima, F., Ashizawa, N., Yoshida, M. (1997)** Benzothiazol-2-ylcarboxylic acids with diverse spacers: a novel class of potent, orally active aldolase reductase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 1677-1682.

**Araujo, M. S., Martins-Filho, O. A., Pereira, M. E., Brener, Z. (2000)** A combination of benzimidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 819-824.

**Ávila-Rios, S. (2001)** Purificación y caracterización de las triosafosfato isomerasas mutantes de humano y levadura con una cisteína en la posición 14. Tesis de licenciatura. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

**Bakker, B. M., Michels, P. A., Oppendoes, F. R., Westerhoff, H. V. (1999)** What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? *J. Biol. Chem.* **274**, 14551-14559.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. D., Priddle, J. D., Waley, S.G. (1975)** Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* 255, 609-614.

**Bogan, A. A., Thorn, K. S. (1998)** Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.* 280, 1-9.

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

**Brownlee, B., Carey, J. H., McInnis, G. A., Pellizari I. T. (1992)** Aquatic environmental chemistry of 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole an related benzothiazoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1153-1168.

**Brünger, A. T. (1992)** The free R- value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355, 472-474.

**Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., Warren, G. L. (1998)** Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. sect. D* 54, 905-921.

**Cerectto, H., Gónzales, M. (2002)** Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 1215-1237.

**Chothia, C., Janin, J. (1975)** Principles of protein-protein recognition. *Nature* 256, 705-708.

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

**Colaborative Computacional Project Number 4 (1994)** The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallog. sect. D* 54, 905-921.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Daar, I. O., Artymiuk, P. J., Phillips, D. C., Maquat, L. E. (1986)** Human triose-phosphate isomerase deficiency: a single amino acid substitution results in a thermolabile enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7903-7907.

**Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A., Ringe, D. (1991)** Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry* **30**, 5821-5826.

**De Waver, H., Verachtert, H. (1997)** Biodegradation and toxicity of benzothiazoles. *Wat. Res.* **31**, 2673-2684.

**Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M. D., Martial, J. A., Hol, W. G. J. (1995)** Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Sci.* **4**, 2594-2604.

**Digard, P., Williams, K. P., Hensley, P., Brooks, I. S., Dahl, C. E., Coen, D. M. (1995)** Specific inhibition of herpes simplex virus DNA polymerase by helical peptides corresponding to the subunit interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1456-1460.

**Docampo, R., Stoppani, A. O. (1979)** Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* **197**, 317-321.

**Docampo, R., Moreno, S. N., Stoppani, A. O., Leon, W., Cruz, F. S., Villalta, F., Muñoz, R. F. (1981)** Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1947-1951.

**Ellman, G. L. (1958)** Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Gallois, A., Gross, B., Langlois, D., Spinnler, H. E., Brunerie, P. (1990)** Influence of culture conditions on productions of flavour compounds by 29 ligninolytic basidiomycetes. *Mycol. Res.* **94**, 494-504.

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

**Garza-Ramos, G., Perez-Montfort, R., Rojo-Domínguez, A., de Gómez-Puyou, M. T., Gómez-Puyou, A. (1996)** Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* **241**, 114-120.

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

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

**Grishin, N. V., Phillips, M. A. (1994)** The subunit interfaces of oligomeric enzymes are conserved to a similar extent to the overall protein sequences. *Protein. Sci.* **3**, 2455-2458.

**Guzmán-Bracho, C., García-García, L., Floriani-Verdugo, J., Guerrero-Martínez, S., Torres-Cosme, M., Ramírez-Melgar, C., Velasco-Castrejón, O. (1998)** Riesgo transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea en México. *Rev. Panam. Salud Pública* **4**, 94-99.

**Guzmán-Bracho, C. (2001)** Epidemiology of Chagas disease in México: an update. *Trends Parasitol.* **17**, 372-376.

**Harris, T. K., Cole, R. N., Comer, F. I., Mildvan, A. S. (1998)** Proton transfer in the mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **37**, 16828-16838.

**Heiser, V., Engemann, S., Brocker, W., Dunkel, I., Boeddrich, A., Waelter, S., Nordhoff, E., Lurz, R., Schugardt, N., Rautenberg, S., Herhaus, C., Barnickel, G., Bottcher, H., Lehrach, H., Wanker, E. E. (2002)** Identification of benzothiazoles as potential polyglutamine aggregation inhibitors of Huntington's disease by using an automated filter retardation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16400-16406.

**Heitsch, H., Wagner, A., Schölkens, B. A., Wirth, K. (1999)** Novel series of o-substituted 8-quinolines and 4-benzothiazoles as potent antagonists of the bradykinin B<sub>2</sub> receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 327-332.

**Helfert, S., Estevez, A. M., Bakker, B., Michels, P., Clayton, C. (2001)** Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* **357**, 117-125.

**Hernández-Alcántara, G., Garza-Ramos, G., Hernández, G. M., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R.** Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry* **41**, 4230-4238.

**Hutchinson, I., Jennings, S. A., Vishnuvajjala, B. R., Westwell, A. D., Stevens, M. F. (2002)** Antitumor benzothiazoles. 16. Synthesis and pharmaceutical properties of antitumor 2-(4-aminophenyl)benzothiazole amino acid prodrugs. *J. Med. Chem.* **45**, 744-747.

**Janin, J., Miller, S., Chothia, C. (1988)** Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins. *J. Mol. Biol.* **204**, 155-164.

**Jogl, G., Rozovsky, S., McDermott, A. E., Tong, L. (2003)** Optimal alignment for enzymatic proton transfer: Structure of the Michaelis complex of triosephosphate isomerase at 1.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 50-55.

**Joseph, D., Petsko, G. A., Karplus, M. (1990)** Anatomy of a conformational change: hinged "lid" motion of the triosephosphate isomerase loop. *Science* **249**, 1425-1428.

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

**Kohlhoff, M., Dahm, A., Hensel, R. (1996)** Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Lett.* **383**, 245-50.

**Kursula, I., Wierenga, R. K. (2003)** Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **278**, 9544-9551.

**Larsen, T. A., Olson, A. J., Goodsell, D. S. (1998)** Morphology of protein-protein interfaces. *Structure* **6**, 421-427.

**Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. Thornton, J. M. (1993)** PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **26**, 283-291.

**Liuzzi, M., Deziel, R., Moss, N., Beaulieu, P., Bonneau, A. M., Bousquet, C., Chafouleas, J. G., Garneau, M., Jaramillo, J., Krogsrud, R. L., Lagace, L., McCollum, R. S., Nawoot, S., Guindon, Y. (1994)** A potent peptidomimetic inhibitor of HSV ribonucleotide reductase with antiviral activity *in vivo*. *Nature* **372**, 695-698.

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

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

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

**Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frere, J. M., Mande, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A., Goraj K. (1996)** Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* **257**, 441-456.

**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**, 25106-25114.

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

**Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A., Hol, W.G.J. (1994)** Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein. Sci.* **3**, 810-821.

**Maquat, L. E., Chilcote, R., Ryan, P. M. (1985)** Human triosephosphate isomerase cDNA and protein structure. *J. Biol. Chem.* **260**, 3748-3753.

**Marin-Sanguino, A., Torres, N. V. (2002)** Modelling, steady state analysis and optimization of the catalytic efficiency of the triosephosphate isomerase. *Bull. Math. Biol.* **64**, 301-326.

**Masana, M., de Toranzo, E. G., Castro, J. A. (1984)** Reductive metabolism and activation of benzimidazole. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1041-1045.

**Mattos, C., Ringe, D. (1996)** Locating and characterizing binding sites on proteins. *Nature Biotechnology* **14**, 595-599.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

McMillan, K., Adler, M., Auld, D. S., Baldwin, J. J., Blasko, E., Browne, L. J., Chelsky, D., Davey, D., Dolle, R. E., Eagen, K. A., Erickson, S., Feldman, R. I., Glaser, C. B., Mallari, C., Morrissey, M. M., Ohlmeyer, M. H., Pan, G., Parkinson, J. F., Phillips, G. B., Polokoff, M. A., Sigal, N. H., Vergona, R., Whitlow, M., Young, T. A., Devlin, J. J. (2000) Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1506-1511.

Myers, D. P., Jackson, L. K., Ipe, V. G., Murphy, G. E., Phillips, M. A. (2001) Long-range interactions in the dimer interface of ornithine decarboxylase are important for enzyme function. *Biochemistry* 40, 13230-13236.

Noble, M. E., Wierenga, R. K., Lambeir, A. M., Opperdoes, F. R., Thunnissen, A. M., Kalk, K. H., Groendijk, H., Hol, W. G. (1991) The adaptability of the active site of trypanosomal triosephosphate isomerase as observed in the crystal structures of three different complexes. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 10, 50-69.

Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K. (1993) Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr.* D49, 403-417.

Nooren, I. M., Thornton, J. M. (2003) Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 325, 991-1018.

Opperdoes, F. R., Michels, P. A. (2001) Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *Int. J. Parasitol.* 31, 482-490.

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

Otwinowski, Z., Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods in Enzymology* 276, 307-326. Academic Press, New York.

Parthasarathy, S., Ravindra, G., Balaram, H., Balaram, P., Murthy, M. R. (2002) Structure of the *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase-phosphoglycolate complex in two crystal forms: characterization of catalytic loop open and closed conformations in the ligand-bound state. *Biochemistry* 41, 13178-13188.

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

Pérez-Montfort, R., de Gómez-Puyou, M. T., Gómez-Puyou, A. (2002) The interfaces of oligomeric proteins as targets for drug design against enzymes from parasites. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 457-470.

Peterson, S. A., Klabunde, T., Lashuel, H. A., Purkey, H., Sacchettini, J. C., Kelly, J. W. (1998) Inhibiting transthyretin conformational changes that lead to amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12956-12960.

Pettigrew, D. W. (1986) Inactivation of *Escherichia coli* glycerol kinase by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and N-ethylmaleimide: evidence for nucleotide regulatory binding sites. *Biochemistry* 25, 4711-4718.

Pettigrew, D. W. (1986) Inactivation of *Escherichia coli* glycerol kinase by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and N-ethylmaleimide: evidence for nucleotide regulatory binding sites. *Biochemistry* 25, 4711-4718.

Pompliano, D. L., Peyman, A., Knowles, J. R. (1990) Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 29, 3186-3194.

**Repiso, A., Boren, J., Ortega, F., Pujades, A., Centelles, J., Vives-Corróns, J. L., Climent, F., Cascante, M., Carreras, J. (2002)** Triosephosphate isomerase deficiency. Genetic, enzymatic and metabolic characterization of a new case from Spain. *Haematologica* **87**, ECR12.

**Richard, J. P. (1984)** Acid-base catalysis of the elimination and isomerization reactions of triose phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 4926-4936.

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

**Ringe, D. (1995)** What makes a binding site a binding site? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 825-829.

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

**Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R., Wierenga, R. (1996)** Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Sci* **5**, 229-239.

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

**Schwikowski, B., Uetz, P., Fields, S. (2000)** A network of protein-protein interactions in yeast. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1257-61.

**Seifert, R., King, D. A. Jr. (1982)** Identifications of some volatile constituents of *Aspergillus clavatus*. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 786-790.

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

**Stierle, A. A., Cardellina II, J. H., Singleton, F. L. (1991)** Benzothiazoles from a putative bacteria symbiont of the marine sponge *Tedania ignis*. *Tetrahedron Lett.* **32**, 4847-4848.

**Sun, J., Sampson, N. S. (1998)** Determination of the amino acid requirements for a protein hinge in triosephosphate isomerase. *Protein Sci.* **7**, 1495-1505.

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

**Symersky, J., Li, S., Carson, M., Luo, M. (2003)** Structural genomics of *Caenorhabditis elegans*: triosephosphate isomerase. *Proteins* **15**, 484-486.

**Tovar-Méndez, A., Mújica-Jiménez, C., and Muñoz-Clares R. A. (2000)** Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **123**, 149-160.

**Tsai, C. J., Lin, S. L., Wolfson, H. J., Nussinov, R. (1997)** Studies of protein-protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect. *Protein Sci.* **6**, 53-64.

**Tyler, K. M., Engman, D. M. (2001)** The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* **31**, 472-481.

**Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., Rothberg, J. M. (2000)** A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-627.

**Valdar, W. S., Thornton, J. M. (2001)** Protein-protein interfaces: analysis of amino acid conservation in homodimers. *Proteins* **42**, 108-124.

Vazquez-Contreras, E., Zubillaga, R. A., Mendoza-Hernandez, G., Costas, M., and Fernández-Velasco, D. A. (2000) Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein Peptide Lett.* 7, 57-64.

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

Velasco-Castrejón, O., Valdespino, J. L., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzman-Bracho, C., Magos, C., Llausas, A., Gutiérrez, G., Sepúlveda, J. (1992) Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública (Mex)* 34, 186-196.

Vitzthum, O. G., Werkhoff, P., Hubert, P. (1975) New volatile constituents of black tea aroma. *J. Agric. Food Chem.* 23, 999-1003.

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

Waley, S. G. (1973) Refolding of triosephosphate isomerase. *Biochem. J.* 135, 165-172.

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

Wierenga, R. K., Noble, M. E., Davenport, R. C. (1992) Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 224, 1115-1126.

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

**World Health Organization** ([www.who.org](http://www.who.org)).

**Zhang, X., Harrison, D. H., Cui, Q. (2002)** Functional specificities of methylglyoxal synthase and triosephosphate isomerase: a combined QM/MM analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14871-14878.

**Zabori, S., Rudolph, R., Jaenicke, R. (1980)** Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z. Naturforsch* **35C**, 999-1004.

**Zutshi, R., Franciskovich, J., Shultz, M., Schweitzer, B., Bishop, P., Wilson, M., Chmielewski, J. (1997)** Targeting the dimerization interface of HIV-1 Protease: inhibition with cross-linked interfacial peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 4841-4845.

## Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*

Alfredo Téllez-Valencia,<sup>a</sup> Santiago Ávila-Ríos,<sup>b</sup> Ruy Pérez-Montfort,<sup>a</sup>  
Adela Rodríguez-Romero,<sup>b</sup> Marieta Tuena de Gómez-Puyou,<sup>a</sup>  
Francisco López-Calahorra,<sup>c</sup> and Armando Gómez-Puyou<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70242, 04510 México, D.F. México

<sup>b</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70242, 04510 México, D.F. México

<sup>c</sup> Departamento de Química Orgánica, Universidad de Barcelona, Martí i Franqués 1-11 08028 Barcelona, Spain

Received 26 June 2002

### Abstract

We searched for molecules that selectively inactivate homodimeric triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), the parasite that causes Chagas' disease. We found that some benzothiazoles inactivate the enzyme. The most potent were 3-(2-benzothiazolylthio)-propanesulfonic acid, 2-(*p*-aminophenyl)-6-methylbenzothiazole-7-sulfonic acid, and 2-(2-(4-aminophenyl)benzothiazole-6-methylbenzothiazole-7-sulfonic acid. Half-maximal inactivation by these compounds was attained with 33, 56, and 8  $\mu$ M, respectively; in human TIM, half-maximal inactivation required 422  $\mu$ M, 3.3 mM, and 1.6 mM. In TcTIM, the effect of the benzothiazoles decreased as the concentration of the enzyme was increased. TcTIM has a cysteine (Cys 15) at the dimer interface, whereas human TIM has methionine in that position. In M15C human TIM, the benzothiazole concentrations that caused half-maximal inactivation were much lower than in the wild type. The overall findings suggest that the benzothiazoles perturb the interactions between the two subunits of TcTIM through a process in which the interface cysteine is central in their deleterious action. © 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

**Keywords:** Triosephosphate isomerase; *Trypanosoma cruzi*; Protein interfaces; Benzothiazoles; Interface cysteine

Chagas' disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. According to the World Health Organization, there are 18 million people in the Americas that are affected by Chagas' disease and about 90 million are at risk of contracting infection [1]. The current treatments of Chagas' disease are not satisfactory. Thus, there is an urgent need to develop new drugs. Important work along this line is being carried out in several laboratories (for reviews see [2]).

In view of its importance in glycolysis, some groups, including ours, have considered triosephosphate isomerase (TIM) from *T. cruzi* (TcTIM) and other parasites as target for drug design [3–5]. TIM is a homodimer that catalyzes the interconversion between glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. In all

TIMs, each monomer is formed by eight central  $\beta$  strands that are surrounded by eight  $\alpha$ -helices; the strands and helices are connected by loops. The interface occupies a large portion of the dimer (1476 Å<sup>2</sup>). An important portion of the interface is loop 3, which in each of the two subunits docks into the other subunit; the residues of loop 3 (70–80) also surround residue 15 of the adjoining subunit. By site-directed mutagenesis and chemical modification of residue 15, it has been shown that this portion of the interface is central in the stability of the dimer [4,6–9]. It has also been reported that a peptide that has the amino acid sequence of loop 3 of TIM from *Plasmodium falciparum* causes inactivation of the enzyme [10]. In TcTIM and in TIMs from *T. brucei* (TbTIM), *Leishmania mexicana*, *P. falciparum*, and *Entamoeba histolytica*, residue 15 is cysteine, whereas in human TIM, it is methionine. In addition, loop 3 of human TIM is one residue longer than in

\* Corresponding author. Fax: +52-55-56-22-56-30.  
E-mail address: apuyou@fisiol.unam.mx (A. Gómez-Puyou).

TcTIM and TtTIM. Because TIM is catalytically active only in its dimeric form [11,12], it has been proposed that the interactions between loop 3 and residue 15 of the enzymes from parasites could be targeted for drug design [3,4,10,13].

In this context, it is relevant to point out that the soaking of crystals of TcTIM in hexane revealed the presence of two hexane molecules in a part of the interface that is near cysteine 15 and loop 3 [14]. According to Mattos and Ringe [15], these sites represent potential binding sites for organic molecules in solution. Therefore, we hypothesized that some organic molecules could affect the interactions between the two monomers of TcTIM and cause its inactivation. In the search of such molecules, we found that micromolar concentrations of some benzothiazole derivatives inactivate TcTIM. The benzothiazoles also inactivate human TIM, but at much higher concentrations.

## Materials and methods

**Chemicals.** The benzothiazoles that were studied are given in Fig. 1. Except for 10 which was obtained from ICN, the rest were obtained from Aldrich. Compounds 1–8 were more than 95% pure; compound 9 was of unknown purity (Sigma–Aldrich Library of Rare Chemicals); and 10 was 75% pure. The two latter compounds were purified. For 9, 500 mg commercial product was stirred in 40 ml chloroform for 30 min; the residue was collected and taken to dryness. For the purification of 10, 250 mg product was mixed with 20 ml acetonitrile and stirred for 1 h. The residue dissolved in methanol was applied to a thin-layer chromatography plate and run in chloroform:methanol (2:1); the desired compound remained at the origin. It was eluted with methanol and taken to dryness. In thin-layer chromatography with acetonitrile:water (4:1), purified 9 and 10 showed a single UV absorbing spot.

**Enzymes.** All TIMs were recombinant products. For the purification of TcTIM, human TIM, TIMs from *T. brucei* and yeast, the methodologies described in [16–19] were followed. The M15C mutant of human TIM was prepared by polymerase chain reaction (PCR) using the "Expand High Fidelity PCR System" (Boehringer). The mutagenic oligonucleotides were 5'-ACTGGCAAGTGCACCGCCGGAAGC-3' (forward) and 5'-GCTTCGGCCCTGTGCATTCGCA T-3' (reverse). The PCR product was ligated to the pCR 2.1 vector (Invitrogen) and sequenced. Once the gene with the appropriate mutation was identified, it was subcloned into pET3a and introduced by transformation into BL21(DE3)pLysS cells (Novagen). For expression and purification of the mutant enzyme, the methodology used for the wild type was followed [17].

**Activity and assay of the inactivating action of the benzothiazoles.** Activity was assayed in the direction of glyceraldehyde 3-phosphate to dihydroxyacetone phosphate as described elsewhere [4] with 5 ng enzymes. For the inactivation studies, TIMs were incubated at a concentration of 5 µg/ml of 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, pH 7.4 at 36 °C. The mixture also contained the agents to be tested at the indicated concentrations. At various times, 1 µl was withdrawn and added to 1 ml reaction mixture for assay of activity. None of the agents tested affected the activity of *α*-glycerol phosphate dehydrogenase, the enzyme used for the trapping of the product. The average specific activity of TcTIM with 1 mM glyceraldehyde 3-phosphate as substrate was 3400 µmol/min/mg.

**Protein.** This was calculated according to Pace et al. [20]. The molar extinction coefficients for TcTIM, human TIM, and TIMs from *T. brucei* and yeast were 36,440, 33,460, 36,950, and 26,650 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, respectively.

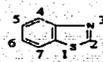
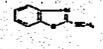
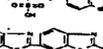
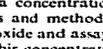
Compound	Structure	Inactivation (%)
1		25
2		0
3		0
4		14
5		4
6		47
7		8
8		95
9		91
10		95

Fig. 1. Effect of some benzothiazoles on TcTIM. The inactivating effect of the benzothiazoles at a concentration of 250 µM was studied as described under Materials and methods. Compounds 2 and 7 were dissolved in dimethyl sulfoxide and assayed in mixtures that had 2.5% (v/v) dimethyl sulfoxide; this concentration of dimethyl sulfoxide had no effect on TcTIM. (1) Benzothiazole, (2) 2-methylbenzothiazole, (3) 3-methyl-2-(3*II*)-benzothiazolone, (4) 3-methylbenzothiazole-2-thione, (5) 5-fluoro-2-methylbenzothiazole, (6) 2,5-dimethylbenzothiazole, (7) 2-(methylthio)benzothiazole, (8) 3-(2-benzothiazolylthio)-1-propanesulfonic acid, sodium salt, (9) 2-(*p*-aminophenyl)-6-methylbenzothiazole-7-sulfonic acid, (10) 2-(2-(4-aminophenyl)benzothiazole)-6-methylbenzothiazole-7-sulfonic acid, sodium salt.

## Results

The benzothiazoles that were assessed are given in Fig. 1. At a concentration of 250 µM, only some benzothiazoles inactivated TcTIM. For example, compound 3 had no effect, 1 brought about moderate inactivation, whereas 8, 9, and 10 caused strong inactivation. The effect of the latter three benzothiazoles on TcTIM was studied in more detail. Some experiments were also carried out with 1.

The inactivating effect of 1, 8, 9, and 10 was concentration dependent (Fig. 2). However, it is noted that the inactivating curves with 1, 8, and 9 were sigmoid, whilst that of 10 was hyperbolic. The  $I_{50}$ s for the various compounds in the inactivation of TcTIM were calculated by the equation:

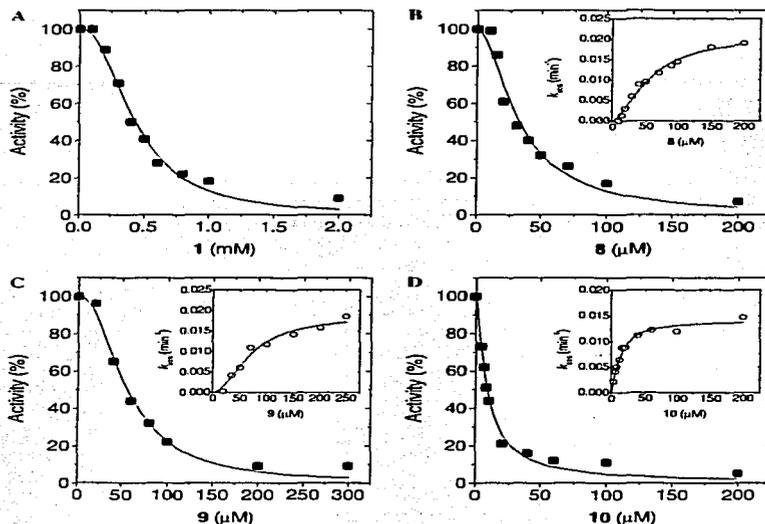


Fig. 2. Inactivation of TeTIM by different concentrations of **1**, **8**, **9**, and **10**. The effect of the indicated concentrations of benzothiazoles was determined as described under Materials and methods. The insets show plots of the pseudo-first-order rate constants at different concentrations of **8**, **9**, and **10**; these were determined from measurements of activity at different times of incubation with the indicated benzothiazole concentration.

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

taken from [21], where  $V_i$  indicates activity at a given concentration of the inactivating agent,  $V_o$  is the initial activity,  $I_{50}$  the concentration of the compound that induces half-maximal inactivation,  $I$  the concentration of the tested agent, and  $n$  is a measure of cooperativity. The  $n$  values of **1**, **8**, and **9** were near 2, suggesting that inactivation involved the action of two or more molecules. The  $n$  value of **10**, which has two covalently linked benzothiazole groups, was near 1. The  $I_{50}$  for **1** was 433  $\mu$ M. The  $I_{50}$ s for **8**, **9**, and **10** are given in Table 1.

Inactivation of TeTIM by all benzothiazoles increased with the time of incubation. The plots of the  $\ln$  of remaining activity versus time were linear, indicating that inactivation was a pseudo-first-order reaction. The first-order rate constants of inactivation at several concentrations of **8**, **9**, and **10** were obtained from the exponential decay of activity; these values were plotted against the benzothiazole concentration (insets in Fig. 2). The plots were not linear, instead they level off at relatively high concentrations. This pattern is characteristic of a process in which initial ligand binding is followed by enzyme inactivation in the enzyme–ligand complex [22].

Table 1

The  $I_{50}$ s for compounds **8**, **9**, and **10** on TIMs from *T. cruzi* (TeTIM), human (hTIM), *T. brucei* (TbTIM), yeast (yTIM), and the M15C mutant of human TIM (M15ChTIM)

Compound	TeTIM <sup>a</sup>	hTIM <sup>b</sup>	M15ChTIM	TbTIM	yTIM	<i>b/a</i>
<b>8</b>	33 $\mu$ M	422 $\mu$ M	120 $\mu$ M	4 mM	> 4 mM	13
<b>9</b>	56 $\mu$ M	3.3 mM	321 $\mu$ M	4 mM	> 4 mM	59
<b>10</b>	8 $\mu$ M	1.6 mM	74 $\mu$ M	100 $\mu$ M	> 900 $\mu$ M	200

Note. The experimental conditions were as in Fig. 2, except that the indicated TIMs were used. From the data of the concentration of **8**, **9**, and **10** versus activity, the respective  $I_{50}$ 's were calculated. The last column shows the ratio of  $I_{50}$  of human TIM/ $I_{50}$  of TeTIM.

### Effect of benzothiazoles on TIMs from human, yeast, and *T. brucei*

The aim of this work was to find agents that selectively inactivate TcTIM. Therefore, we determined the effect of **8**, **9**, and **10** on TIM from *Homo sapiens*. To this end, we followed exactly the protocol used for TcTIM. The benzothiazoles inactivated human TIM, but at concentrations much higher than those that inactivate TcTIM (Table 1). The ratio of the concentrations that induced half-maximal inactivation in human TIM and TcTIM was used as the selectivity index of benzothiazole action. It was 13 and 59 for **8** and **9**, respectively, and 200 for **10**.

The effect of benzothiazoles on TIM from *T. brucei* (TbTIM) and yeast (Table 1) was also studied. The three agents inactivated TbTIM, but relative to TcTIM, the concentrations that induced half-maximal inactivation were much higher. In yeast TIM, millimolar concentrations of the three agents did not cause appreciable inactivation (Table 1). Therefore, the agents seem to be quite specific for TcTIM.

### Effect of benzothiazoles on TcTIM at different concentrations of the enzyme

In regard to the action of benzothiazoles, it was considered important to determine if they act on the TcTIM dimer, or if they interfere with the association and dissociation of the monomers. As governed by the association constant between proteins, the ratio between TIM monomers and dimers depends on the protein concentration. For TIMs other than TcTIM, the dissociation constant has been calculated to be of the order of  $10^{-11}$  M [7,23]. The studies on the effect of **8**, **9**, and **10** on TcTIM at various concentrations of the enzyme showed that their detrimental effect decreased as the concentration of the

enzyme increased (Fig. 3). This suggests that the benzothiazoles act during the process of dissociation and association of the monomers. The data also show that the specific activity of TcTIM incubated at a concentration of 5  $\mu$ g/ml was about 20% lower than that of the enzyme incubated at 100  $\mu$ g/ml. Apparently, at the lower concentration, some of the TcTIM monomers were lost during the association–dissociation reaction.

### The interface cysteine of TcTIM and the action of the benzothiazoles

Table 1 shows that among the TIMs that were studied, TcTIM was the most sensitive to benzothiazole action. This indicates that the effect of benzothiazoles on the various TIMs depends on structural differences between enzymes. Along this line, the data of Fig. 3 suggest that some of these differences may be on the dimer interface. As noted, an important difference between the TcTIM and TIMs from human and yeast is that the former has a cysteine (Cys 15) at the dimer interface, whereas human and yeast TIM have, respectively, a methionine and leucine in that position. It has also been shown that amongst TIMs that have the interface cysteine, that of TcTIM is the most sensitive to thiol reagents [24]. Thus, we studied if the inactivating action of benzothiazoles was related to the existence of a cysteine in position 15. A mutant of human TIM in which its methionine 15 was replaced by cysteine was purified to homogeneity and characterized. The kinetics of M15C human TIM were similar to those of the wild type. The  $K_m$  and  $V_{max}$  of the wild type were 0.55 mM and 7550  $\mu$ mol/min/mg, respectively, whereas in the mutant, these values were 0.62 mM and 9670  $\mu$ mol/min/mg. With respect to the action of benzothiazoles, the data showed that the sensitivity of the mutant enzyme to **8**, **9**, and **10** was much higher than in the wild type, indicating that cysteine 15 of the dimer interface is related to the detrimental action of the benzothiazoles.

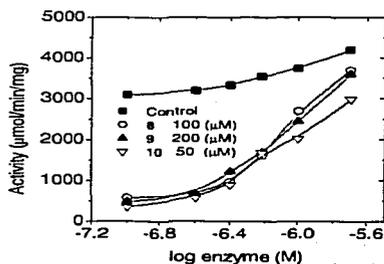


Fig. 3. Effect of compounds **8**, **9**, and **10** at different concentrations of TcTIM. The indicated concentrations of TcTIM were incubated with 100  $\mu$ M **8**, 200  $\mu$ M **9**, and 50  $\mu$ M **10**. The ordinate shows the specific activity of TcTIM after an incubation of 2 h.

### Discussion

Other groups have searched for agents that perturb the interactions between the two monomers of TIM from parasites. Singh et al. [10] found that a peptide that mimics loop 3 of TIM from *P. falciparum* inactivated the enzyme. Likewise, Kunz et al. [25] tested several peptides that mimicked the  $\beta$  turns of loop 3 on TIM from *T. brucei*; they found that the peptides did not affect the activity of that TIM, albeit they found that other peptides exerted inhibitory activity at low concentrations. Here, we describe that three benzothiazole derivatives inactivate TcTIM in the low micromolar range with high selectivity; **10** is 200 times more selective for the trypanosomal than for the human enzyme. These results indicate that benzothiazoles, in particular **8**, **9**,

and 10 can be used as leads for the design of molecules with a higher potency and selectivity for the enzyme from *T. cruzi*.

At this moment, the precise mechanism through which the benzothiazoles inactivate TcTIM cannot be defined. However, their action depends on the enzyme concentration, which suggests that they interfere with the association between the two monomers of TcTIM. This suggestion is substantiated by the findings that the sensitivity of human TIM to benzothiazoles was dramatically increased when its interface methionine 15 was substituted by cysteine, the residue that exists in TcTIM. Taken together, these findings suggest strongly that benzothiazoles perturb the intersubunit contacts of TcTIM and that its interface cysteine 15 is related to the detrimental action of the benzothiazoles.

Among the benzothiazoles that were assessed, the most potent were those that have a bulky hydrophobic substituent at C2 (8, 9, and 10 in Fig. 1). Fig. 1 also shows that the most potent benzothiazoles have a sulfonate group. In general, benzothiazoles are relatively insoluble in water; however, if they have a sulfonate group, millimolar concentrations can be easily solubilized in buffer at pH 7.4. The insolubility of some benzothiazoles precluded studies with compounds that lack a sulfonate group. For example, 2-[4-(dimethylamino)phenyl]-6-methylbenzothiazole and 2-phenyl benzothiazole, which are similar to 9, but lack the sulfonate group, were insoluble in buffer and in media with 10% dimethyl sulfoxide. In this regard, it is noted that 2.5 mM benzenesulfonic acid and sulfanilic acid did not affect TcTIM. Thus, the role of the sulfonate group could be to increase the solubility of benzothiazoles. However, it is also possible that they favor their interaction with the enzyme, since TcTIM has a pI of 8.5 and a positively charged residue in loop 3.

#### Acknowledgments

The authors are indebted to Dr. Rosario Muñoz Clares for helpful discussions. The technical assistance of Nallely Cabrera, María Isabel Chávez Uribe, and María Elena Orduña is greatly appreciated. This work was supported by Grant No. G27551M from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (to A.G.P.) and Grant No. IN200600 from Dirección General de Apoyo a Personal Académico, UNAM (to R.P.M.).

#### References

- [1] World Health Organization ([www.who.org](http://www.who.org)).
- [2] R. Perez-Montfort, A. Gomez-Puyou (Eds.), Perspectives in drug design against parasites, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2, 2002, pp. 425-503.
- [3] M.E. Noble, R.K. Wierenga, A.M. Lambair, F.R. Oppendoes, A.M. Thunnissen, K.H. Kalk, H. Groendijk, W.G. Hol, The adaptability of the active site of trypanosomal triosephosphate

- isomerase as observed in the crystal structures of three different complexes, *Protein Struct. Funct. Genet.* 10 (1991) 50-69.
- [4] A. Gomez-Puyou, E. Saavedra-Lira, I. Becker, R.A. Zubillaga, A. Rojo-Dominguez, R. Perez-Montfort, Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action studies with triosephosphate isomerase, *Chem. Biol.* 2 (1995) 847-855.
- [5] S.S. Velanker, S.S. Ray, R.S. Gokhale, H. Balaram, P. Balaram, M.R.N. Murthy, Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design, *Structure* 5 (1997) 751-761.
- [6] W. Schliebs, N. Thanki, R. Jaenicke, R.K. Wierenga, A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability, *Biochemistry* 36 (1997) 9655-9662.
- [7] V. Mainfroid, P. Terpstra, M. Beauregard, J.M. Frere, S.C. Mande, W.G. Hol, J.A. Martial, K. Goraj, Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer, *J. Mol. Biol.* 257 (1996) 441-456.
- [8] G. Garza-Ramos, R. Perez-Montfort, A. Rojo-Dominguez, M.T. de Gomez-Puyou, A. Gomez-Puyou, Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase, *Eur. J. Biochem.* 241 (1996) 114-120.
- [9] G. Hernandez-Alcantara, G. Garza-Ramos, G.M. Hernandez, A. Gomez-Puyou, R. Perez-Montfort, 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 (2002) 4230-4238.
- [10] S.K. Singh, K. Maithal, H. Balaram, P. Balaram, Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by interface peptides, *FEBS Lett.* 501 (2001) 19-23.
- [11] S.G. Waley, Refolding of triosephosphate isomerase, *Biochem. J.* 135 (1973) 165-172.
- [12] S. Zabori, R. Rudolph, R. Jaenicke, Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle, *Z. Naturforsch* 35C (1980) 999-1004.
- [13] K. Maithal, R. Gudihal, H. Balaram, P. Balaram, Inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by chemical modification of an interface cysteine: electro spray ionization mass spectrometric analysis of differential cysteine reactivities, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25106-25114.
- [14] X.G. Gao, E. Maldonado, R. Perez-Montfort, G. Garza-Ramos, M.T. de Gomez-Puyou, A. Gomez-Puyou, A. Rodriguez-Romero, Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 10062-10067.
- [15] C. Mattos, D. Ringe, Locating and characterizing binding sites on proteins, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 595-599.
- [16] P. Ostoa-Saloma, G. Garza-Ramos, J. Ramirez, I. Becker, M. Berzunza, A. Landá, A. Gomez-Puyou, M. Tuenade-Gomez-Puyou, R. Perez-Montfort, Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*, *Eur. J. Biochem.* 244 (1997) 703-705.
- [17] S.C. Mande, V. Mainfroid, K.H. Kalk, K. Goraj, J.A. Martial, W.G.J. Hol, 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 Sci.* 3 (1994) 810-821.
- [18] T.V. Borchert, K. Pratt, J.P. Zeelen, M. Callens, M.E. Noble, F.R. Oppendoes, P.A. Michels, R.K. Wierenga, Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant, *Eur. J. Biochem.* 211 (1993) 703-710.
- [19] E. Vazquez-Contreras, R.A. Zubillaga, G. Mendoza-Hernandez, M. Costas, D.A. Fernández-Velasco, Equilibrium unfolding of

- yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea, *Protein Peptide Lett.* 7 (2000) 57-64.
- [20] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.* 4 (1995) 2411-2423.
- [21] A. Tovar-Méndez, C. Mújica-Jiménez, R.A. Muñoz-Clares, Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase, *Plant Physiol.* 123 (2000) 149-160.
- [22] D.W. Pettigrew, Inactivation of *Escherichia coli* glycerol kinase by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and *N*-ethylmaleimide: evidence for nucleotide regulatory binding sites, *Biochemistry* 25 (1986) 4711-4718.
- [23] T.V. Borchert, R. Abagyan, R. Jaenicke, R.K. Wierenga, Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 1515-1518.
- [24] G. Garza-Ramos, N. Cabrera, E. Saavedra-Lira, M. Tuena de Gomez-Puyou, P. Ostoa-Saloma, R. Perez-Montfort, A. Gomez-Puyou, Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*, *Eur. J. Biochem.* 253 (1998) 684-691.
- [25] D.A. Kuntz, R. Osowski, M. Schudok, R.K. Wierenga, K. Muller, H. Kessler, F.R. Opperdoes, Inhibition of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with cyclic hexapeptides, *Eur. J. Biochem.* 207 (1992) 441-447.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN