

INGENIERIA DE INTERFASES EN LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE TRYPANOSOMA CRUZI Y DE HUMANO.

Cabrera, N., García-Torres, I, Torres-Larios, A, Díaz-Mazariegos, S y Pérez-Montfort R. Instituto de Fisiología Celular UNAM. Apto Postal 70600 Ciudad Universitaria, México D.F. Tel 56225657. Fax 56225630.
ncabrera@ifc.unam.mx

El interés por encontrar moléculas que inhiban selectivamente a la triosafosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) sin inhibir la de humano (HTIM) ha sido uno de los objetivos de nuestro grupo de trabajo. En 2002 Téllez-Valencia et al (1), encontraron benzotiazoles que inactivaron a la TcTIM de manera selectiva. Estos compuestos fueron el ácido 3-(2-benzotiazoliltilio)-propanosulfónico (compuesto 8), el ácido 2-(p-aminofenil)-6-metilbenzotiazol-7-sulfónico, y el ácido 2-(2-(4(4-aminofenil)benzotiazol-6-metilbenzotiazol-7-sulfónico). El 50% de la inhibición máxima para TcTIM por estos compuestos fue de 33, 56 y 8 μM , respectivamente, y para la HTIM la concentración fue de 422 μM , 3.3 mM y 1.6 mM, respectivamente. En este trabajo se sugiere que los benzotiazoles perturban las interacciones entre los monómeros a través de un proceso en el cual la cisteína de interfase juega un papel central en esta inactivación. Posteriormente en 2004, Téllez-Valencia et al (2), cristalizaron la TcTIM en presencia del compuesto 8 y encontraron que esta molécula está situada a menos de 4Å de distancia de varios residuos que forman parte de la interfase de la TcTIM; así mismo observaron que la región equivalente en la HTIM difiere en un aminoácido que pertenece a una zona de alta hidrofobicidad.

La construcción de proteínas quiméricas resulta de gran ayuda para explorar regiones de una enzima que pueden estar relacionadas con la estabilidad, actividad enzimática y/o sensibilidad a diferentes inhibidores. Es por ello que el presente trabajo tiene como finalidad construir dos proteínas quiméricas, de las dos especies mencionadas, que nos señalen las regiones de la TIM que estén implicadas en la sensibilidad a los compuestos benzotiazoles mencionados previamente.

Debido a que la TIM es un dímero cuya conformación tridimensional es un barril beta – alfa, que consta de ocho cadenas beta plegadas unidas por asas a ocho alfa hélices y sabiendo que los residuos de la interfase se encuentran principalmente en las asas 1 a 4, se decidió construir la primer quimera con las regiones 1 a 4 (aminoácidos 1 a 119) de la HTIM y las regiones 5 a 8 (aminoácidos 120 a 251) de la TcTIM: “Quimera H-Tc”. La segunda quimera se construyó con las regiones 1 a 4 (aminoácidos 1 a 119) de la TcTIM y 5 a 8 (aminoácidos 120 a 249) de la HTIM: “Quimera Tc-H”. Es importante recalcar que la Quimera H-Tc tiene la gran mayoría de los aminoácidos que forman la interfase igual que la HTIM y la Quimera Tc-H la gran mayoría de los aminoácidos que forman la interfase igual que la TcTIM.

Los genes quiméricos se mandaron a hacer por síntesis comercial en Genescript, se clonaron en plásmido de sobreexpresión pET 3a con una bandera de histidinas en el extremo amino y con sitio de corte para la enzima enterocinasa.

Ambas quimeras se sobreexpresan eficientemente, sin embargo, la Quimera H-Tc sólo es soluble en condiciones de alta fuerza iónica y carece de

actividad. La Quimera Tc-H se localiza en cuerpos de inclusión, sin embargo, usando novedosos sistemas de coexpresión con chaperonas se logra obtener una proteína soluble.

Bibliografía

1. Téllez-Valencia A, Avila-Ríos S, Pérez-Montfort R, Rodríguez-Romero A, Tuena de Gómez-Puyou M, López-Calahorra F, Gómez-Puyou A. Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jul 26;295(4):958-63.

2. Téllez-Valencia A, Olivares-Illana V, Hernández-Santoyo A, Pérez-Montfort R, Costas M, Rodríguez-Romero A, López-Calahorra F, Tuena De Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *J Mol Biol*. 2004 Aug 27;341(5):1355-65.