

00591

3

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CRISTALOGENESIS Y ANALISIS ESTRUCTURAL
DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE
Trypanosoma cruzi

T E S I S
Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
p r e s e n t a
ERNESTO MALDONADO OLVERA

Director de Tesis: Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou

México D. F.

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CONTENIDO

	Página
Créditos	1
Abreviaturas	2
Resumen	3
Abstract	4
INTRODUCCIÓN	5
Planteamiento del Problema	5
Antecedentes	5
La Enfermedad de Chagas	5
El ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	8
El diseño racional de drogas y el <i>T. cruzi</i>	8
¿Es la TIM un buen blanco para matar a <i>T. cruzi</i> ?.....	12
OBJETIVOS	15
Objetivo General y Objetivos Particulares	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
Purificación de triosafosfato isomerasa de <i>T. cruzi</i>	16
Obtención de los Cristales	18
Adquisición de los datos	19
Solución de la Estructura	20
Refinamiento	21
Validación	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
Capítulo I. Cristalización y análisis preliminar de rayos-x de la Triosa Fosfato Isomerasa de <i>Trypanosma cruzi</i>	24
Capítulo II. Diferencias en los contactos inter-subunidad de la Triosa Fosfato Isomerasa de dos trypanosomas estrechamente relacionados	25
DISCUSIÓN GENERAL	26
PERSPECTIVAS.....	28
APÉNDICE I. (Soluciones de Hampton)	30
APÉNDICE II (Factor R y R-libre)	33
LITERATURA CITADA	34

CRÉDITOS

Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou y en estrecha colaboración con los laboratorios de los Doctores Armando Gómez-Puyou y Ruy Pérez Montfort.

La difracción de rayos-x se realizó en colaboración con los Doctores Manuel Soriano-García, Abel Moreno y Kaliyamoorthy Panneerselvam. Se empleó un equipo de difracción de rayos-x ubicado en el Instituto de Química de la UNAM.

La mutante P24E de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* fue elaborada por Nallely Cabrera.

Los cálculos de área (Å^2) de interfase entre las subunidades de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* y de *T. cruzi* fueron realizados por el Dr. Arturo Rojo Domínguez de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

ABREVIATURAS

DTT	Ditiotreitol
DTNB	5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoato)
EDTA	Acido etilendiamino tetra-acético
MES	Acido (2(N-morfolino) etensulfónico)
MMTS	Metil-metano-tiosulfonato
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
TbTIM	Triosfosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM	Triosfosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TIM	Triosfosfato isomerasa

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es determinar mediante cristalografía de rayos-x la estructura de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM). *T. cruzi* es un parásito del hombre y causa la enfermedad de Chagas, que es un problema de salud importante para América latina. TcTIM es una enzima homodimérica, que participa en la vía de la glucólisis, en donde cataliza la interconversión de dihidroxiacetona fosfato en gliceraldehído 3-fosfato. Una vez obtenida la estructura tridimensional de TcTIM nuestro grupo intenta realizar el diseño "basado en estructura" de un compuesto que inhiba específicamente a la TIM de *T. cruzi* sin afectar a la TIM del humano. Lo anterior con la finalidad de lograr eliminar al parásito y curar la enfermedad de Chagas.

Se obtuvieron cristales de un tamaño óptimo (0.8 x 0.5 x 0.3 mm) que se irradiaron en un difractómetro de rayos-x. Se obtuvieron reflexiones hasta una resolución de 1.83 Å. El cristal es del grupo espacial $P2_12_12_1$ con una celda unitaria de dimensiones $a = 43.71$ Å, $b = 77.65$ Å, $c = 149.54$ Å, y $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. La estructura se obtuvo por reemplazo molecular empleando como modelo de búsqueda a la triosafosfato isomerasa de *T. brucei* (TbTIM), posteriormente se realizó un refinamiento con el programa XPLOR alternando ciclos de refinamiento manual con QUANTA. Se alcanzó un factor cristalográfico R de 19.1 % y un factor R-libre de 25.8 %. Las coordenadas se depositaron en la base de datos "PDB" (Protein Data Bank) con el código 1tcd.pdb.

Al analizar la estructura de TcTIM y compararla con la de TbTIM se encontraron diferencias significativas en el área de la interfase entre los monómeros. En particular, se observó que la región entre la hélice-1 de un monómero y la hélice-3 del otro monómero está más abierta en TcTIM que en TbTIM. Este fenómeno parece explicar el porqué TcTIM es mucho más sensible a agentes que modifican a residuos de cisteína, que en el caso de TbTIM. Lo anterior es una observación realizada en el laboratorio, en donde se estudió la sensibilidad de la única cisteína localizada en la interfase del homodímero a estos agentes modificantes. Con esta información se puede utilizar a dicha cisteína como guía para el diseño de un fármaco contra *T. cruzi*, ya que la TIM de humano carece de dicha cisteína.

ABSTRACT

This work was aimed to solve, by x-ray crystallography, the structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* (TcTIM). *T. cruzi* is a parasite that infect humans and cause the Chagas disease, this is an important health issue in Latin America. TcTIM is a homodimeric enzyme from the glycolytic pathway that catalyzes the reversible isomerization of glyceraldehyde 3-phosphate to dihydroxyacetone phosphate.

Our group is interested in a structure-based drug design of an specific inhibitor for TcTIM, effective against the Chagas disease, without affecting the TIM human enzyme.

Crystals were obtained (0.8 x 0.5 x 0.3 mm) that diffracted up to 1.83 Å. The space group was P2₁2₁2₁ and the unit cell parameters were a = 43.71 Å, b = 77.65 Å, c = 149.54 Å and $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. The structure was solved by molecular replacement using the triosephosphate isomerase from *T. brucei* (TbTIM) as the search model. The refinement was carried out by the XPLOR program and manual rebuilding was made with QUANTA. A final R crystallographic factor of 19.1 % (R_{free} = 25.8 %) was obtained at the end of the process. The coordinates were deposited in the PDB (Protein Data Bank) with the accession number 1tcd.pdb.

TcTIM was compared against TbTIM and significant differences were found at the dimeric interface there was an increased space between helix-1 and helix-3 from different monomers of TcTIM, than in the corresponding portion of TbTIM. This fact fits well with the previous observation from our group. TcTIM is more sensitive than TbTIM to agents that derivatize a cysteine residue at the dimeric interface. With these structural data, this cysteine could be used as a lead for rational drug design against *T. cruzi*.

INTRODUCCIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas es uno de los problemas de salud más importantes de América Latina y de México. Actualmente no existe un fármaco que pueda eliminar al parásito *Trypanosoma cruzi*, que es el organismo causante de dicho padecimiento. El interés de nuestro grupo es diseñar un compuesto inhibidor con alta especificidad de reconocimiento por la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM). Para ello se pretende emplear la metodología conocida como "diseño racional de drogas" o "diseño de drogas basado en estructura" que utiliza la estructura tridimensional de la enzima para identificar y originar dicho compuesto inhibidor. Para lograr este objetivo, es indispensable conocer la estructura tridimensional de TcTIM con la mayor precisión posible. Este trabajo describe como, empleando la técnica de cristalografía de rayos-x, se obtuvo la estructura de TcTIM a una resolución de 1.83 Å.

• ANTECEDENTES

LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *T. cruzi*, que es un protoctista flagelado transmitido al hombre al contacto con ciertos insectos hematófagos. Es una enfermedad curable en su fase aguda y mortal para el 40 % de los pacientes en la fase crónica. El 70 % de los individuos contagiados no presentan síntomas en la fase aguda por lo que no son tratados y llegan en el transcurso de entre 10 a 20 años a la fase crónica. En la fase crónica el 27 % de los enfermos desarrollan arritmias cardíacas que les llevan a una muerte repentina, el 6 % presenta daños digestivos (megavísceras) y el 3 % daños al sistema nervioso periférico.

La enfermedad de Chagas es endémica de 21 países de América, afectando a países sudamericanos, centroamericanos y a México. Ocurre principalmente en las zonas rurales por transmisión directa del vector al hombre y en zonas urbanas por transfusión sanguínea. Cada año se contagian 120,000 individuos por lo que actualmente hay entre 16 a 18 millones de infectados que representan el 4.5 % de la población total de estos 21 países, además de

que hay 100 millones de personas en riesgo de contraer dicha infección (Moncayo, 1997). Esta enfermedad causa una mortalidad anual de 40,000 personas y desde el punto de vista socioeconómico se estima que provoca la pérdida anual de \$ 8,150 millones de dólares, lo que representa el 2.5 % del producto interno bruto de América (WHO/CTD progress report, 1997).

Para la población mexicana no hay un cuadro claro de la prevalencia actual de la enfermedad de Chagas. En la Encuesta Serológica Nacional de 1987 se encontró que el 1.2 % de la población urbana es seropositiva. No obstante, en estudios realizados en zonas rurales existe una sero-prevalencia de entre el 10 al 85 % predominando las comunidades de los estados de Nayarit, Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, Guerrero, Veracruz, Querétaro y Zacatecas (Pérez, 1997).

La alta recurrencia en la transmisión por transfusión sanguínea que se dio entre 1980 y 1995 se debió a la falta de una prueba serológica de detección en los bancos de sangre. Por ejemplo se encontró que en las ciudades de Santa Cruz (Bolivia), Salamanca (Chile), Chaco (Argentina), Puebla (México) y Brasilia (Brasil), el 62, 29, 24, 18 y 15 % respectivamente, de la sangre disponible para transfusión sanguínea, estaba infectada con *T. cruzi* (Schmuñiz, 1991). Para el año de 1998 el contagio por transfusión sanguínea se ha reducido dramáticamente en los países con programas de control de Chagas (por ejemplo la iniciativa del cono sur o la iniciativa de los países Andinos) (Moncayo, 1997; WHO/CTD progress report, 1997).

La enfermedad fue descrita en 1909 por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, quien trabajaba como médico de sanidad de la comunidad de Minas Gerais en Brasil. El describió la relación entre el vector *Triatoma infestans* y la enfermedad (Chagas, 1909). El agente transmisor es un insecto hematófago que es conocido popularmente como "vinchuca", "barbeiro", "chipo" o "chinche besucona", este último alias se debe a que usualmente pica alrededor de la boca de las personas, atraído por el bióxido de carbono que exhalan.

La enfermedad de Chagas esta asociada con viviendas rurales de construcción pobre, ya que la "chinche besucona" se esconde en grietas u oquedades de las paredes y techos de

madera o bien en los intersticios de techos de lámina. Es durante la noche que el insecto sale de su escondite y pica a las personas cuando éstas duermen.

La enfermedad se presenta en dos etapas la aguda y la crónica. La fase aguda se observa después de un breve período de incubación. Entre el 2 y el 8 % de los casos presentan síntomas severos que llevan a la muerte (de Castro, 1993). En la mayoría de los casos, esta fase presenta muy pocos síntomas por lo que no es detectada por el médico. Si el diagnóstico se lleva a cabo en esta fase las probabilidades de cura son muy elevadas. Cuando la enfermedad no se detecta, el paciente llega a la fase crónica y para esta etapa no se conocen fármacos que puedan eliminar al parásito. En la fase crónica la mortalidad es cercana al 40 %, pero puede presentarse completamente asintomática. Durante la fase crónica es muy difícil de diagnosticar la presencia del parásito debido a la ausencia de tripanosomas en el torrente sanguíneo.

Existen muy pocos fármacos contra el *T. cruzi*, dos de ellos, el nifurtimox (Bayer 2502) y el benznidazole (Roche 7-1051) son los mas empleados. Con ellos se pueden curar hasta el 90 % de los casos durante la fase aguda, sin embargo son completamente ineficaces en pacientes en la fase crónica (de Castro, 1993). Lamentablemente ambos fármacos también producen severos efectos colaterales e incluso muy probablemente causen neoplasias (Bocchi, *et al.*, 1998). Por otro lado, ya se han encontrado cepas altamente resistentes a ambos fármacos (Murta y Romanha, 1998).

Actualmente, se ha encontrado que un compuesto fungicida conocido como el D0870 es capaz de prevenir la muerte en el 70 al 90 % de ratones tratados (Urbina *et al.*, 1996).

Es muy importante recalcar que las compañías farmacéuticas tienen poco o nulo interés en el desarrollo de fármacos contra la enfermedad de Chagas (Traub-Cseko y Momen, 1995) y esto se debe a que al ser una enfermedad relacionada con la pobreza, no hay garantía de recuperar lo invertido en términos económicos.

EL CICLO DE VIDA DE *T. cruzi*

El *T. cruzi* es un parásito intracelular obligado que no se replica extracelularmente y es transmitido por transfusión sanguínea, leche materna, trasplante de órganos, inoculación

accidental en el laboratorio, por vía transplacentaria y principalmente por contacto con las heces de insectos hematófagos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, género *Triatoma*. Usualmente cuando un *triatoma* o chinche pica al humano para alimentarse de su sangre, inmediatamente defeca. Los tripanosomas van en la excreta, en su forma de tripomastigote metacíclico. Cuando la persona se rasca internaliza al parásito en el piquete, o bien contamina sus dedos con los parásitos que se internalizan en las mucosas. Una vez en el torrente sanguíneo, esta forma invasiva o tripomastigote puede penetrar en las células reticuloendoteliales del hígado y bazo; en las células musculares de tipo liso, esquelético y cardíaco; así como también puede invadir células de los ganglios linfáticos, del esófago, del colon, de la piel, de las gónadas, de la mucosa intestinal, de la placenta, de la medula ósea o de células del sistema nervioso. Después de invadir una célula, el tripanosoma se convierte a su forma de amastigote y se replica constantemente por fisión binaria. Aproximadamente 5 días más tarde los parásitos se convierten nuevamente en tripomastigotes que son liberados a la circulación al romper la célula que ocupan. Inmediatamente después, los tripomastigotes en la sangre buscan otras células que invadir o bien son tomados por la chinche cuando pica y toma la sangre. Los tripomastigotes ingeridos por el insecto vector llegan a la porción posterior del intestino medio, en donde se transforman, entre los 8 a 10 días en epimastigotes metacíclicos que a su vez se diferencian en tripomastigotes metacíclicos y son eliminados por la heces.

EL DISEÑO RACIONAL DE DROGAS Y EL *T. cruzi*

En los Estados Unidos por cada fármaco que apruebe la FDA (Food and Drug Administration) se habrán sintetizado un promedio de 6200 compuestos, de los cuales solo 3 lograrán pasar a la fase de pruebas clínicas. Este proceso toma alrededor de 13 años y tiene un costo aproximado de \$ 350 millones de dólares (Petsko, 1996). En años recientes la manera tradicional de "ensayo y error" para encontrar drogas, está cambiando a un método dirigido más económico conocido como el "diseño racional de drogas" o "diseño de drogas basado en estructura" (Verlinde y Hol, 1994; Blundell, 1996; Hunter, 1997). Este método se basa en diseñar fármacos utilizando para ello el conocimiento de la estructura tridimensional de ciertas proteínas blanco.

En el año de 1992 se conocía la estructura de 220 proteínas resueltas por cristalografía de rayos-x (Verlind y Hol, 1995), hoy este número se ha incrementado a más de 7000. Este veloz incremento en la cantidad de estructuras cristalográficas de proteínas se debe principalmente a que cada vez hay mejores técnicas de biología molecular, lo que permite tener sistemas de expresión de los que se pueden obtener cantidades considerables de proteína para experimentos de cristalización. Y además, los métodos computacionales de cristalografía de rayos-x han sido mejorados de tal manera que el tratamiento de los datos es cada vez más eficiente y rápido.

El diseño racional de drogas consiste en la búsqueda sistemática, empleando simulaciones computacionales, de moléculas capaces de unirse con alta especificidad a la proteína blanco. Estas moléculas son buscadas en la base de datos CSD (*Cambridge Structure Database*) la cual contiene cientos de miles de compuestos. Una vez encontrado el o los compuestos candidatos, la especificidad de unión es mejorada varios ordenes de magnitud al cambiar adecuadamente sus propiedades. El paso siguiente es sintetizar químicamente el compuesto, o si está comercialmente disponible, adquirirlo para probar su efecto sobre la proteína blanco.

El diseño racional de drogas ha jugado un papel central en el descubrimiento de algunas drogas actualmente en uso clínico. Por ejemplo: anti-hipertensivos, anti-cancerígenos, anti-artríticos (Blundell, 1996) e inhibidores de la proteasa de aspártato del virus VIH (Wlodawer y Vondrasek, 1998).

Durante los últimos 3 años se ha descrito la estructura tridimensional de 4 enzimas de *T. cruzi* y sabemos de al menos 3 más que se encuentran en proceso de obtenerse. (ver tabla I). Dichas estructuras se obtuvieron por la técnica de cristalografía de rayos-X.

TABLA I

Proteínas de *Trypanosoma cruzi* cuya estructura ha sido resuelta por cristalografía de rayos-x

Proteína	Grado de Avance	Resolución (Å)	Referencias
Cruzaina	Estructura Completa	2.3	McGrath, <i>et al.</i> , 1995; Gillmor <i>et al.</i> , 1997
Tripanotion reductasa	Estructura Completa	2.3 y 2.9	Jacoby <i>et al.</i> , 1996; Zhang <i>et al.</i> , 1996
Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	Estructura Completa	2.8	Souza <i>et al.</i> , 1998
Triosa fosfato Isomerasa	Estructura Completa	1.83	Maldonado <i>et al.</i> , 1998; (este trabajo)
Hipoxantina fosforibosil transferasa	Análisis preliminar	2.0	Eakin, <i>et al</i> 1997
Tirosín amino transferasa	Análisis preliminar	2.7	Nowicki <i>et al.</i> , 1998
Deoxiuridina 5'-trifosfato nucleótido hidrolasa (dUTPasa)	Análisis preliminar	3.0	Bernier-Villamor, 1998

Una de esas enzimas es la tripanotión reductasa (Jacoby *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996), la cual regula el ambiente intracelular reductor y protege al parásito del estrés oxidativo (Fairlamb y Cerami, 1992). La ventaja que ofrece dicho blanco es que esta enzima no esta presente en el hombre. Por medio de la técnica de diseño racional de drogas se fabricó un compuesto derivado de la espermidina capaz de inhibir a la tripanotión reductasa de *T. cruzi* en condiciones "in vitro" (Bonnet *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha demostrado que, la inhibición de hasta un 85 % en la síntesis de esta enzima por *T. cruzi* no le produce a dicho parásito la muerte o la disminución en su tasa de reproducción, en condiciones de cultivos celulares (Tovar y Fairlamb, 1996). Lo anterior ha resultado en una controversia

acerca de si la inhibición de la tripanotión reductasa es realmente suficiente para matar al parásito (Wang, 1997).

Nuestro grupo cree que la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM) es un buen blanco si se desea matar al parásito (Ostoa-Saloma, *et al.*, 1997; Maldonado *et al.*, 1997).

La triosa fosfato isomerasa (TIM) realiza la interconversión entre dihidroxoacetona fosfato y gliceraldehido 3-fosfato. Actualmente se conoce la secuencia de nucleótidos de la TIM para 60 especies diferentes, también se conoce la estructura cristalográfica de la TIM de 10 organismos (ver tabla II). Cabe recalcar que entre las estructuras que se conocen está la TIM de humano, esto es importante desde el punto de vista del diseño racional de drogas.

La TIM es una enzima homodimérica en la que cada monómero tiene un peso molecular de 25 kDa. El monómero no es activo aunque posee todos los aminoácidos que participan en la catálisis. Sus propiedades catalíticas y el mecanismo de la reacción se han descrito con detalle (Knowles, 1991; Neria y Karplus, 1997; Harris *et al.*, 1997).

La estructura de la TIM consiste en 8 repeticiones "beta-asa-helice" arregladas de forma de un barril de hebras beta paralelas, rodeado de hélices alfa. El sitio catalítico se encuentra en el centro del barril. Esta es una estructura altamente recurrente en la naturaleza y es por eso que a este plegamiento se le ha denominado "Barril-TIM".

TABLA II

Enzimas TIM cuya estructura ha sido resuelta por cristalografía de rayos-x

Organismo	Tipo de organismo	Resolución (Å)	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Procarionte mesófilo	2.60	Noble <i>et al.</i> , 1993
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Procarionte hipertermófilo	2.80	Delboni, <i>et al.</i> , 1995
<i>Vibrio marinus</i>	Procarionte psicrófilo	2.70	Alvarez <i>et al.</i> , 1998
<i>Plasmodium falciparum</i>	Protoctista parásito del hombre	2.20	Velanker, <i>et al.</i> , 1997
<i>Trypanosoma brucei</i>	Protoctista parásito del hombre	1.83	Wierenga <i>et al.</i> , 1991
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Protoctista parásito del hombre	1.83	Maldonado <i>et al.</i> , 1998; (este trabajo)
<i>Leishmania mexicana</i>	Protoctista parásito del hombre	1.83	No publicado
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	1.90	Lolis <i>et al.</i> , 1990
<i>Gallus gallus</i>	Ave	1.80	Zhang <i>et al.</i> , 1994
<i>Homo sapiens</i>	Mamífero	2.80	Mande <i>et al.</i> , 1994

¿ES LA TIM UN BUEN BLANCO PARA MATAR A *T. cruzi*?

En los tripanosomas las reacciones de la glucólisis ocurren en un organelo especializado llamado glicosoma. La glucosa es transportada al interior del glicosoma y ahí es degradada hasta 3-fosfoglicerato, este producto sale del glicosoma y es oxidado hasta piruvato en el citosol (Tielens y Hellemond, 1998). En *T. cruzi* el piruvato entra a la mitocondria en donde es oxidado hasta bióxido de carbono, o bien es transformado en acetato. La TIM o triosafosfato isomerasa (EC 5.3.1.1) está en el interior del glicosoma, ahí realiza uno de los pasos de la glucólisis que es convertir a la dihidroxoacetona fosfato en gliceraldehido 3-fosfato.

El objetivo a largo plazo de nuestro grupo es diseñar un fármaco que inhiba selectivamente a la TIM de *T. cruzi* y como consecuencia el parásito muera.

Debido a que una disminución en la actividad de la TIM en los humanos puede provocar anemia hemolítica o disfunciones neurológicas progresivas (Orosz *et al.*, 1996) es

importante inhibir selectivamente a la TIM del parásito sin comprometer la actividad de la TIM humana.

Aquí cabe plantearse si el parásito morirá al perder la actividad de la TIM. Una forma directa de contestar esto sería interrumpir la expresión de la TIM en *T. cruzi* y medir su sobrevivencia y también su capacidad de infectar a células humanas en cultivo. Dicho experimento no ha sido realizado hasta ahora. Un experimento equivalente se llevó a cabo, pero sin éxito, en *T. brucei* que es el trypanosoma que produce la enfermedad del sueño en África (Lorenz *et al.*, 1998).

T. brucei muere al inhibir las funciones de su vía glucolítica, ya que dos compuestos (suramín y óxido de melarsen) cuyo blanco es la inhibición de enzimas glucolíticas, se emplean actualmente en tratamientos contra esta enfermedad (Clarkson y Brohn, 1976). Ello se debe a que *T. brucei* depende totalmente de la glucólisis para la síntesis de ATP ya que en su forma de tripomastigote, permanece y se multiplica en el torrente sanguíneo en donde sus mitocondrias no son funcionales (revisado por Sommer y Wang, 1994).

El ciclo de vida de *T. cruzi* es diferente ya que se multiplica en el interior de las células que invade y sus mitocondrias se encuentran funcionales durante todo su ciclo de vida. Aunque *T. cruzi* consume glucosa a niveles inferiores (10 veces) que *T. brucei* se ha determinado que la utilización de la glucosa es la vía metabólica preferida por el parásito (Cazzulo, 1992; 1994).

T. cruzi, al igual que otros trypanosomas se caracteriza por una alta flexibilidad de su metabolismo energético. Dicha flexibilidad es una adaptación que responde a los ambientes tan variables a los que se ve expuesto. Hay que recordar que *T. cruzi* pasa del tracto intestinal del insecto (epimastigote-extracelular) al torrente sanguíneo del hospedero humano (tripomastigote-extracelular), de ahí al interior de células humanas (amastigote-intracelular).

Casi todos los estudios del metabolismo energético en *T. cruzi* se han realizado utilizando cultivos de epimastigotes, que es la forma extracelular que permanece en el tracto intestinal del insecto, esto se debe a que los epimastigotes se pueden obtener fácilmente y en grandes cantidades de cultivos. Sin embargo cuando se comparó el metabolismo del epimastigote y del amastigote se encontraron diferencias importantes en los productos de

excreción. Por lo anterior se deduce que el metabolismo es diferente en ambas etapas del ciclo de vida de *T. cruzi* (Sanchez-Moreno *et al.*, 1995).

La forma de amastigote es estable y puede perdurar en un individuo entre 10 a 20 años llevandole a la forma crónica de la enfermedad de "Chagas". Por todo lo anterior es la forma de amastigote (y su metabolismo) la que tenemos que conocer para lograr predecir los alcances de un inhibidor selectivo de la TIM de *T. cruzi*.

Bakker y colaboradores (1997) modelaron matemáticamente el control de flujo del metabolismo glucolítico de *T. brucei*, alimentaron dicho modelo con los datos experimentales del comportamiento cinético y las constantes de equilibrio de todas las enzimas de la vía, las cuales se han purificado y estudiado (revisado en Sommer y Wang, 1994). El modelo resultante les permitió determinar la contribución al control de flujo de cada una de las enzimas participantes, e incluso probar las diferencias entre condiciones aerobias y anaerobias. Empleando el mismo modelo Eisenthal y Cornish-Bowden (1998) modelaron la inhibición de las enzimas de la glucólisis para saber si las enzimas glucolíticas son blancos adecuados para el diseño de inhibidores competitivos y/o no competitivos. Concluyeron que si se emplea un inhibidor competitivo, solo el transportador de piruvato puede ser empleado como blanco. Si se diseña un inhibidor no-competitivo e irreversible, es decir que produzca una inhibición del 100% de la glucólisis cualquier enzima de la vía se puede utilizar.

Si las predicciones del modelo fueran aplicables al metabolismo de *T. cruzi* quiere decir que el inhibidor que se diseñe de la TIM de *T. cruzi* debe ser no-competitivo y debe unirse en forma irreversible.

Differences in the Intersubunit Contacts in Triosephosphate Isomerase from Two Closely Related Pathogenic Trypanosomes

Ernesto Maldonado¹, Manuel Soriano-García², Abel Moreno³
Nallely Cabrera², Georgina Garza-Ramos²
Marietta Tuena de Gómez-Puyou¹, Armando Gómez-Puyou²
and Ruy Perez-Montfort^{2*}

¹Departamento de Genética Molecular

²Departamento de Bioquímica Instituto de Fisiología Celular

³Departamento de Bioestructura, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México 04510 México D.F., México

The aligned amino acid sequences of TIM from *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) and *Trypanosoma brucei* (TbTIM) have a positional identity of 68%. The two enzymes have markedly similar catalytic properties. Agents that interact with their interface Cys inhibit TcTIM and TbTIM; and those TIMs that lack this Cys (such as human TIM) are largely or completely insensitive to these agents. The susceptibility of TcTIM to the agents is approximately 100 times higher than that of TbTIM. To ascertain the cause of this large difference, the crystal structure of TcTIM was solved at 1.83 Å resolution. The two enzymes are very similar homodimers. In TcTIM and TbTIM their respective Cys, 15 or 14, forms part of the dimer interface. In both, the contacts of the Cys with residues of the other subunit are almost identical. Nevertheless, there are noteworthy differences between the two; the existence of glutamine 18 in TbTIM instead of glutamic acid in TcTIM at the beginning of helix 1 decreases the contacts between this portion of the protein and helix 3 of the other subunit. In addition, TcTIM has proline at position 24 in the first helix of the TIM barrel; this is absent in the other TIM. Pro24 disrupts the regular helix arrangement, making the pitch of this helix 1.2 Å longer than in TbTIM. When Pro24 of TcTIM was substituted for Glu, the sensitivity of TcTIM to sulfhydryl reagents increased about five-fold, possibly as a consequence of an increase in the space between the first portion of helix 1 and helix 3 of the other subunit. Therefore, it may be concluded that the geometry of the latter region is central in the accessibility to agents that perturb the interface Cys. In human TIM this region is more compact.

© 1998 Academic Press

*Corresponding author

Keywords: Chagas' disease; drug design; protein interface; triosephosphate isomerase; *Trypanosoma cruzi*

Abbreviations used: ASA, accessible surface area; DTNB, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid); MMTS, methylmethane thiosulfonate; TbTIM, triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*; TcTIM, triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*; TIM, triosephosphate isomerase; rms, root-mean-square; IPTG, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside.

E-mail address of the corresponding author: rmontfor@fisiol.unam.mx

Introduction

A general feature of enzymes is that in the evolutionary process there is conservation of their three-dimensional structure. For example, the crystal structures of homodimeric triosephosphate isomerase (TIM) from *Bacillus stearothermophilus* (Delboni *et al.*, 1995), *Escherichia coli* (Noble *et al.*, 1993a), *Trypanosoma brucei* (Wierenga *et al.*, 1991), *Plasmodium falciparum* (Velanker *et al.*, 1997), yeast (Lolis *et al.*, 1990), chicken (Banner *et al.*, 1975), *Homo sapiens* (Mande *et al.*, 1994) and *Vibrio marinus* (Alvarez *et al.*, 1998) show that their three-

dimensional structures are strikingly similar. Nonetheless, many evolutionary changes have occurred in the amino acid sequences of the protein. Indeed, the aligned amino acid sequences of TIM from 54 organisms that range from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei* to *H. sapiens*, reveal that only 30 of the approximately 250 amino acid residues that comprise the monomers are strictly conserved. The changes that took place in the evolutionary pathway did not exert strong influence on the catalytic properties of TIM, i.e. the enzymes that have been studied exhibit catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) that vary less than twofold. The stability of dimeric TIM from different species has been studied, and again the data (Lolis *et al.*, 1990; Zabori *et al.*, 1980; Borchert *et al.*, 1995; Mainfroid *et al.*, 1996; Landa *et al.*, 1997) indicate that they all have a high association constant between the two constituent monomers. Thus, substitutions, eliminations and insertions of amino acid residues that have occurred during evolution have hardly affected the structure, catalytic activity and stability of TIM. Nevertheless, the latter events have conferred to a given TIM species a particular individuality.

We searched in the structures of homologous TIMs for these apparently minor changes, and found that by targeting on non-conserved Cys, it is possible to induce inhibition of enzyme action with a high level of selectivity (Gomez-Puyou *et al.*, 1995; Garza-Ramos *et al.*, 1996). Species-specific abolition of catalysis can be achieved by perturbing a non-conserved Cys that lies at the dimer interface of TIM from *T. brucei*, *T. cruzi* and *Leishmania mexicana* (Gomez-Puyou *et al.*, 1995; Ostoa-Saloma *et al.*, 1997). For example, the yeast enzyme, which has the same Cys as TbTIM except for Cys14, is completely insensitive to sulfhydryl reagents that abolish catalysis in TbTIM (Gomez-Puyou *et al.*, 1995). Likewise, a mutant TIM from *T. brucei* in which Cys14 was changed for Leu was completely insensitive to sulfhydryl reagents that produced complete inhibition of catalysis in wild-type TbTIM. In human TIM, this Cys is replaced by Met, and thus, this enzyme is largely insensitive to agents that perturb the interface Cys of the trypanosomatid enzymes. However, the accessibility of TcTIM to agents that interact with its interface Cys is two orders of magnitude higher than in other TIM that have this particular Cys (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997; Maldonado *et al.*, 1997; Garza-Ramos *et al.*, 1998). Thus, TcTIM seems unique in the barriers that exist between the solvent and the interface residue.

TIM is a ubiquitous homodimeric enzyme that catalyzes the reversible isomerization between glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. The kinetics and energetics of the reaction (Albery & Knowles, 1976; Alber *et al.*, 1981; Nickbarg & Knowles, 1988; Knowles, 1991) are well established. We determined the crystal structure of TIM from *T. cruzi* (TcTIM) at 1.83 Å resolution and compared it to that of the closely related *T. brucei* (TbTIM). The two enzymes have an identity of 68% in their amino acid sequence

(Ostoa-Saloma *et al.*, 1997; and see Figure 1(a)). In position 2, TcTIM has Ala, which is absent from TbTIM; thus the sequence of TcTIM is displaced by one residue. The two enzymes have similar catalytic properties (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997), and both have the interface Cys (Cys14 and Cys15 in TbTIM and TcTIM, respectively). The purpose of these studies was to determine the structure of TcTIM, and to ascertain if enzymes from closely related organisms have structural peculiarities that allow a functional differentiation.

Considerable attention has been given to the structure of enzymes from pathogenic parasites, since they represent potential targets for drug design (Verlinde *et al.*, 1994). With this in mind, the crystal structure of TIM from *T. brucei* (Wierenga *et al.*, 1991), which causes sleeping sickness in man and Nagana in cattle, has been determined. With the same goal, the crystal structure of TIM from *P. falciparum* was established (Velanker *et al.*, 1997). The crystal structures of only four enzymes from *T. cruzi* have been reported: trypanothione reductase (Zhang *et al.*, 1996), cruzain (Jacoby *et al.*, 1996; McGrath *et al.*, 1995), hypoxanthine phosphoribosyl transferase (Eakin *et al.*, 1997) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Souza *et al.*, 1998), despite the fact that about 20 million people are affected by Chagas' disease in the Americas (World Health Organization, 1986).

Results and Discussion

General features of TcTIM structure

The C^{α} trace of the refined dimeric structure of TcTIM shows the typical α/β barrel structure that characterizes TIM (Figure 1(b)). Using the terminology of other TIMs, the α helices, β strands and loops are numbered 1 to 8 in subunits A and B. In TcTIM, the electron densities of the first two and three residues of monomers A and B at the respective N terminus are not well defined. The dimers of TcTIM and TbTIM were compared: the rms (root-mean-square) difference for 497 equivalent C^{α} atoms is 0.96 Å.

The main-chain coordinates of the two TcTIM monomers superimpose with an overall rms difference of 0.85 Å. During catalysis, loop 6 (residues 171 to 178) falls over the catalytic site (Pompliano *et al.*, 1990). In monomers A and B, loop 6 is in the closed and open conformations, respectively. This different arrangement of loop 6 accounts for the principal rms difference between the two monomers; the rms difference between the closed and open loops is 3.3 Å.

The B factors (Figure 1(c)) are higher in monomer A than in monomer B, with an overall average of 26 and 20 Å², respectively. The highest value was in Asp35, it is substantially higher in monomer A than in monomer B (58 and 41 Å², respectively). As in other TIMs (Noble *et al.*, 1993a; Wierenga *et al.*, 1991; Velanker *et al.*, 1997; Lolis

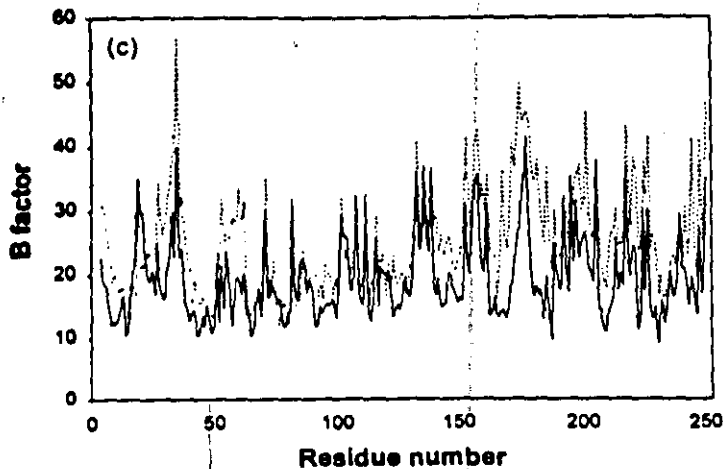
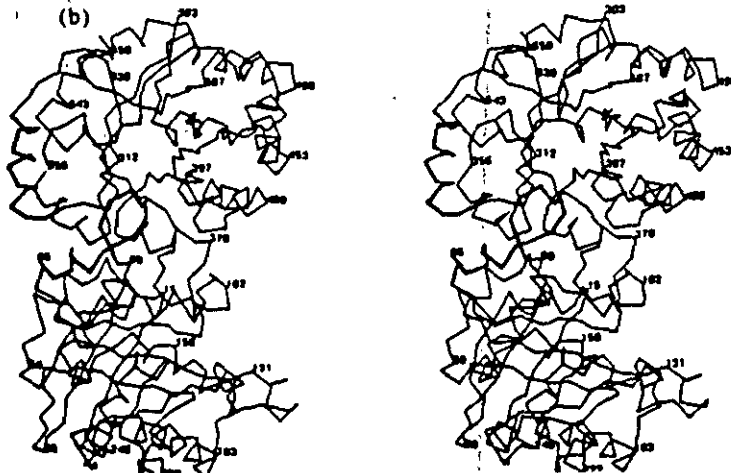
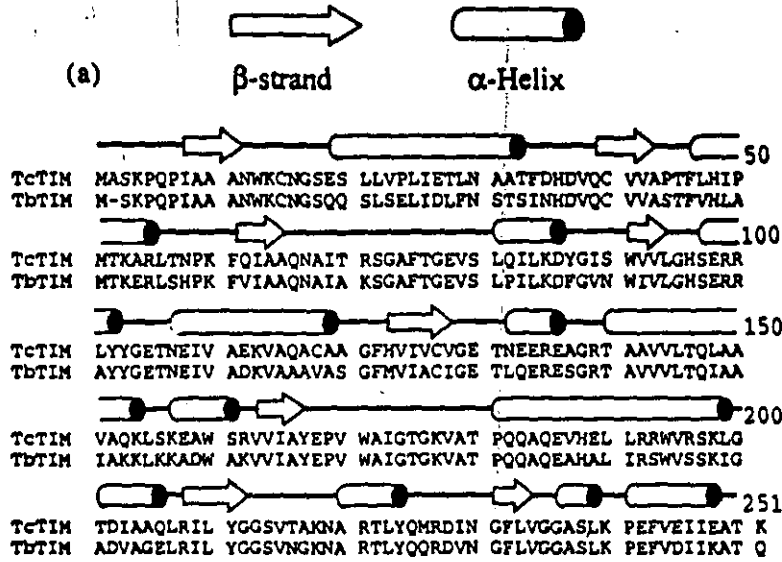


Figure 1. (a) The aligned amino acid sequences of TcTIM and TbTIM; secondary structure elements are indicated above the sequences. (b) Stereoview of the C α trace of TcTIM; numbers 1 to 250 and 301 to 550 are used to indicate the amino acid residues of monomers A and B, respectively. Helix 1 of monomer B and loop 3-helix 3 of monomer A are shown with bold lines. (c) B factors of monomers A (---) and B (—) of TcTIM.

et al., 1990; Banner *et al.*, 1975; Mande *et al.*, 1994; Delboni *et al.*, 1995), the residues of the loops that fall over the active center (171 to 178) also exhibit high *B* factors.

The active site

The structure of the active site has been thoroughly studied (Davenport *et al.*, 1991; Verlinde *et al.*, 1992; Noble *et al.*, 1993b). The residues of the active site in TIM are Lys14, His96 and Glu168; their arrangement in TcTIM is nearly identical with those of human TIM and TbTIM, but TcTIM exhibited a slight difference in the orientation of the side-chain of Glu168 (not shown). The rms differences between the catalytic residues Lys14, His96 and Glu168 in the closed monomers of TcTIM and TbTIM were 0.4, 0.2 and 1.2 Å, respectively. In the open conformation, the respective values were 0.3, 0.1 and 1.0 Å. The respective rms differences of the catalytic residues of TcTIM with those in human TIM were 0.7, 0.6 and 1.5 Å for the closed and 0.5, 0.5, 0.5 Å for the open conformations.

Ligands at the catalytic site of all TIMs are isolated from the solvent as a consequence of a conformational change of loop 6 that results in the covering of the catalytic center (Pompliano *et al.*, 1990). In the crystal structures of other TIMs, different conformations of loop 6 in the two TIM monomers have been observed; the data show that in occupied catalytic sites, loop 6 is in the closed state (Wierenga *et al.*, 1991). As noted, in TcTIM, loop 6 has different conformations in the two monomers; it is closed in monomer A, and open in monomer B. In this respect, it is relevant that in the former, the catalytic site has a diffraction that probably corresponds to a sulfate group or a water molecule. The presence of sulfate in the closed conformation of TbTIM has been described (Wierenga *et al.*, 1991). The rms difference between the equivalent atoms of the catalytic site residues for Lys14, His96 and Glu168 in monomer A and B were 0.36, 0.28, and 1.05 Å, respectively.

The interface between the two monomers of TcTIM and TbTIM

To calculate the loss of surface area that the monomer undergoes upon dimerization, the accessible surface area (ASA) of the dimer, as determined with a spherical probe of 1.4 Å radius (Lee & Richards, 1971), was subtracted from the ASA of the monomer alone. These buried surface areas in TcTIM were 1476 and 1491 Å² for monomers A and B, respectively. In TbTIM, these values were 1522 and 1533 Å². In TbTIM, 32 residues are within 4 Å from residues of the other subunit (Wierenga *et al.*, 1992). In TcTIM, 28 of these residues are conserved. The two enzymes differ in that TbTIM has Gln, Val, Ala and Phe at positions 18, 46, 49 and 86, respectively, whereas in TcTIM these residues are Glu19, Leu47, Pro50 and Tyr87.

A significant number of intersubunit contacts is provided by the residues of loops 1 and 3. Mutations of loop 1 residues in human TIM (Mainfroid *et al.*, 1996) and TbTIM (Gomez-Puyou *et al.*, 1995), or deamidation of Asn15 in rabbit TIM (Sun *et al.*, 1992) decrease dimer stability. Thus, the interactions of loop 1 with the other subunit appear central for dimer stabilization. The residues of loop 1 in TcTIM (Cys15 to Ser18) and TbTIM are identical (Figure 1(a)).

Of importance to this work is that in TcTIM and TbTIM, the side-chain of the interface Cys that lies at the beginning of loop 1 is buried within loop 3 of the other subunit. The electron density map of Cys15 in TcTIM and of the surrounding loop 3 residues is shown in Figure 2(a). The superposition of intersubunit contacts of the interface Cys of TbTIM and TcTIM shows an rms difference of 0.38 Å for 66 equivalent atoms in ten residues of loop 3 (Figure 2(b)). Therefore, a different arrangement of the interface Cys with the residues of loop 3 would not seem to account for the marked difference in sensitivity of TcTIM and TbTIM to sulfhydryl reagents (Garza-Ramos *et al.*, 1998; and see below).

Loop 1 is followed by helix 1. At the end of loop 1, TcTIM and TbTIM have a Ser. According to Richardson & Richardson (1988), Ser17 in TbTIM and Ser18 in TcTIM would represent the N-cap of the first helix. After the N-cap, the first residue of helix 1 of TbTIM is Gln18; its amide N is at H-bond distance from the O of the peptide bond between Asp85 and Phe86 of the other subunit. The carboxyl group O of Asp85 is also at H-bond distance from the N in the peptide bond between Ser17 and Gln18 (Figure 3).

In TcTIM, helices 1 and 3 are formed by residues 19 to 31 and 81 to 86, respectively (Figure 1(a)). In TcTIM, the arrangement at the beginning of helix 1 with the last residue of helix 3 differs markedly from that in TbTIM (Figure 3). In TcTIM, the orientation of the side-chain of the first residue of helix 1 from monomer B (Glu19) is such that its carboxyl group lies at a distance of 6.5 Å from the peptide bond between Asp86 and Tyr87 of the other subunit. Likewise, the carboxyl group of Asp86 from monomer A is 6.7 Å away from the N of the peptide bond between Ser18 and Glu19. In the other equivalent region of the TcTIM dimer, Glu19 of monomer A is also beyond H-bond distance from Asp86 and Tyr87 of monomer B. Nonetheless, the side-chain of Glu19 is oriented toward the inside of the protein in the latter region (not shown, but see Table 1). At this moment, the reason for the different conformations that Glu19 adopts in the two subunits is not clear.

The buried surface area of each residue of the two monomers was calculated and compared to those of TbTIM (Table 1). Except for Glu19 of monomer B and Asp86 of monomer A, the rest of the interface residues of the two enzymes exhibit markedly similar buried surface areas. In TcTIM, the buried surface area of Glu19 in monomer B is

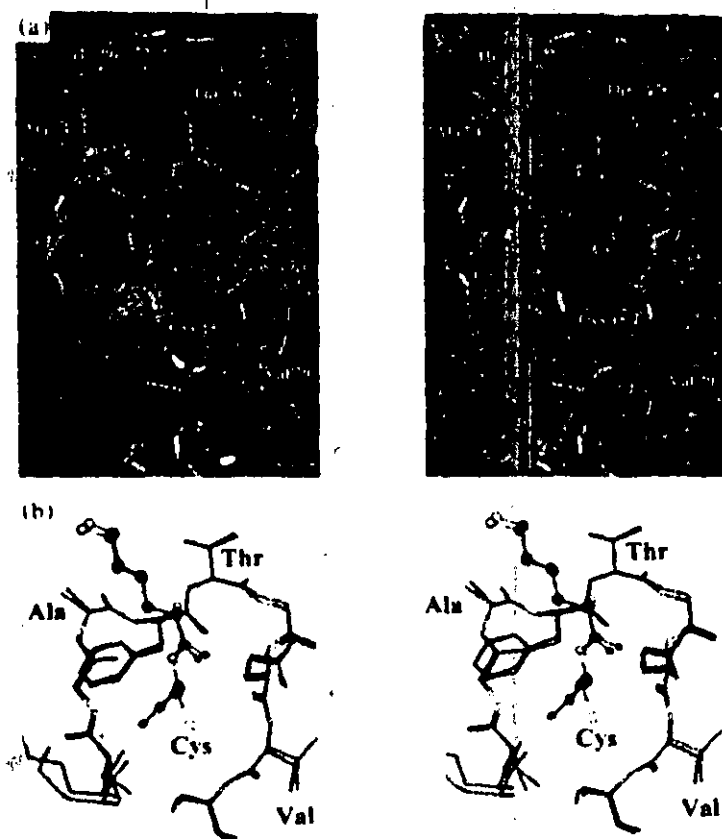


Figure 2. (a) Stereoview of the $3F_o - 2F_c$ electron density map contoured at 1σ of Cys15 of TcTIM and its surrounding loop 3 residues. (b) Stereoview of the interface Cys of TcTIM (orange) and TbTIM (green) and surrounding residues. The oxygen, nitrogen and sulfur atoms are represented in red, blue and yellow, respectively.

significantly smaller than in monomer A; in fact, Glu19 of subunit B hardly contributes to the dimer interface (Table 1). In contrast, the buried surface area of Asp86 is about twice as large in monomer B than in monomer A. In these portions of the protein, the electron densities are well defined.

The Connolly surface area (Connolly, 1983) of the interface of monomer B in human TIM, TbTIM and TcTIM is depicted by blue dots in Figure 4(a), (b) and (c), respectively. The right side of the Figure shows the electrostatic surface potential of monomer B attached to a ribbon representation of monomer A. It is evident in the three enzymes that there are differences in the contact region between the beginning of helix 1 of monomer B and helix 3 of monomer A. In TcTIM, there is a clear-cut separation of these two regions. In TbTIM, the gap is smaller. In human TIM, the separation is not apparent; the close packing is a consequence of Lys in position 18, whose side-chain amine group is within H-bond distance of the carboxyl group of Asp49 in helix 2. There are also H-bond contacts of the carboxyl group of Asp85 with the nitrogen atom of the peptide bond between Arg17 and Lys18 (Mande *et al.*, 1994). The differences in the separation of the two subunits in the three enzymes are apparent also when all atoms are considered (not shown).

Helix 1

The aligned amino acid sequence of the two enzymes shows that the least conserved region is in the first helix, which spans from residues 19 to 31 in TcTIM and from 18 to 30 in TbTIM (Figure 1(a)). In its outer surface, helix 1 is solvent-exposed; in its inner surface, it establishes hydrophobic contacts with residues of β -strand 1. A notable difference between the two enzymes is that TbTIM has Glu at position 23; its equivalent in TcTIM is Pro24. In helix 1 of TbTIM, Glu23 is H-bonded to Gln19. In TcTIM, the existence of a Pro disrupts the regular helix arrangement; thus, the length at which the helix backbone repeats itself between residues Ser20 and Pro24 is 1.2 Å longer in TcTIM than in TbTIM.

Effect of sulfhydryl reagents on TcTIM and TcTIM Pro24Glu

The position of Cys14 or Cys15 at the dimer interface of TbTIM and TcTIM explains why its substitution for another residue or its derivatization brings about destabilization of the enzyme and abolition of catalysis (Gomez-Puyou *et al.*, 1995; Garza-Ramos *et al.*, 1998). However, the susceptibility of Cys15 of TcTIM to sulfhydryl

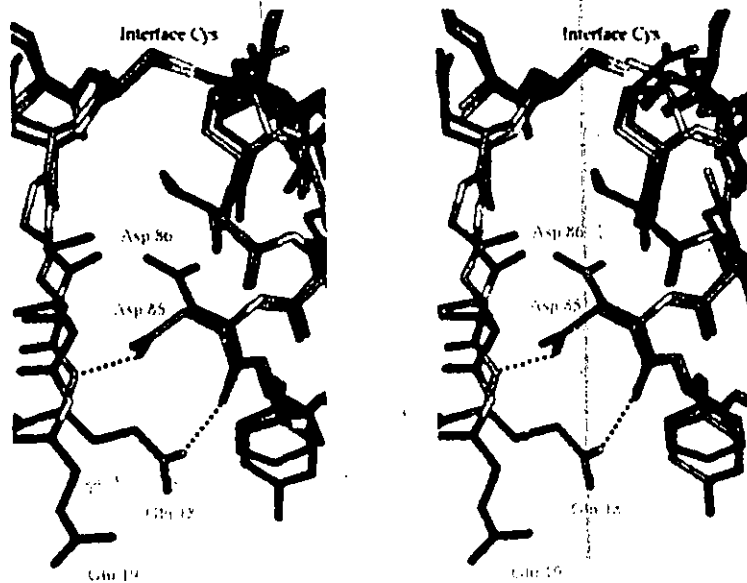


Figure 3. Stereoview of the region between the end of loop 1 in monomer B and a portion of helix 3 of the adjoining subunit. TcTIM and TbTIM are depicted in orange and green, respectively. The color-code for the atoms is as in Figure 2(b).

Table 1. Buried surface area (\AA^2) of interface residues of TcTIM and TbTIM

Residue	TcTIM Subunit A	Subunit B	Residue	TbTIM Subunit A	Subunit B
Asn12	6	6	Asn11	6	0
Lys14	28	26	Lys13	31	26
Cys15	126	125	Cys14	123	122
Asn16	32	31	Asn15	29	35
Gly17	17	20	Gly16	17	18
Ser18	23	24	Ser17	24	25
Glu19	47	0	Gln18	58	69
Ser20	3	0	Gln19	1	2
Thr45	26	25	Thr44	24	24
Phe46	67	65	Phe45	62	66
Leu47	145	143	Val46	123	127
His48	16	17	His47	19	21
Ile49	6	6	Leu48	5	6
Pro50	43	42	Ala49	28	27
Met51	7	16	Met50	7	6
—	—	—	Lys52	5	0
Gln66	35	37	Gln65	35	34
Asn67	7	6	Asn66	6	5
Ile69	13	12	Ile68	12	12
Ser72	14	16	Ser71	20	17
Gly73	45	42	Gly72	40	43
Ala74	51	60	Ala73	58	53
Phe75	49	50	Phe74	49	51
Thr76	145	144	Thr75	145	147
Gly77	65	66	Gly76	69	69
Glu78	67	67	Glu77	68	67
Val79	29	32	Val78	30	31
Ser80	1	2	Ser79	2	3
Ile83	90	90	Ile82	93	93
Leu84	8	9	Leu83	4	3
Asp86	26	58	Asp85	73	72
Tyr87	48	71	Phe86	71	70
Ile89	—	0	—	—	—
Val93	1	2	Val92	2	1
His96	8	7	His95	8	7
Glu98	37	40	Glu97	37	37
Arg99	49	47	Arg98	45	48
Tyr102	30	26	Tyr101	30	27
Tyr103	60	61	Tyr102	64	61
Ile173	1	0	Ile172	0	3
Gly174	3	0	—	—	—

reagents is more than 100-fold higher than that of TbTIM (Maldonado *et al.*, 1997). Kinetic data with TcTIM and TbTIM showed that the higher susceptibility of TcTIM is due to an increase in the accessibility of sulfhydryl reagents to Cys15 (Garza-Ramos *et al.*, 1998). It is also worth noting that a TcTIM mutant in which Cys118 (a Cys that is absent from TbTIM, see Figure 1(a)) was substituted for Val, exhibited the same sensitivity to sulfhydryl reagents as wild-type TcTIM, indicating that the effect of sulfhydryl reagents is due to derivatization of Cys14, and not to an effect on the "extra" Cys of TcTIM (Garza-Ramos *et al.*, 1998).

TcTIM and TbTIM have important differences in the interactions between helix 1 and the adjoining subunit, very likely as a consequence of the conformation of Glu19 in TcTIM versus Gln18 in TbTIM (Figures 3 and 4). Thus, the contribution of this region to the susceptibility to sulfhydryl reagents

was examined by measuring the effect of two such reagents on a mutant in which Pro24 of wild-type TcTIM was changed for Glu (the corresponding residue of TbTIM). The rationale was that the introduction of a H-bond between residues 20 and 24 would shorten the distance between the two turns of helix 1, without perturbing the hydrophobic interactions of helix 1 with the internal β -sheet. Presumably, the shortening of helix 1 would increase the gap between the first portion of helix 1 with helix 3 of the other subunit, and thus increase the accessibility of the sulfhydryl reagents to Cys15, even though the substitution was made for a residue that exists in TbTIM. Relative to the wild-type, the mutant enzyme exhibited an approximately fivefold increase in sensitivity to the reagents (Figure 5); data with TbTIM are included for comparison. Therefore, it would seem that the extent of separation between the beginning of helix 1 and the end of helix 3 is central for the accessibility of agents that perturb the interface Cys. Indeed, the overall data show that, as the size of the gap between the two helices increases (TbTIM > TcTIM > Pro24Glu TcTIM) the sensitivity to sulfhydryl reagents increases.

It is relevant to point out that in human TIM, this portion of the dimer interface is closely packed (Figure 4); moreover, in human TIM, the interface Cys of TcTIM and TbTIM is replaced by Met. Thus, this region of the protein seems to be a good target for the design of molecules that perturb the intersubunit contacts of TIM from the trypanosomatids with a high level of selectivity. In this context, it is worthwhile to recall that, in addition to *T. cruzi* and *T. brucei*, the pathogenic parasites *Entamoeba histolytica* (Landa *et al.*, 1997), *P. falciparum* (Velanker *et al.*, 1997) and *Giardia lamblia* (Mowatt *et al.*, 1994) have the interface Cys. Since TIM is essential in glycolysis, the enzyme appears to be a good candidate for rational drug design. In particular, the possibility of targeting the interface region between the beginning of the helix 1 and the end of helix 3 seems to deserve special attention.

Materials and Methods

Recombinant proteins

Recombinant wild-type TcTIM was expressed and purified as described (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997). The mutant TcTIM Pro24Glu was constructed by PCR using the Expand High Fidelity PCR System (Boehringer). The mutagenic oligonucleotides were 5'-TTGCTTGTA-GARCTCATCGA-3' and 5'-TCGATGAGYCTACAAG-CAA-3' (where R = G/A, Y = T/C). The mutant gene was ligated to the pCR 2.1 vector (Invitrogen) and transformed into the TG1 *Escherichia coli* strain. The mutation was confirmed by sequencing. An *Nde*I-*Bam*HI fragment of the gene was then subcloned into the pET23a expression vector and transformed into BL21(DE3)plysS cells (Novagen). Expression of TcTIM Pro24Glu was carried out at 37°C. Cells were induced at A_{600} 0.6 with IPTG (0.4 mM) and incubation continued overnight. The

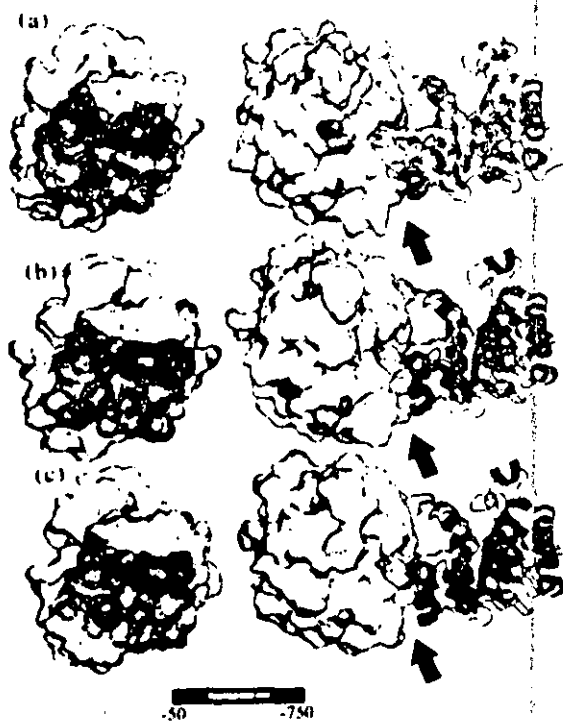


Figure 4. The left side of the figure shows the Connolly (1983) buried surface areas of the interface of monomer B from (a) human TIM, (b) TbTIM and (c) TcTIM; these areas are illustrated by blue dots. The right side shows the electrostatic surface potential of monomer B of the three TIMs attached to a ribbon representation of monomer A. To obtain the Figure, monomer B was rotated 90° and attached to the adjacent subunit. The arrows show the region between the beginning of helix 1 and helix 3. Methionine 14 of human TIM and the interface Cys of TbTIM and TcTIM are shown in yellow. The electrostatic potentials (kcal/mol) at the surface were calculated using the atomic charges. The scale is shown in the bar.

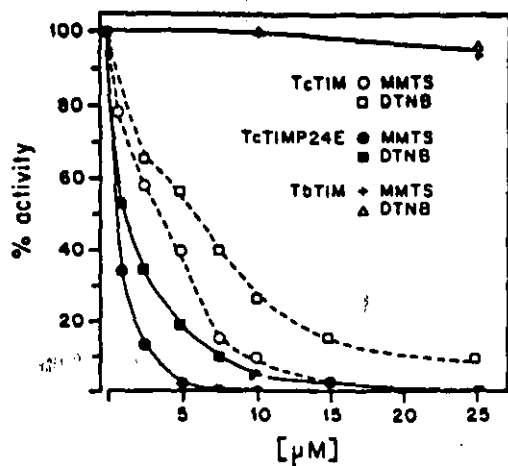


Figure 5. Effect of methylmethane thiosulfonate (MMTS) and 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) on the activity of wild-type TcTIM and the mutant Pro24Glu. Their effects on TbTIM are also shown. After incubation for two hours with the indicated concentrations of the sulphydryl reagents, aliquots were withdrawn for measuring activity (Carza-Ramos *et al.*, 1996). The K_m and V_{max} of the mutant enzyme were calculated from linear Lineweaver-Burk plots; these values were 0.6 mM and 5600 $\mu\text{mol}/\text{minute per mg}$, respectively. They are in the same range as those for wild-type TcTIM (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997). The results from three experiments varied by less than 10%.

purification of the mutant TIM was as described for wild-type TcTIM (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997).

Crystallization

TcTIM was crystallized by the hanging drop diffusion method by mixing 5 μl of 5 mg TcTIM/ml with 5 μl of the reservoir solution (0.1 M Na-Hepes (pH 7.5), 2% (v/v) PEG 400, 2.0 M ammonium sulfate). Orthorhombic crystals with an average size of 0.8 mm \times 0.5 mm \times 0.3 mm were obtained (Maldonado *et al.*, 1997). The crystals diffracted X-rays to 1.83 Å. Completeness in the last resolution shell was 58.9% (Table 2). The crystals belong to the space group $P2_12_12_1$, with cell dimensions $a = 43.71$ Å, $b = 77.65$ Å and $c = 149.54$ Å; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ($V = 507,551$ Å³, $V_M = 2.3$ Å³/Da, and $Z = 8$).

Data collection

Data were collected at 295 K from a single crystal with a Siemens three-circle goniometer HI-STAR area detector on a rotating anode (35 kV, 80 mA) utilizing monochromatized CuK α radiation ($\lambda = 1.54$ Å). The detector was mounted 100 mm from the crystal along the 2 θ arm. Data were collected by varying ϕ and ω with a 90 second exposure time for each frame; in all, 1500 frames were collected. The crystal remained stable during the entire data collection. At the end of the run, the crystal was dissolved and the enzyme exhibited approximately 50% of its original specific activity. Data were processed using the program SAINT. The numbers

of total and unique reflections were 132,483 and 42,089, respectively; overall R_{merge} was 10.9% on intensities.

Structure determination

The structure of TcTIM was determined by molecular replacement with the program XPLOR (Brünger, 1992) using as search model the structure of TbTIM (coded 5TIM at the Protein Data Bank); this enzyme and TcTIM had the same space groups, and in both, the dimer formed the asymmetric unit. Rotation and translation functions were calculated with XPLOR. The coordinates of TbTIM, transformed to the TcTIM cell, were used for computing structure factors. Dimeric TbTIM was subject to rigid-body refinement and an atomic model based on a $2F_o - F_c$ map consistent with the amino acid sequence of TcTIM (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997) was constructed using the program QUANTA.

Refinement

The refinement was initiated with the model having a crystallographic R factor of 0.438 (8 to 2.2 Å); at this stage, the electron densities of loop 6 residues 171 to 178 of monomer A were not clearly defined. The two monomers were refined independently. For each cycle, data with amplitudes larger than 2.5σ were used. For cross-validation, 10% of the observed reflections were randomly removed. The structure was refined with the program XPLOR using the Engh & Huber (1991) parameter files. Eleven rounds of refinement were interspersed with manual map fitting with QUANTA. In the first three cycles and in subsequent cycles, $2F_o - F_c$ maps and $3F_o - 2F_c$ maps were used, respectively. All maps were SIGMAA-weighted (Read, 1986). The two initial refinement cycles included reflections between 8 and 2.2 Å (24,053 in the working set); in subsequent cycles, 12,361 reflections were added step by step. In the last refinement cycle, there were 36,414 reflections in the working set and the resolution shell was 6 to 1.83 Å. The first three refinement rounds were made with either positional refinement or simulated annealing starting at 3000 K. At this point, $R = 0.226$ ($R_{\text{free}} = 0.296$). In the fourth cycle, torsion-angle molecular dynamics with slow-cool refinement (Rice & Brünger, 1994) was carried out from 2500 K in 3000 steps of 0.002 second. The R value dropped to 0.208 ($R_{\text{free}} = 0.272$). At the end of this refinement cycle and in later cycles, 165 water molecules were located by automatic searching with X-SOLVE from QUANTA using difference maps over 3σ . The peaks were chosen by visual inspection; water molecules were included only if their $F_o - F_c$ peaks correlated with

Table 2. Refinement Statistics

Number of Reflections (6.0-1.83 Å) $F > 2.5\sigma_f$	36,414
Initial model R factor/ R_{free} factor (%)	43.8/44.1
Final model R / R_{free} (%)	19.1/25.8
rmsd on bonds lengths (Å)/Angles (deg.)	0.013/1.7
rmsd on dihedral/improper angles (deg.)	24.7/0.97
Number of non-hydrogen atoms	
Protein/solvent	3818/165
Completeness (%)	
6.0-1.83 Å	82.0
1.94-1.83 Å	58.9

R factor = $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$. For determination of R_{free} 10% of all F_o were set aside as the test dataset and not used for the refinement.

a separate peak in the corresponding $2F_o - F_c$ map; in addition, such potential water molecules were accepted only if they were at a distance of 2.2 to 4.0 Å from H-bond donors or acceptors (Shah *et al.*, 1997). Water peaks with refined B-factors larger than 70 Å² were removed. Bulk-solvent correction (Jiang & Brünger, 1994) was applied using data between 20 and 1.83 Å; subsequent refinement was carried out by positional (in cycles 5, 6, 9, 10 and 11) or simulated annealing (in cycles 7 and 8). At this time, the R factor was 0.191 ($R_{free} = 0.258$). In the 10th and 11th refinement cycles, the R_{free} values converged. At this stage, the structure was tested (see below) and considered solved. The weak density of loop 6 in monomer A was reconstructed in the seventh refinement cycle using an omit map. At the end of each cycle, 40 steps of individual B-factor refinement were made, but the parameters that restrain atomic temperature factors were changed for the values reported by Tronrud (1996). This caused a drop of about 0.2% in R_{free} in each refinement cycle. The refinement statistics are shown in Table 2.

The average coordinate errors were calculated using cross-validated Luzzati analysis (Kleywegt *et al.*, 1994); the values for the working set and the test set were 0.21 and 0.26 Å, respectively. By cross-validated SIGMAA analysis (Brünger, 1997), the values were 0.24 and 0.25 Å for the working and test sets, respectively.

ASA were estimated with the program NACCES (S. J. Hubbard and J. M. Thornton, University College, London), which implements the algorithm of Lee & Richards (1971). ASA were determined with a spherical probe with a radius of 1.4 Å. Connolly surface areas (Connolly, 1983) at the dimer interface were generated with QUANTA.

Analysis

The model scored high in PROCHECK analysis (Laskowski *et al.*, 1993). The Ramachandran plot comprised a total of 441 non-glycine residues. There were 419 in the most-favored region, 21 in additional allowed regions, and one in the generously allowed regions. The position of catalytic Lys was as in other TIM, i.e. the dihedral ψ and ϕ angles of Lys in monomer A were -153.4° and 44.6° , and in monomer B, -149.6° and 50.9° , respectively. This Lys acquires an unusual conformation (Noble *et al.*, 1993a; Wierenga *et al.*, 1991; Velanker *et al.*, 1997; Lolis *et al.*, 1990; Banner *et al.*, 1975; Mande *et al.*, 1994; Delboni *et al.*, 1995) in order to place the side-chain in a position competent for catalysis.

Electron density was of good quality throughout the structure. For example, Figure 2(a) shows the $3F_o - 2F_c$ density map contoured to the 1 σ level in the region of the interface Cys15.

Accession numbers

Coordinates (ID code 1TCD) and structure factors (ID code 1TCD5F) have been deposited at the Brookhaven Protein Data Bank.

Acknowledgments

We thank Dr Arturo Rojo-Dominguez (Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa) for the calculation of accessible surface areas (ASA) given in Table 1. This

work was supported by grants IN206297 and IN208097 from DGAPA, UNAM to R.P.M. and A.G.P., respectively, and grant F514-E9306 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT to M.S.G. The data collection was carried out in the Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas "LUEP" at UNAM. E.M. was supported by fellowship 112472 from CONACYT.

References

- Alber, T., Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Rivers, P. S. & Wilson, I. A. (1981). On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triosephosphate isomerase. *Philos. Trans. Roy. Soc. ser. B*, **293**, 159–171.
- Albery, W. J. & Knowles, J. R. (1976). Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry*, **15**, 531–564.
- 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.
- 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. E., Priddle, J. D. & Waley, S. G. (1975). Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature*, **255**, 609–614.
- Borchert, T. V., Zeelen, J. Ph, Schliebs, W., Callens, M., Minke, W., Jaenicke, R. & Wierenga, R. K. (1995). An interface point-mutation variant of triosephosphate isomerase is compactly folded and monomeric at low protein concentrations. *FEBS Letters*, **367**, 315–318.
- Brünger, A. T. (1992). *XPLOR: Manual Version 3.1*, Yale University, New Haven, CT.
- Brünger, A. T. (1997). The free R-value: a more objective statistic for crystallography. *Methods Enzymol.* **277**, 366–396.
- Connolly, M. L. (1983). Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science*, **221**, 709–713.
- 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.
- 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.
- Eakin, A. E., Guerra, A., Focia, P. J., Torres-Martínez, J. & Craig, D. P. (1997). Hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi* as a target for structure-based inhibitor design: crystallization and inhibition studies with purine analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1686–1692.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond length and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallog. sect. A*, **47**, 392–400.

- Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Rojo-Domínguez, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. & Gómez-Puyou, A. (1996). Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteines of triosephosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* 241, 114-120.
- Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R. & Gómez-Puyou, A. (1998). Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity: triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem.* 253, 684-691.
- Gomez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R. A., Rojo-Domínguez, A. & Perez-Montfort, R. (1995). Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action - studies with triosephosphate isomerase. *Chem. Biol.* 2, 847-855.
- Jacoby, E. M., Schlichting, I., Lantwin, C. B., Kabasch, W. & Krauth-Siegel, R. L. (1996). Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase-mepacrine complex. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 24, 73-80.
- Jiang, J.-S. & Brünger, A. T. (1994). Protein hydration observed by X-ray diffraction: solvation properties of penicillopepsin and neuraminidase crystal structures. *J. Mol. Biol.* 243, 100-115.
- Kleywegt, G. J., Bergfors, T., Senn, H., Le-Motte, P., Gsell, B., Shudo, K. & Jones, T. A. (1994). Crystal structures of cellular retinoic acid binding proteins I and II in complex with all-trans-retinoic acid and a synthetic retinoid. *Structure*, 2, 1241-1258.
- Knowles, J. R. (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*, 350, 121-124.
- Landa, A., Rojo-Domínguez, A., Jimenez, L. & Fernandez-Velasco, A. (1997). Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur. J. Biochem.* 247, 348-355.
- 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.
- Lee, B. & Richards, F. M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* 55, 379-400.
- 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.
- Mainfroid, V., Terpstra, P., Beaugerard, M., Frère, J.-M., Mande, S. C., Hol, W. G. J., Martial, J. A. & Goraj, K. (1996). Three hTIM mutants that provide insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* 257, 441-456.
- Maldonado, E., Moreno, A., Panneerselvam, K., Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Soriano-García, M., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M. & Gomez-Puyou, A. (1997). Crystallization and preliminary X-ray analysis of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Protein Pept. Letters*, 4, 139-144.
- 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.
- McGrath, M. E., Eakin, A. E., Engel, J. C., McKerrow, J. H., Craik, C. S. & Fletterick, R. J. (1995). The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *J. Mol. Biol.* 247, 251-259.
- Mowatt, M. R., Weinbach, E. C., Howard, T. C. & Nash, T. E. (1994). Complementation of an *Escherichia coli* glycolysis mutant by *Giardia lamblia*. *Exp. Parasitol.* 78, 85-92.
- Nickbarg, E. B. & Knowles, J. R. (1988). Triosephosphate isomerase: energetics of the reaction catalyzed by the yeast enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 27, 5939-5947.
- Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A. C. & Martial, J. A. (1993a). Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallog. sect. D*, 49, 403-417.
- Noble, M. E. M., Zeelen, J. Ph. & Wierenga, R. K. (1993b). Structures of the "open" and "closed" state of trypanosomal triosephosphate isomerase, as observed in a new crystal form: implications for the reaction mechanism. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 16, 311-326.
- Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramirez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gómez-Puyou, A., Gómez-Puyou, M. T. & Pérez-Montfort, R. (1997). Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 244, 700-705.
- 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.
- Read, R. J. (1986). Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Crystallog. sect. A*, 42, 140-149.
- Rice, M. L. & Brünger, A. T. (1994). Torsion angle dynamics: reduced variable conformational sampling enhances crystallographic structure refinement. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 19, 277-290.
- Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (1988). Amino acid preferences for specific locations at the ends of (helices. *Science*, 240, 1648-1652.
- Shah, S. A., Shen, B. W. & Brünger, A. T. (1997). Human ornithine aminotransferase complexed with L-canavanine: structural basis for substrate recognition. *Structure*, 5, 1067-1075.
- Souza, D. H., Garrat, R. C., Araujo, A. P. U., Guimaraes, B. G., Jesus, W. D. P., Michels, P. A. M., Hannaert, V. & Oliva, G. (1998). *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: catalytic mechanism, and targeted inhibitor design. *FEBS Letters*, 424, 131-135.
- Sun, A. Q., Yüksel, K. Ü. & Gracy, R. W. (1992). Relationship between the catalytic center and the primary degradation site of triosephosphate isomerase: effects of active site modification and deamidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 382-390.
- Tronrud, D. E. (1996). Knowledge-based B-factor restraints for the refinement of proteins. *J. Appl. Crystallog.* 29, 100-104.
- Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, 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.
- Verlinde, C. L. M. J., Witmans, C. J., Pijning, T., Kalk, K. H., Hol, W. G. J., Callens, M. & Opperdoes, F. R.

- (1992). Structure of the complex between trypanosomal triosephosphate isomerase and *N*-hydroxy-4-phosphono-butanamide: binding at the active site despite an "open" flexible loop conformation. *Protein Sci.* 1, 1578-1584.
- Verlinde, C. L. M. J., Merrit, E. A., Van Den Akker, F., Kim, H., Feil, L., Delboni, L. F., Mande, S. C., Sarfaty, S., Petra, P. H. & Hol, W. G. J. (1994). Protein crystallography and infectious diseases. *Protein Sci.* 3, 1670-1686.
- 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. M. & 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.
- World Health Organization (1986). Research activities of the scientific working group on Chagas' disease 1982-1985. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81 (suppl.), pp. 180-244.
- Zabori, S., Rudolph, R. & Jaenicke, R. (1980). Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z. Naturforsch.* 35c, 999-1004.
- Zhang, Y., Bond, C. S., Hiley, S., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H. & Hunter, W. N. (1996). The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. *Protein Sci.* 5, 52-61.

Edited by I. A. Wilson

(Received 7 April 1998; received in revised form 8 July 1998; accepted 16 July 1998)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo es obtener la estructura tridimensional de la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* por cristalografía de rayos-X.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener cristales de la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* de buena calidad óptico-estructural, a partir de los cuales se pueda obtener un patrón de difracción de rayos-X.
- A partir de las reflexiones obtenidas resolver la estructura de la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* por reemplazo molecular, afinar la estructura y validarla.

MATERIAL Y MÉTODOS

PURIFICACIÓN DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *T. cruzi*

El gen de la TcTIM fue clonado por nuestro grupo y colocado en un vector de sobre-expresión en la cepa de *E. coli* BL23 (DE3) (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997). La TcTIM utilizada fue purificada siguiendo a Ostoa-Saloma y colaboradores (1997) (ver esquema 1). Brevemente; se parte de un cultivo de 1 litro de bacterias que se cosechan y se resuspenden en 40 ml de un amortiguador Mes 25 mM, EDTA 1mM, DTT 1mM y PMSF 0.2mM a pH 6.5. Esta suspensión se pasa 3 veces por una prensa de French a 1200 psi de presión y se centrifuga a 20,000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifuga a 115,000 x,g en un rotor 60 Ti (Beckman) durante 60 min a 4°C. Se realizan dos precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, primero al 45 % y luego al 75 % de saturación. La pastilla de proteína entre el 45 y 75% de saturación se resuspende en trietanolamina 25mM, EDTA 2mM, NaN_3 1mM y DTT 0.5 mM pH 8.0 (amortiguador A) y se aplica a una columna de exclusión por masa molecular tipo ACA 34A (3 x 80 cm) eluyéndose con el mismo amortiguador a un flujo de 15 ml/h. TcTIM eluye justo después de que 300 ml han pasado por la columna, las fracciones activas se juntan y se concentran por ultrafiltración utilizando membranas de AMICON PM10 a un volumen de 5 ml. Esta solución se aplica a una columna de intercambio iónico compuesta de carboxi-metil-sefarosa (Pharmacia) de un tamaño de 1.5 x 14 cm y se dejan pasar 60 ml del amortiguador A. La elución se realiza con el amortiguador A suplementado con NaCl 150mM, en ese momento se comienzan a coleccionar fracciones de 1ml a un flujo de 1ml cada 30 min. Entre las fracciones 18 a 23 se eluye la TcTIM. La enzima se almacena hasta por 3 meses en el refrigerador como un precipitado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70 % de saturación.

Con este protocolo se obtienen entre 18 a 25 mg de TcTIM con un alto grado de pureza según se determinó por electroforesis en geles desnaturalizantes teñidos con nitrato de plata. Esta enzima tiene una K_m por gliceraldehido 3-fosfato de 0.66 mM y exhibe una V_{max} de 9600 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Garza-Ramos *et al.*, 1998). Cada vez que se purificó la enzima estas constantes cinéticas fueron verificadas.

ESQUEMA I

Purificación de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*. (Todo el proceso es a 4°C)

Cosechar 1L de cultivo de *E. coli* en donde TcTIM se ha sobre-expresado



Ruptura de las células por prensa de French (1200 psi)



Centrifugaciones

- 1) A 20,000 x g - 15min (descartar precipitado)
- 2) A 170,000 x g - 60 min (descartar precipitado)



Precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

- 1) Agregar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 45% de saturación.
- 1) Agregar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 75% de saturación.

Exclusión por peso molecular en columna (3cm x 80cm) de resina ACA 34 A.
Eluyendo a un flujo de 15 ml/h



Concentrar fracciones activas



Cromatografía de intercambio iónico en columna (1.5cm x 14cm) con resina de carboxi-metil-sefarosa. Eluyendo con NaCl 150 mM



Juntar fracciones activas y almacenar a 4°C como una suspensión de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% de saturación.

OBTENCIÓN DE LOS CRISTALES

Para obtener los cristales se empleó el método de difusión de vapor en gota colgante (McPherson 1982). Se colocó una gota de 10 μ l en el centro de un cubreobjetos siliconizado, el cubreobjetos se invirtió y se depositó como la tapa de un reservorio que contenía el agente precipitante (0.7 ml). En los bordes del reservorio se colocó grasa de vacío y de esta manera al presionar ligeramente el cubreobjetos sobre el reservorio se crea un sello hermético. La gota del cubreobjetos se formó, colocando primero 5 μ l de proteína TcTIM (10 mg/ml) y después 5 μ l de agente precipitante tomado directamente del reservorio y mezclando por no más de 4 succiones y expulsiones de una pipeta mecánica (GILSON). Para los reservorios se emplearon cajas LIMBRO (para cultivo de tejidos) cada una con 24 reservorios o pozos. Las cajas una vez preparadas se manipularon cuidadosamente y se dejaron en un cuarto a temperatura ambiente (entre 18 a 24°C).

La proteína se almacena en una suspensión al 70 % de saturación con sulfato de amonio; para eliminar la sal se tomaron muestras que se centrifugaron a 12,500 rpm por 15 min y después se resuspendieron en amortiguador de trietanolamina 25mM pH 8.0. Se dializaron por 24 horas, a 4°C, contra 500 ml del mismo amortiguador realizando un cambio. A la TcTIM dializada se le determinó la concentración de proteína por medio de la absorbancia a 280 nm. El coeficiente de extinción molecular fue calculado de acuerdo a Pace y colaboradores (1995): 1 mg absorbe 1.28 de densidad óptica.

Para encontrar el agente precipitante que indujo la cristalización de TcTIM se ensayaron 50 soluciones diferentes que fueron obtenidas comercialmente de la compañía HAMPTON RESEARCH. La composición de estas soluciones se describe en el APENDICE I.

Para el ensayo inicial se probó una concentración de proteína de 5 mg/ml en la gota de 10 μ l, es decir 50 μ g totales de proteína. Las 50 condiciones se revisaron diariamente con un microscopio estereoscópico con fuente de luz en la base. A los 6 días de iniciado el ensayo se observó la aparición de un cristal pequeño en la condición Na-Hepes 100mM pH 7.5, Polietilenglicol 400 2 % (v/v) y 2.0 M de sulfato de amonio (No. 39 HAMPTON). Posteriormente se encontró que estos cristales crecen mejor si se utiliza una concentración de proteína de 2.5 mg/ml en la gota de 10 μ l (25 μ g). Estos cristales tienen una red del tipo

ortorrómbico, son reproducibles y alcanzan un tamaño óptimo en aproximadamente 2 meses. Nuestras observaciones nos llevaron a detectar que en esta misma condición pueden aparecer cristales de tipo tetragonal. En este trabajo la estructura de la TcTIM fue resuelta utilizando los datos del cristal ortorrómbico. Por lo que no entraremos en más detalles acerca del cristal tetragonal.

ADQUISICIÓN DE LOS DATOS

Para la solución de la estructura se emplearon los datos colectados de solo un cristal ortorrómbico. Este cristal de dimensiones 0.8 x 0.5 x 0.3 mm, se montó en el interior de un capilar de cuarzo de 1 mm de diámetro que fue sellado por sus extremos con cera. Los datos fueron tomados en un difractómetro SIEMENS utilizando radiación monocromática de $\text{CuK}\alpha$ (35 kV, 80mA), el capilar se colocó en una cabeza goniométrica y el cristal quedó ubicado a 100 mm de distancia de un detector de área HI-STAR. Se colectaron 500 imágenes, variando en cada una -0.2° el ángulo ω y dejando fijo el ángulo ϕ , luego se tomaron 500 más cambiando la posición del ángulo ϕ y variando nuevamente en cada imagen el ángulo ω , posteriormente se volvió a cambiar el ángulo ϕ y se tomaron 500 imágenes más con ángulos variables de ω . Al final de la colecta se habían obtenido un total de 1500 imágenes. Esta adquisición de datos duró aproximadamente 40 horas y el cristal permaneció estable todo el tiempo. Al finalizar la colecta de datos se recuperó el cristal, se disolvió en amortiguador y se determinó que la enzima tenía un 50 % de su actividad específica normal. Los datos se procesaron utilizando el programa SAINT (Siemens, 1993) se obtuvieron de 132,483 reflexiones totales, de las cuales 42,089 fueron únicas (Maldonado *et al.*, 1997). Entre los límites de resolución entre 20 y 1.80 Å hay 38,350 reflexiones, cuya distribución se muestra en la tabla III.

El cristal pertenece al grupo espacial $P2_12_12_1$, sus parámetros de celda unitaria son $a = 43.71 \text{ \AA}$, $b = 77.65 \text{ \AA}$, $c = 149.54 \text{ \AA}$, y $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. El volumen total de la celda unidad es de $507,551 \text{ \AA}^3$, el coeficiente de Mathews (V_M) es de $2.3 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, la unidad asimétrica la constituye un dímero y hay cuatro de ellos por celda unitaria, el número de moléculas en la celda (Z) es 8 y el 47.66 % de la masa del cristal es disolvente (Maldonado *et al.*, 1997).

Tabla III

Distribución de las reflexiones obtenidas del cristal difractado por rayos-x con respecto a los límites de resolución

Límites de resolución (Å)	No. de reflexiones
20 - 10	259
10 - 8.0	300
8.0 - 6.0	800
6.0 - 5.0	992
5.0 - 4.0	2189
4.0 - 3.0	5959
3.0 - 2.5	6833
2.5 - 2.2	7118
2.2 - 2.0	6802
2.0 - 1.9	3834
1.90 - 1.86	1543
1.86 - 1.83	1144
1.83 - 1.80	577

SOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA

Para resolver la estructura se empleó la técnica de reemplazo molecular (Rossmann, y Blow, 1962; Rossmann, 1990; Tickle y Driessen, 1996). En este método se utiliza, como modelo inicial de refinamiento, la estructura de una proteína homóloga a nuestra proteína problema. En nuestro caso se empleó la estructura de la TIM de *T. brucei* (TbTIM) la cual tiene una identidad de secuencia del 68 % con TcTIM. Esta estructura se obtuvo de la base de datos "PDB" (Protein Data Bank) y tiene el identificador "5tim.pdb". Esta estructura fue resuelta por cristalografía de rayos-x por Wierenga y colaboradores (1991) a una resolución de 1.83 Å. La celda unitaria es ortorrómbica con constantes de celda de: $a = 113.14$ Å, $b = 97.69$ Å, $c = 46.65$ Å y $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ y un grupo espacial $P2_12_12_1$.

El problema radica en que si bien las estructuras son similares se encuentran en medios cristalográficamente distintos, por lo que el reemplazo molecular consiste en mover

el modelo de búsqueda (en nuestro caso TbTIM) de su propia celda unitaria a la celda unitaria de la proteína problema. Para ello se empleó el programa XPLOR (Brünger, 1990; 1992) realizándose la búsqueda de 2 funciones: una de rotación y una de translación.

El primer paso consistió en transformar el modelo de búsqueda TbTIM en el modelo problema TcTIM. Para ello, 66 residuos de TbTIM fueron cambiados por los correspondientes de TcTIM con base en la secuencia de aminoácidos conocida (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997). Una vez realizados estos cambios se procedió a rotar y trasladar el modelo de búsqueda según las funciones obtenidas con XPLOR. Posteriormente se generó un mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc con datos de resolución entre 20 y 3 Å. Con este mapa se inspeccionó el modelo empleando el programa de visualización gráfica QUANTA, en una estación de trabajo SILICON GRAPHICS. Empleando QUANTA se procedió a acomodar la cadena principal y las cadenas laterales de los aminoácidos en el interior de sus densidades electrónicas. Luego se llevó a cabo una minimización considerando al dímero como un cuerpo rígido, lo que dio como resultado un valor del factor cristalográfico R de 44 %, que consideramos adecuado para iniciar el refinamiento. El factor R es un índice de la comparación de los factores de estructura observados y calculados, de tal modo que entre menor es este valor el modelo es más cercano a la realidad (ver el APENDICE II para una explicación del factor R).

REFINAMIENTO

Por medio del reemplazo molecular se obtuvo un modelo aproximado de la estructura de TcTIM. Sin embargo, los factores de estructura *calculados* con este modelo eran poco similares a los factores de estructura *observados*, esto se reflejó en un factor R de 43.8 %. Un modelo razonablemente correcto debe tener entre 15 a 20 % de factor R (Kleywegt y Brünger, 1996 y ver APENDICE II). Para mejorar el modelo se realiza el "refinamiento" el cual consiste en buscar conformaciones cercanas al arreglo actual pero que se reflejan en una disminución del factor R. El refinamiento fue realizado intercalando ciclos de refinamiento automático (XPLOR) con ciclos de ajuste manual (QUANTA). Se siguieron los valores de factor R y factor R-libre como índices del grado de progreso del modelo. El

significado del valor R-libre se explica en el APENDICE II, pero igual que el factor R una disminución refleja una mejoría del modelo.

El refinamiento se inició con las reflexiones comprendidas entre los 8 y 2.2 Å (24,053), se aplicaron 2 ciclos de refinamiento automático con el método de recocido simulado ("simulated annealing"), y después de cada uno de ellos se hizo un ciclo de refinamiento manual, ajustando la cadena principal y las cadenas laterales a la densidad electrónica de un mapa 2Fo-Fc. En estos ciclos manuales se visualizó la ausencia de densidad electrónica para los primeros 4 residuos del monómero A y para los 3 primeros residuos del monómero B, por lo que fueron eliminados del modelo. También se notó que densidad electrónica era debil para los residuos 171 al 178 del monómero A, que comprenden la región del asa 6 o asa catalítica (llamada así por que está sobre el sitio catalítico). El refinamiento por XPLOR fue restringido mediante los términos de energía para ángulos y enlaces descritos y desarrollados por Engh y Huber (1991). Después de los primeros tres ciclos de refinamiento el valor del factor R era de 22.6 % y el del factor R-libre de 29.6 %.

En los siguientes ciclos se agregaron reflexiones hasta tener 36,414 reflexiones (entre 6 y 1.83 Å). La distribución de las reflexiones agregadas en cada paso de la solución y refinamiento de la estructura se muestran en la tabla IV.

En los ciclos de refinamiento automático se combinaron metodologías como refinamiento posicional, recocimiento simulado y dinámica molecular de torsión de ángulo. A partir del tercer ciclo se agregaron moléculas de disolvente empleando la rutina XSOLVATE de QUANTA utilizando mapas de densidad electrónica Fo-Fc. Las moléculas de agua fueron inspeccionadas visualmente y aceptadas solamente si se encontraban a una distancia de entre 2.4 a 4.0 Å de un posible aceptor o donador de puente de hidrógeno. Al final se habían agregado un total de 165 moléculas de agua.

A partir del quinto ciclo se aplicó una corrección de solvente-global ("bulk-solvent correction") con las reflexiones entre 20 y 1.83 Å. El asa 6 se construyó durante el ciclo siete empleando un mapa 2Fo-Fc omitiendo los factores calculados de esa región. Los valores de R convergieron en los ciclos 10 y 11 con valores de factor R = 19.1 % y R-libre = 25.8 %, por lo que se consideró resuelta la estructura y procedió a validarse.

Tabla IV

Límites de resolución y número de reflexiones en las diferentes etapas de la solución y refinamiento de TcTIM, con respecto a los límites de resolución

Etapas de la solución o el refinamiento de TcTIM	Límites de Resolución (Å)	Número de reflexiones
Reemplazo Molecular	20 - 3.0	11,599
Ciclo 1 del refinamiento	8.0 - 2.2	24,053
Ciclo 2 del refinamiento	8.0 - 2.2	24,053
Ciclo 3 del refinamiento	6.0 - 1.86	35,270
Ciclo 4 del refinamiento	6.0 - 1.86	35,270
Ciclo 5 del refinamiento	6.0 - 1.83	36,414
Ciclo 6 del refinamiento	6.0 - 1.83	36,414
Ciclo 7 del refinamiento	6.0 - 1.83	36,414
Ciclo 8 del refinamiento	6.0 - 1.83	36,414
Ciclo 9 del refinamiento	6.0 - 1.83	36,414
Ciclo 10 del refinamiento	6.0 - 1.83	36,414
Ciclo 11 del refinamiento	6.0 - 1.83	36,414

VALIDACIÓN

Para confirmar la certeza del modelo, se calculó con XPLOR el error promedio de las coordenadas por medio de una análisis de tipo Luzzati (Luzzati, 1952; Kleywegt *et al.*, 1994) y SIGMAA (Brünger, 1997). Los valores obtenidos con ambos métodos estuvieron dentro del error promedio esperado para estructuras a esa resolución (Luzzati = 0.21 Å y SIGMAA = 0.24 Å). Para generar el gráfico de Ramachandran y obtener la estadística que se menciona en el Capítulo II de la sección de resultados se empleó el programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). Las coordenadas y los factores de estructura se depositaron por medio de INTERNET en la base de datos PDB con el identificador 1tcd.pdb.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I. Cristalización y análisis preliminar de rayos-x de la Triosa Fosfato Isomerasa de *Trypanosoma cruzi*.

RESUMEN: La Triosa Fosfato Isomerasa de *Trypanosoma cruzi* se cristalizó a temperatura ambiente, en un medio con Hepes-Na 0.1 M pH 7.5, PEG 400 (v/v) 2% y Sulfato de amonio 2.0 M. El cristales ortorrómbico pertenece al grupo espacial $P2_12_12_1$ y con dimensiones de la celda de: $a = 43.71 \text{ \AA}$, $b = 77.65 \text{ \AA}$, $c = 149.54 \text{ \AA}$ y $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Además se obtuvo otro tipo de cristal, que es tetragonal y con dimensiones de la celda de: $a = b = 56.16 \text{ \AA}$, $c = 161.85$ y $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ en el que dos grupos espaciales son posibles: $P4_12_12$ o $P4_32_12$. Ambos cristales difractan a más de 1.86 \AA de resolución.

CAPITULO II. Diferencias en los contactos Inter-subunidad de la Triosa Fosfato Isomerasa de dos trypanosomas estrechamente relacionados.

RESUMEN: El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la triosa fosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) y la de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) da como resultado una identidad del 68%. Ambas enzimas muestran propiedades catalíticas similares entre sí. Compuestos que modifican grupos sulfidrilos y que interaccionan con un residuo de cisteína localizado en la interfase, inducen la inhibición tanto de TcTIM como de TbTIM. Sin embargo, la sensibilidad de TcTIM, a estos compuestos, es aproximadamente 100 veces mayor que la susceptibilidad mostrada por TbTIM. Para entender las causas de estas diferentes sensibilidades se resolvió la estructura cristalográfica de TcTIM a 1.83 Å de resolución. Las dos enzimas son homodímeros muy similares entre si. La cisteína 15 de TcTIM o la cisteína 14 de TbTIM, forman parte de la interfase dimérica y los contactos que establecen con los residuos de la subunidad adyacente son casi idénticos en ambos casos. Sin embargo existen diferencias importantes; en TcTIM la presencia de un ácido glutámico (en posición 19), en vez de una glutamina como en TbTIM, reduce el área de contacto entre el inicio de la hélice 1 de una subunidad y la hélice 3 de la otra subunidad. También, la TcTIM posee una prolina en la hélice 1 en posición 24 que no se encuentra en las enzimas TIM de otros organismos. La Pro24 rompe el arreglo regular de la primera hélice del barril tipo TIM y hace que el primer giro de la hélice sea 1.2 Å mas extenso que en la hélice correspondiente de TbTIM. Cuando se sustituyó a la Pro24 por un ácido glutámico, la sensibilidad de la enzima mutada a los compuestos modificadores de cisteínas se incremento 5 veces. Esto ocurrió posiblemente como consecuencia de un ensanchamiento en el espacio entre la parte inicial de la hélice 1 de una subunidad, y de la hélice 3 de la otra subunidad. Por esta razón se puede concluir que el arreglo de esta región juega un papel central en la accesibilidad de los compuestos que perturban a la cisteína en la interfase. En la enzima TIM de humano esta región es más compacta.

DISCUSIÓN GENERAL

La cristalografía de rayos-x es una técnica poderosa ya que permite determinar la estructura tridimensional de las proteínas a una alta resolución. El primer paso de esta técnica consiste en la obtención de cristales que deben ser de buena calidad óptico-estructural para poder someterse a la difracción de rayos-x. En el capítulo I (Maldonado y colaboradores, 1997 *Prot. Peptide lett.* 4, 139-144) se describe el camino seguido para encontrar las condiciones en donde se obtuvieron cristales de la TcTIM, y además se describe el análisis preliminar de dichos cristales. Se menciona que se obtuvieron dos tipos de cristales: ortorrómbicos y tetragonales. Los cristales ortorrómbicos demostraron tener una mayor estabilidad (estables por más de 40 horas de irradiación de rayos-x) que los tetragonales (decaeron en 8 horas de irradiación de rayos-x). También los cristales ortorrómbicos arrojaron el doble de reflexiones únicas que las obtenidas de los cristales tetragonales (ver tabla II del capítulo I). Por todo lo anterior se decidió resolver la estructura de TcTIM con los datos colectados de la irradiación del cristal ortorrómbico.

La estructura de TcTIM se obtuvo empleando la metodología de reemplazo molecular que se refinó a valores adecuados del factor R y R-libre (ver capítulo II; Maldonado y colaboradores, 1998 *J. Mol. Biol.* 283, 193-203). La estructura resultante nos permitió realizar un análisis detallado del arreglo tridimensional de TcTIM. El objetivo que se planteó para este trabajo fue determinar la estructura cristalográfica de TcTIM y fue alcanzado. Dicha estructura cristalográfica puede ser ahora utilizada para el diseño de una droga contra el *T. cruzi*. Algunas sugerencias de como realizar este trabajo se encuentran más adelante en la sección de "perspectivas".

Como se observa en la tabla I del capítulo I, y como ha sido confirmado posteriormente (Garza-Ramos et al., 1998), TcTIM es aproximadamente 100 veces más sensible que TbTIM a agentes modificadores de grupos SH y que actúan sobre la *cisteína de la interfase*. Este hecho planteó la siguiente pregunta: ¿Por qué los compuestos modificadores de grupos SH llegan con mayor facilidad a la *cisteína de la interfase* en TcTIM que en TbTIM?. Esta pregunta es relevante a la luz de la propuesta hecha por nuestro grupo de utilizar a la *cisteína de la interfase*, tanto en TbTIM como en TcTIM,

como guía para diseñar un compuesto que inhiba a esta enzima eliminando a los tripanosomas durante su infección. (Gómez-Puyou et al., 1995; Ostoa-Saloma et al., 1997; Garza-Ramos et al., 1998; Maldonado et al., 1998).

La pregunta anterior fue resuelta en este trabajo a partir de una comparación minuciosa de las estructuras cristalográficas de TcTIM y TbTIM (ver figuras 2b, 3 y 4 del capítulo II). En este análisis se encontró que la interfase de TcTIM se encuentra más abierta que en TbTIM, en la región donde se conectan la hélice-1 (residuos 18 a 30), de un monómero con la hélice-3 (residuos 81 a 86) del otro monómero.

Lo anterior sugiere que la mayor apertura de la interfase de TcTIM provoca una mayor accesibilidad de la *cisteína de la interfase* a los modificadores químicos ensayados.

La mutante TcTIM-P24E se diseñó esperando aumentar aún más la apertura de la interfase entre la hélice 1 de un monómero y la hélice 3 del otro monómero. La sensibilidad aumentada de TcTIM-P24E a los agentes modificadores de residuos de cisteína DTNB y MMTS (ver figura 5 del capítulo I) nos permitió reforzar la idea de que una distinta conectividad entre monómeros de TcTIM y TbTIM es la causa de las diferentes sensibilidades a los modificadores químicos.

¿Por que es importante explicar las diferentes sensibilidades a modificadores químicos de la *cisteína de la interfase* entre TcTIM y TbTIM?

La *cisteína de la interfase* no es un residuo expuesto al solvente. En las estructuras tanto de TbTIM como de TcTIM no se visualiza el camino por donde los modificadores de grupos SH llegan a esta. La *cisteína de la interfase* esta rodeado estrechamente por el asa 3 (o asa de interdigitación) del monómero vecino y no se observa desde la superficie una cavidad que nos sugiera una posible vía de acceso. Entender las diferencias estructurales entre TcTIM y TbTIM y correlacionarlas con sus distintas sensibilidades a compuestos como el MMTS, nos ayudó a proponer como vía de acceso a la región en la interfase entre la hélice 1 y 3 de ambos monómeros. El requisito indispensable para el diseño de una droga que actué a nivel de esta cisteína (que no está presente en la TIM de humano) es conocer con detalle atómico, el camino de acceso y la zona circundante de dicha cisteína. Con este conocimiento se puede modelar y moldear dicho compuesto que electrostáticamente y

estereoquímicamente se acomode a dicha región fácilmente, lo que se traduzca en un compuesto con alta afinidad por esta región.

El trabajo consistente en el diseño racional de drogas es el siguiente reto del grupo.

PERSPECTIVAS

Uno de los retos más importantes del grupo es el diseño "basado en estructura" de un compuesto inhibidor de la TcTIM, que a la vez elimine la infección de *T. cruzi*. Es importante mencionar que es la primera vez que un grupo mexicano intentará aplicar esta metodología a un problema de salud nacional.

Una vez que se ha obtenido la estructura tridimensional de una enzima blanco se requiere del empleo de procedimientos computacionales para encontrar el compuesto o ligando que se unira al sitio blanco de la enzima. Dicho sitio debe ser estudiado minuciosamente por medio de despliegues gráficos de los puentes de hidrógeno, la superficie molecular y los campos electrostáticos. La primera tarea será generar una imagen negativa del sitio (Kuntz, 1992; Leach, 1994), después se realizará la búsqueda de moléculas pequeñas que mejor se ajusten al sitio o cavidad seleccionada. Para efectuar dicha búsqueda se sobrepone la imagen negativa que generamos con cada una de las moléculas pequeñas cuyas estructuras están almacenadas en bases de datos. Existen bases de datos disponibles como la "Cambridge Structure Data Base" que contiene más de 100,000 compuestos. Durante la búsqueda se deberán explorar todas las orientaciones posibles para cada molécula. Se deberán escoger aquellas moléculas que llenen o se ajusten mejor a la imagen negativa. Existen algoritmos computacionales que permiten analizar 100,000 compuestos en una semana (Blundell, 1996).

Un método alternativo es emplear paquetes computacionales (como GROWMOL Bohacek y McMartin, 1995; GENSTART Rotstein y Murcko, 1993) que en base a la cavidad escogida, van a inventar estructuras químicamente coherentes que se adosen optimamente al sitio blanco. Posteriormente utilizando el algoritmo "Multiple-Copy Simultaneous Search" (MCSS) se determinarán las orientaciones energéticamente favorables de la molécula generada (Miranker y Karplus, 1991).

Una vez encontrada una o varias moléculas candidatas, se procede a modificarlas de manera tal que la afinidad con que se uniran a la cavidad seleccionada aumente, para ello se van modificando los grupos funcionales o farmacoforos de la molécula seleccionada.

La afinidad con que se unen el compuesto y la enzima blanco puede ser sondeada evaluando terminos energeticos durante encuentros simulados sistemáticamente, aplicando libertad rotacional y translacional a ambas moléculas (Blundell, 1996).

Las moléculas seleccionadas deberan adquirirse, ya sea que se encuentren disponibles comercialmente o que sean sintetizadas por un Químico. Es primordial ensayar "in vitro" el efecto inhibidor de dichos compuestos sobre la actividad enzimática de la proteína blanco, describiendo con la mayor exactitud posible el modo de inhibición y la concentración necesaria del compuesto para inhibir a la enzima. Entre menor sea esta concentración mejor sera el compuesto (ver como ejemplos: Verlinde y Hol, 1994; Wlodawer y Vondrasek, 1998; McTigue *et al.*, 1995; Somoza *et al.*, 1998; McGrath *et al.*, 1995; Kalgutkar *et al.*, 1998).

APÉNDICE I

COMPOSICION DE LAS SOLUCIONES DE LA COMPAÑIA *HAMPTON RESEARCH* EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.

No.	SAL	AMORTIGUADOR	AGENTE PRECIPITANTE
1	Cloruro de calcio dihidratado 0.02 M	Acetato de sodio trihidratado 0.1 M pH 4.6	2-metil-2.4-pentanediol 30 % (v/v)
2	-	-	Tartrato de sodio-potasio tetrahidratado 0.4 M
3	-	-	Fosfato de amonio dihidrógeno 0.4 M
4	-	Tris-HCl 0.1 M pH 8.5	Sulfato de amonio 2.0 M
5	Citrato dihidratado trisódico 0.2 M	Hepes sodio 0.1 M pH 7.5	2-metil-2.4-pentanediol 30 % (v/v)
6	Cloruro de magnesio hexahidratado 0.2 M	Tris-HCl 0.1 M pH 8.5	PEG 4000 30 % (m/v)
7	-	Cacodilato de sodio 0.1 M pH 6.5	Acetato de sodio trihidratado 1.4 M
8	Citrato dihidratado trisódico 0.2 M	Cacodilato de sodio 0.1 M pH 6.5	2-propanol 30 % (v/v)
9	Acetato de amonio 0.2 M	Citrato dihidratado trisódico	PEG 4000 30 % (m/v)
10	Acetato de amonio 0.2 M	Acetato de sodio trihidratado 0.1 M pH 4.6	PEG 4000 30 % (m/v)
11	-	Citrato de sodio 0.1 M pH 5.6	Fosfato de amonio dihidrógeno 1.0 M
12	Cloruro de magnesio hexahidratado 0.2 M	Hepes sodio 0.1 M pH 7.5	2-propanol 30 % (v/v)
13	Citrato dihidratado trisódico 0.2 M	Tris-HCl 0.1 M pH 8.5	PEG 400 30 % (v/v)
14	Cloruro de calcio dihidratado 0.2 M	Hepes sodio 0.1 M pH 7.5	PEG 400 28 % (v/v)
15	Sulfato de amonio 0.2 M	Cacodilato de sodio 0.1 M pH 6.5	PEG 8000 30 % (m/v)
16	-	Hepes sodio 0.1 M pH 7.5	Sulfato de litio monohidratado 1.5 M
17	Sulfato de litio monohidratado 0.2 M	Tris-HCl 0.1 M pH 8.5	PEG 4000 30 % (m/v)
18	Acetato de magnesio tetrahidratado 0.2 M	Cacodilato de sodio 0.1 M pH 6.5	PEG 8000 20 % (m/v)
19	Acetato de amonio 0.2 M	Tris-HCl 0.1 M pH 8.5	2-propanol 30 % (v/v)

20	Sulfato de amonio 0.2 M	Acetato de sodio trihidratado 0.1 M pH 4.6	PEG 4000 25 % (m/v)
21	Acetato de magnesio tetrahidratado 0.2 M	Cacodilato de sodio 0.1 M pH 6.5	2-metil-2,4-pentanediol 30 % (v/v)
22	Acetato de sodio trihidratado 0.2 M	Tris-HCl 0.1 M pH 8.5	PEG 4000 30 % (m/v)
23	Cloruro de magnesio hexahidratado 0.2 M	Hepes sodio 0.1 M pH 7.5	PEG 400 30 % (v/v)
24	Cloruro de calcio dihidratado 0.2 M	Acetato de sodio trihidratado 0.1 M pH 4.6	2-propanol 20 % (v/v)
25	-	Imidazol 0.1 M pH 6.5	Acetato de sodio trihidratado 1.0 M
26	Acetato de amonio 0.2 M	Citrato dihidratado tri- sódico	2-metil-2,4-pentanediol 30 % (v/v)
27	Citrato dihidratado tri- sódico 0.2 M	Hepes sodio 0.1 M pH 7.5	2-propanol 20 % (v/v)
28	Acetato de sodio trihidratado 0.2 M	Cacodilato de sodio 0.1 M pH 6.5	PEG 8000 30 % (m/v)
29	-	Hepes sodio 0.1 M pH 7.5	Tartrato de sodio-potasio tetrahidratado 0.8 M
30	Sulfato de amonio 0.2 M	-	PEG 8000 30 % (m/v)
31	Sulfato de amonio 0.2 M	-	PEG 4000 30 % (m/v)
32	-	-	Sulfato de amonio 2.0 M
33	-	-	Formato de sodio 4.0 M
34	-	Acetato de sodio trihidratado 0.1 M pH 4.6	Formato de sodio 2.0 M
35	-	Hepes sodio 0.1 M pH 7.5	Fosfato de sodio dihidrógeno 0.8 M Fosfato de potasio dihidrógeno monohidratado 0.8 M
36	-	Tris-HCl 0.1 M pH 8.5	PEG 8000 8 % (m/v)
37	-	Acetato de sodio trihidratado 0.1 M pH 4.6	PEG 4000 8 % (m/v)
38	-	Hepes sodio 0.1 M pH 7.5	Citrato dihidratado tri- sódico 1.4 M
39	-	Hepes sodio 0.1 M pH 7.5	PEG 400 30 % (v/v) Sulfato de amonio 2.0 M
40	-	Citrato dihidratado tri- sódico	2-propanol 20 % (v/v) PEG 4000 20 % (m/v)
41	-	Hepes sodio 0.1 M pH 7.5	2-propanol 10 % (v/v) PEG 4000 30 % (m/v)

42	Fosfato de potasio dihidrógeno 0.05 M	-	PEG 8000 20 % (m/v)
43	-	-	PEG 1500 30 % (m/v)
44	-	-	Formato de magnesio 0.2 M
45	Acetato de zinc dihidratado 0.2 M	Cacodilato de sodio 0.1 M pH 6.5	PEG 8000 18 % (m/v)
46	Acetato de calcio dihidratado 0.2 M	Cacodilato de sodio 0.1 M pH 6.5	PEG 8000 18 % (m/v)
47	-	Acetato de sodio trihidratado 0.1 M pH 4.6	Sulfato de amonio 2.0 M
48	-	Tris-HCl 0.1 M pH 8.5	Fosfato de amonio dihidrógeno 2.0 M
49	Sulfato de litio monohidratado 1.0 M	-	PEG 8000 2 % (m/v)
50	Sulfato de litio monohidratado 0.5 M	-	PEG 8000 15 % (m/v)

APÉNDICE II

EL FACTOR R

El progreso en un refinamiento se monitorea, convencionalmente, por la disminución del factor R cristalográfico, el cual mide la discrepancia entre los factores de estructura observados y calculados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Factor R} = \frac{\sum_{hkl} || F_{obs} | - k | F_{calc} ||}{\sum_{hkl} | F_{obs} |}$$

En donde hkl son los índices de Miller, k es un factor de escala, F_{obs} son los factores de estructura observados y los F_{calc} los factores de estructura calculados.

Índices de Miller: Un cristal puede ser seccionado en planos (de modo imaginario). Los índices de Miller hkl son los tres intersecciones que un plano tiene con los ejes de una celda unidad. Por ejemplo; si el plano intersecciona con los ejes de una celda de dimensiones a , b y c , en las coordenadas a' , b' y c' , entonces los índices de Miller están dados por $h = a/a'$, $k = b/b'$ y $l = c/c'$.

Un factor de estructura es la suma de la dispersión de los átomos en una celda unitaria y se le conoce así porque depende del arreglo de átomos en una celda unitaria.

EL FACTOR R-LIBRE

En algunas ocasiones se ha encontrado que refinamientos deficientes pueden dar valores del factor R buenos (menores), esto se debe a que el factor R disminuye al aumentar el número de parámetros que se ajustan para describir el modelo. En los últimos años se ha hecho común monitorear el refinamiento utilizando además el factor R-libre, que no es más que el cálculo del factor R pero con solo el 10 % de los datos totales (Brünger, 1997).

LITERATURA CITADA

- Alvarez, M., Zeelen, J.P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Wyns, L., Wierenga, R.K. y Maes, D. (1998) Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* **273**: 2199-2206.
- Bakker, B.M., Michels, P.A.M., Opperdoes, F.R. y Westerhoff, H.V. (1997) Glycolysis in Bloodstream form *Trypanosoma brucei* can be Understood in Terms of the Kinetics of the Glycolytic Enzymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 3207-3215.
- 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.E., Priddle, J.D. & Waley, S.G. (1975) Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature*, **255**, 609-614.
- Bernier-Villamor, V., Camacho, A., Hidalgo-Zarco, F., Gonzalez-Pacanowska, D., Ruiz-Pérez, L. (1998) Trypanosoma cruzi dUTPase: characterization of a potential new drug target. Memorias de la reunión 1st COST-B9 Congress on Antiprotozoal Chemotherapy. Sierra Nevada Granada, España. Del 31 de Mayo al 5 de Junio de 1998.
- Blundell, T. L. (1996) Structure-based drug design. *Nature*, **384**, supp 7, 23-26
- Bocchi, E.A., Higuchi, M.D., Viera, L.C., Stolf, N., Belloti, G., Fiorelli, A., Jatene, A. y Pileggi, F. (1998) Higher incidence of malignant neoplasms after heart transplantation for treatment of chronic Chagas' heart disease. *J. Heart and Lung Transp.* **17**, 399-405.
- Bohacek, R.S. y McMartin, C. (1995) Exploring the universe of molecules for new drugs. *Nature Medicine*, **1**, 177-178
- Bonnet, B., Soullez, D. Davioud-Charvet, E., Landry, V., Horvath, D. y Sergheraert, C. (1997) New spermine and spermidine derivatives as potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 1249-1256.
- Brünger, A.T. (1990) Extension of molecular replacement: a new search strategy based on Patterson correlation refinement. *Acta Cryst.* **A46**, 46-57.
- Brünger, A.T. (1992) *XPLOR: Manual version 3.1*. Yale University, New Haven, CT, USA.
- Brünger, A.T. (1997). The free R-value: a more objective statistic for crystallography. *Methods Enzymol.* **277**, 366-396.
- Cazzulo, J.J. (1992) Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J.* **6**, 3153-3161.
- Cazzulo, J.J. (1994) Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of*

- Bioenergetics and Biomembranes*. 26, 157-165.
- Clarkson, A.B.J. y Brohn, F.H. (1976) Trypanosomiiasis: An approach to chemotherapy by the inhibition of carbohydrate catabolism. *Science*, 194, 204-206.
- Chagas, C. (1909) Nova tripanozomíaze humana. Estudos sôbre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade mórbido do homen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159-218.
- de Castro, S.L. (1993) The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 53, 83-98.
- Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S. Vellieux, F. M. D., Martial, J. A. y Hol, W. G. J. (1995) Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearotherophilus*. 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.
- Eakin, A.E., Guerra, A., Focia, P.J., Torres-Martínez, J., Craig, D.P. (1997) Hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi* as a target for structure-based inhibitor design: crystalization and inhibition studies with purine analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1686-1692.
- Eisenthal, R. y Cornish-Bowden, A. (1998) Prospects for antiparasitic drugs. The case of *Trypanosoma brucei*, the causative agent of african sleeping sickness. *J. Biol. Chem.* 273, 5500-5505.
- Engh, R.A. y Huber, R. (1991). Accurate bond length and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.* A47, 392-400.
- Fairlamb, A.H. y Cerami, A. (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 695-729.
- Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R. y Gómez-Puyou, A. (1998) Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity: triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem.* 253, 684-691.
- Gillmor, S.A., Craik, C.S. y Fletterick, R.J. (1997) Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. *Prot. Sci.* 6, 1603-1611.
- Gomez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga R.A., Rojo-Dominguez, A. y Pérez-Montfort, R. (1995). Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action - studies with triosephosphate isomerase. *Chem. and Biol.* 2, 847-855.
- Harris, T.K., Abeygunawardana, C. y Mildvan, A.S. (1997) NMR studies of the role of hydrogen bonding in the

- mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, **36**, 14661-14675.
- Hunter, W.N. (1997) A structure-based approach to drug discovery; crystallography and implications for the development of antiparasite drugs. *Parasitology*, **114**, S17-S29.
- Jacoby, E. M., Schlichting, I., Lantwin, C.B., Kabasch, W. & Krauth-Siegel, R.L. (1996). Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase-mepacrine complex. *Proteins*, **24**, 73-80.
- Kalgutkar, A.S., Crews, B.C., Rowlinson, S.W., Garner, C., Seibert, K. y Marnett, L.J. (1998) Aspirin-like Molecules that Covalently Inactivate Cyclooxygenase-2. *Science*, **280**, 1268-1270.
- Kleywegt, G.J., Bergfors, T., Senn, H., Lemotte, P., Gsell, B., Shudo, K. y Jones, T.A. (1994). Crystal structures of cellular retinoic acid binding proteins I and II in complex with all-*trans*-retinoic acid and a synthetic retinoid. *Structure*, **2**, 1241-1258.
- Kleywegt, G.J. y Brünger, A.T. (1996) Checking your imagination: applications of the free R value. *Structure*, **4**, 897-904.
- Knowles, J.R. (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*, **350**, 121-124.
- Kuntz, I.D. (1992) Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science*, **257**, 1078-82
- Laskowski R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. y Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.
- Leach, A.R. (1994) Ligand docking to proteins with discrete side-chain flexibility. *J Mol Biol.* **235**, 345-356.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C. y Petsko, G.A. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, **29**, 6609-6618.
- Lorenz, P., Maier, A., Helfert, S. y Clayton, C. (1998) Is the glycosome a good target for anti-trypanosomal drugs?. Memorias de la reunión 1st COST-B9 Congress on Antiprotozoal Chemotherapy. Sierra Nevada Granada, España. Del 31 de Mayo al 5 de Junio de 1998.
- Luzzati, V. (1952) Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines. *Acta Cryst.* **5**, 802-810
- McGrath, M.E., Eakin, A.E., Engel, J.C., McKerrow, J.H., Craick, C.S. y Fletterick, R.J. (1995) The Crystal Structure of Cruzain: A Therapeutic Target for Chagas' Disease. *J. Mol. Biol.* **247**, 251-259.
- McPherson, A. (1982) Preparation and analysis of protein crystals. Krieger Malabar, Florida, USA.
- McTigue, M.A., Williams, D.R. y Tainer, J.A. (1995) Crystal structures of a Schistosomal drug and vaccine target: Glutathione S-transferase from

- Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J. Mol. Biol.* **246**, 21-27.
- Maldonado, E., Moreno, A., Panneerselvam, K., Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Soriano-García, M., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez - Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1997) Crystallization and preliminary x-ray analysis of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Protein and peptide letters*, **4**, 139-144.
- Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez -Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y 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. y Hol, W.G. (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
- McGrath, M.E., Eakin, A.E., Engel, J.C., McKerrow, J.H., Craik, C.S. & Fletterick, R.J. (1995). The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *J. Mol. Biol.* **247**, 251-259.
- Miranker, A. y Karplus, M. (1991) Functionality maps of binding sites: a multiple copy simultaneous search method. *Proteins*. **11**, 29-34.
- Moncayo, A. (1997) Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. *World Health Statistics Quarterly*, **50**, 195-198.
- Murta, S.M.F. y Romanha, A.J. (1998) Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Parasitology*, **116**, 165-171.
- Neria, E. y Karplus, M. (1997) Molecular dynamics of an enzyme reaction: Proton transfer in TIM. *Chemical Physics letters*, **267**, 23-30.
- Noble, M.E.M., Zeelen, J.P., Wierenga, R.K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A.C. y Martial, J.A. (1993) Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr.* **D49**, 403-417.
- Opperdoes, F.R. y Michels, P.A.M. (1993) The glycosomes of the kinetoplastida. *Biochimie*, **75**, 231-234.
- Orosz, F., Vértessy, B.G., Hollán, S., Horányi, M. y Ovádi, J. (1996) Trisoeophosphate Isomerase Deficiency: Prediction and Facts. *J. theor. Biol.* **182**, 437-447.
- Ostoa-Saloma., Garza-Ramos, G., Ramírez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez - Puyou, M. y Pérez-Montfort, R. (1997) Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* **244**, 700-705.

- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. y Gray, V. (1995) How to measure and predict the molar absorption of a protein. *Prot. Sci.* **4**, 2411-2423.
- Pérez, R. (1997) Enfermedad de Chagas: un problema vigente de salud. *Avance y Perspectiva*, **16**, 307-312.
- Petsko, G.A. (1996) For Medicinal Purposes. *Nature*, **384**, supp 7, 7-9.
- Rossmann, M.G. y Blow, D.M. (1962) The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* **15**, 24-31.
- Rossmann, M.G. (1990) The molecular replacement method. *Acta Cryst.* **A46**, 73-82
- Rotstein, S.H. y Murcko, M.A. (1993) GenStar: a method for de novo drug design. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **7**, 23-43.
- Sanchez-Moreno, M., Fernandez-Becerra, M.C., Castilla-Calvente, J.J. y Osuna, A. (1995) Metabolic studies by ¹HNMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained by 'in vitro' culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**, 119-125.
- Schmuñiz, G. A. (1991) *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chaga's disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*, **31**, 547-557.
- Siemens (1993) SAINT software reference manual. Publication No. 269-014200, Siemens Industrial Automation, Inc. Analytical Instrumentation Group,
- 6300 Enterprise Lane, Madison WI USA.
- Sommer, J.M. y Wang, C.C. (1994) Targeting proteins to the glycosomes of African trypanosomes. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 105-138.
- Somoza, J.R., Skillman, G., Munagala, N.R., Oshiro, C.M., Knetzel, R.M.A., Nipoke, S., Fletterick, R.J., Kuntz, I.D. y Wang, C.C. (1998) Rational Design of Novel Antimicrobials: Blocking the Purine Salvage in a Parasitic Protozoan. *Biochemistry*, **37**, 5344-5348.
- Souza, D.H., Garrat, R.C., Araujo, A.P.U., Guimaraes, B.G., Jesus, W.D.P., Michels, P.A.M., Hannaert, V., & Oliva, G. (1998) *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: catalytic mechanism, and targeted inhibitor design *FEBS Lett.* **424**, 131-135.
- Tickle, I.J. y Driessen, H.P.C. (1996) Molecular replacement using known structural information. En: *Crystallographic Methods and Protocols*. Humana Press. pp. 173-203.
- Tielens, A.G.M. y Hellemond, J.J. (1998) Differences in Energy Metabolism Between Trypanosomatidae. *Parasitology Today*, **14**, 265-271.
- Traub-Cseko, Y.M. y Momen, H. (1995) On Chagas disease and Leishmaniasis. *Parasitology Today*, **11**, 315-317.
- Tovar, J., Fairlamb, A.N. (1996) Extrachromosomal, homologous expression of trypanothione reductase and its complementary mRNA in

Trypanosoma cruzi. *Nucleic Acids Research*, **24**, 2942-2949.

Urbina, J.A., Payares, G., Molina, J., Sanoja, C., Liendo, A., Lazardí, K., Piras, M.M., Piras R., Pérez, N., Wincker, P., Ryley, J.F. (1996) Cure of short- and long-term experimental Chagas disease using D0870. *Science*, **273**, 969-971.

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

Verlinde, C.L.M.J. y Hol, W.G.J. (1994) Structure-based drug design: progress, results and challenges. *Structure*, **2**, 577-587.

Wang, C.C. (1997) Validating targets for antiparasite chemotherapy. *Parasitology*, **114**, suppl S, S31-S44.

WHO/CTD Progress Report, Geneva, World Health Organization, (1997) *En prensa*, (consultado en la dirección de internet <http://www.who.ch/ctd/html/>)

Wierenga, R.K., Noble, M.E.M., Vriend, G., Nauche, S. y 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.

Wlodawer, A. y Vondrasek, J. (1998) Inhibitors of HIV-1 protease: A major success of Structure-Assisted drug design. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 249-284.

Zhang, Y., Bond, C.S., Bailey, S., Cunningham, M.L., Fairlamb, A.H. & Hunter, W.N. (1996). The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. *Protein Sci.* **5**, 52-61.

Zhang, Z., Sugio, S., Komives, E.A., Liu, K.D., Knowles, J.R., Petsko, G.A. and Ringe, D. (1994) Crystal structure of recombinant chicken triosephosphate isomerase phosphoglycolohydroxamate complex at 1.8 Å resolution. *Biochemistry*, **33**, 2830-2837.

CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY X-RAY ANALYSIS OF TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM *Trypanosoma cruzi*

Ernesto Maldonado[†], Abel Moreno[‡], Kaliyamoorthy Panneerselvam[†], Pedro Ostoa-Saloma[†],
Georgina Garza-Ramos[†], Manuel Soriano-García[†], Ruy Pérez-Montfort[†],
Marietta Tuena de Gómez-Puyou[†], and Armando Gómez-Puyou^{†*}.

[†]Departamento de Bioenergética and [‡]Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. [‡]Departamento de Bioestructura, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D. F. México.

Abstract: Recombinant triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* was crystallized at room temperature from 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 2% (v/v) PEG 400 and 2.0 M ammonium sulfate. Crystals belong to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$ with cell dimensions $a = 43.71 \text{ \AA}$, $b = 77.65 \text{ \AA}$, $c = 149.54 \text{ \AA}$, and $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Another crystal with cell dimensions $a = b = 56.16 \text{ \AA}$, $c = 161.85 \text{ \AA}$, and $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ with two possible tetragonal space groups $P4_12_12$ or $P4_22_12$ was obtained. Both crystals diffract up to 1.86 \AA .

Triosephosphate isomerase (TIM) is a ubiquitous enzyme that catalyzes the interconversion of glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. Studies on the enzyme from various species show that all TIM have similar catalytic properties [1-4] and conservation of active site residues [5,6]. Except in hyperthermophilic Archaea, where the enzyme is a tetramer [7], all TIM are homodimers with molecular weights in the range of 54 kDa. Data on the crystal structure of TIM from five different species show that the basic structure is markedly similar [8-12]. This is of relevance since several researchers have proposed that TIM, as well as other glycolytic enzymes from trypanosomes are potential targets for drug design [13-15]. In this context, the enzyme from *Trypanosoma brucei* which produces sleeping sickness in humans and nagana in cattle in Africa has received considerable attention [16,17].

We have proposed that species specific inhibitors of homologous enzymes can be obtained by targeting on amino acids that have not been conserved throughout evolution [18]. This hypothesis was tested by focusing on the nonconserved cysteines of TIM. It was found that full inhibition of TIM that have a cysteine in position 14, as the *T. brucei* enzyme, could be achieved by its derivatization to a methyl disulfide; TIM that lack that

particular cysteine (such as human TIM) are either insensitive or slightly affected by the derivatizing agent [18]. In a further test we examined TIM that lack cysteine 14, but possess a cysteine in position 217; the studies [19] showed that these TIM could also be selectively inhibited. Thus, the hypothesis appears correct. We have now extended our studies to TIM from *Trypanosoma cruzi*, the parasite that produces Chagas disease in the Americas.

The metabolic pathways that operate in *T. cruzi* have been largely elucidated [20], but there are few studies on the kinetic and structural characteristics of the purified enzymes. Therefore, in order to study TIM from *T. cruzi*, we cloned the gene for the enzyme from *T. cruzi*, deduced the amino acid sequence of the protein (Gene Bank, Accession number U53867), and expressed it in *Escherichia coli* [21]. The recombinant enzyme was purified to homogeneity by gel filtration and chromatography through CM sepharose (Fast Flow, Pharmacia); the yield is around 20 mg per liter of culture [21]. TIM from *T. cruzi* is a homodimer whose kinetic properties are similar to those of recombinant TIM from the *T. brucei* and *Leishmania mexicana*, another pathogenic trypanosotomide [3,22]. It is relevant that the identity between the three trypanosotomide enzymes is nearly 70%.

When the effect of sulfhydryl reagents with different structural characteristics was determined on recombinant TIM from *T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. mexicana*, it was found that the three enzymes differed in their sensitivity to four sulfhydryl reagents that were tested (Table I). TIM from the *T. cruzi* exhibited the highest sensitivity; the least sensitive was the enzyme from *L. mexicana*. It is noted that the differences in sensitivity are remarkable; for example, the concentrations of DTNB that produced half-maximal inhibition of the *T. cruzi* were close to two or three orders of magnitude lower than in TIM from *T. brucei* and *L. mexicana* respectively.

Table I.
Concentration (μM) that produces 50% Inhibition.

TIM	DTNB	DTP	pHMB	NEM
<i>T. cruzi</i>	3	14	2	100
<i>T. brucei</i>	500	2,500	250	6,000
<i>L. mexicana</i>	2,500	>10,000	400	20,000

The indicated recombinant enzymes (references [3] and [22] for expression and purification of the *L. mexicana* and *T. brucei* enzymes, respectively) were incubated at a concentration of 5 μg per ml in a mixture at pH 7.4 that contained 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA and various concentrations of either 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 4,4-dithiopyridine (DTP), p-hydroxy mercury benzoate (pHMB) or n-ethylmaleimide (NEM). After a two hour incubation time, activity was measured [19]. From the concentration curves, the concentration required for half-maximal inhibition was calculated.

At the light of these findings, it is instructive to compare in the aligned amino acid sequence of the three enzymes the position of their respective cysteines. TIM from *T. cruzi* and *L. mexicana* have a total of four cysteines per monomer; the enzyme from *T. brucei* has three cysteines 14, 39, and 126. Using the numbering of TIM from *T. brucei* in the aligned amino acid sequence, the four cysteines of TIM from *T. cruzi* and *L. mexicana* are in identical positions (14, 39, 117, and 126). Solely on the basis of the cysteine content of the three enzymes, the findings with the sulfhydryl reagents (Table I) are difficult to explain. For example, it may be considered that in comparison to TIM from *T. brucei*, the existence of cysteine 117 in the *T. cruzi* enzyme accounts for its higher sensitivity to sulfhydryl reagents, but this in turn raises the problem of why the sensitivity of the leishmanial enzyme is more than two orders lower than that of TIM from *T. cruzi*, albeit they have same cysteines. The problem is currently being addressed, but it appears clear that the precise explanation for the different sensitivity of the three enzymes to the sulfhydryl reagents will come from knowledge of their three-dimensional structure. Therefore, recombinant TIM from *T. cruzi* was crystallized.

Crystals suitable for X-ray analysis were obtained by the hanging drop vapor diffusion method at a room temperature of 22°C [23]. Aliquots of 5 µl, of freshly purified protein solution at a concentration of 4 to 48 mg/ml, were mixed with 5 µl reservoir solution that had 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 2% (v/v) PEG 400, and 2.0 M ammonium sulfate (Reagent 39, Hampton Research); crystals appeared after 7 to 14 days. At concentrations of 2 mg per ml in the crystallizing drop, crystals suitable for X-ray analysis were obtained (Figure 1A); at higher concentrations crystals were twinned and flat. The former crystals belong to the orthorhombic space group P2₁2₁2₁ with cell dimensions a = 43.71 Å, b = 77.65 Å, c = 149.54 Å, and α = β = γ = 90°. On the basis of the space group and unit cell volume, there was one dimer per asymmetric unit. The size of the crystals was 0.8 x 0.5 x 0.3 mm.

Under the conditions that led to formation of orthorhombic crystals, we observed once a crystal with tetragonal unit cell characteristics (Figure 1B). This type of crystals has been constantly obtained by the microseeding technique [24,25]. One µl of the 1:800 or 1:1000 dilution of the seed in the mother liquor was added to 10 µl of a protein solution of 8 to 14 mg of protein per ml. Crystals suitable for X ray diffraction formed in one or two days. These crystals belong to two possible tetragonal space groups i.e. P4₁2₁2 or P4₃2₁2 (from systematic absence analysis) with cell dimensions a = b = 56.16 Å, c = 161.85 Å, and α = β = γ = 90°. The size of the crystal is 0.5 x 0.5 x 0.3 mm. On the basis of space group symmetry, the unit cell volume, and the calculated molecular weight of the monomer (27 KDa), there was one monomer per asymmetric unit.

In both cases the amount of solvent was determined by the formula [26]:

$$V_{\text{protein}} = \frac{1.23}{V_M}, \quad \text{therefore the } V_{\text{solvent}} = 1 - \frac{1.23}{V_M}$$

$$\text{where } V_M = \frac{V_{\text{cell}}}{M_r \cdot Z}$$

Where, V_{cell} = volume of the unit cell (\AA^3), and Z = number of asymmetric units/unit cell. For space group $P2_12_12_1$, $Z = 4$ and $M_r = 54000$. The amount of protein in the crystal is therefore $507.550.94 \text{ \AA}^3 / (54,000 \times 4)$, $V_{sol} = 2.350 V_{protein} = 1.23 / 2.35 = 0.5234$, in consequence, the volume of solvent is 47.66%. Following the same calculations in the tetragonal system with tetragonal space group $P4_12_12$ or $P4_32_12$ the solvent content is 47.95%.

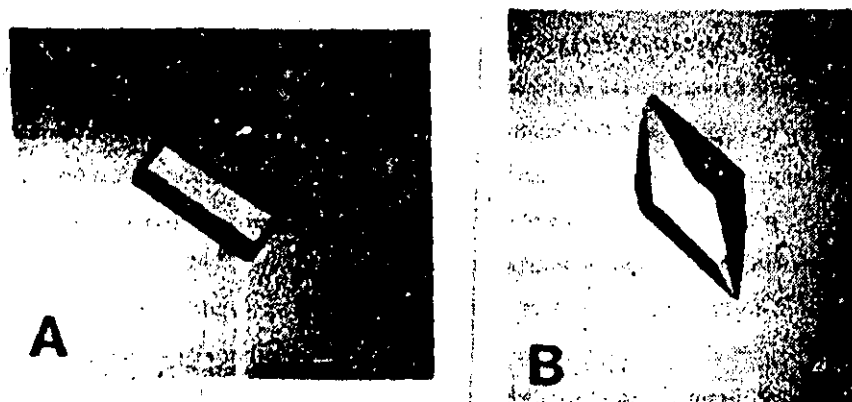


Figure 1 Crystals of triosephosphate isomerase. *A.* Orthorhombic and *B.* tetragonal crystals of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* grown as described in the text; the sizes of the orthorhombic and tetragonal crystals were $0.8 \times 0.5 \times 0.3$ mm, and $0.5 \times 0.5 \times 0.3$ mm, respectively.

The orthorhombic and the tetragonal crystals diffracted up to 1.86 \AA with an area detector in a Siemen's X-ray generator with a copper rotating anode operating at 35kV and 80 mA and a graphite monochromator. Statistics on the collection of the diffraction data are given in Table II.

Table II.
Statistics for the diffraction data of trypanosomal triosephosphate isomerase

Crystal	Resolution (\AA)	Number of reflections		Complete (%)	R_{merge}^a
		Total	Unique		
Orthorhombic	1.86	132483	42089	97.4	10.9
Tetragonal	1.86	103083	21760	96.2	10.2

^a $R_{merge} = \sum_{hkl} \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, the inner summation is over duplicated reflections, the outer is over unique reflections, and the denominator is summarized over all reflections.

Acknowledgments. This work was supported by grants from *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT México* to AG-P (400346-5-3935N) and to MS-G (F514-E9306) and also from *Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM* to RPM (IN203495). EM was supported by a fellowship (112836) from the *CONACyT, MEXICO*. AM and KP acknowledge the incorporation to *Departamento de Bioestructura del Instituto de Química, UNAM*; AM also acknowledges financial support from *CONACyT, MEXICO* in "Programa de Repatriación de Científicos Mexicanos"

References

- [1] Putnam, S.J., Coulson, A.F.W., Farley, I.R.T., Riddleston, B. and Knowles, J.R. (1972) *Biochem. J.* 129, 301-310.
- [2] Lambeir, A.M., Opperdoes, F.R. and Wierenga, R.K. (1987) *Eur. J. Biochem.* 168, 69-74.
- [3] Kohl, L., Callens, M., Wierenga, R.K., Opperdoes, F.R. and Michels, P.A.M. (1994) *Eur. J. Biochem.* 220, 331-338.
- [4] Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frère, J.-M., Mande, S.C., Hol, W.G.J., Martial, J.A. and Goraj, K. (1996) *J. Mol. Biol.* 257, 441-456.
- [5] Alber, T. and Kawasaki, G. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 419-434.
- [6] Wierenga, R.K., Noble, M.E.M. and Davenport, R.C. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 1115-1126.
- [7] Kohlhoff, M., Dahm, A. and Hensel, R. (1996) *FEBS Lett.* 383, 245-250.
- [8] 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.E., Priddle, J.D. and Waley, S.G. (1975) *Nature* 255, 609-614.
- [9] Wierenga, R.K., Kalk, K.H. and Hol, W.G.J. (1987) *J. Mol. Biol.* 198, 109-121.
- [10] Lolis, E., Alber, T., Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C. and Petsko, G.A. (1990) *Biochemistry* 29, 6609-6618.
- [11] Noble, M.E.M., Zeelen, J.P., Wierenga, R.K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A.C. and Martial, J.A. (1993) *Acta Crystallogr. D* 49, 403-417.
- [12] Mande, S.C., Mainfroid, V., Kalk, K.H., Goraj, K., Martial, J.A. and Hol, W.G.J. (1994) *Protein Sci.* 3, 810-821.
- [13] Verlinde, C.L.M.J., Merrit, E.A., Van Den Akker, F., Kim, H., Feil, I., Delboni, L.F., Mande, S.C., Sarfaty, S., Petra, P.H. and Hol, W.G.J. (1994) *Protein Sci.* 3, 1670-1686.
- [14] Misset, O. and Opperdoes, F.R. (1987) *Eur. J. Biochem.* 162, 493-500.
- [15] Misset, O., Van Becumen, J., Lambeir, A.M., Van der Meer, R. and Opperdoes, F.R. (1987) *Eur. J. Biochem.* 162, 501-507.
- [16] Noble, M.E., Wierenga, R.K., Lambeir, A.M., Opperdoes, F.R., Thunnissen, A.-M.W.H., Kalk, K.H., Groendijk, H. and Hol, W.G.J. (1991) *Proteins* 10, 50-69.
- [17] Verlinde, C.L.M.J., Rudenko, G. and Hol, W.G.J. (1992) *J. Comput. Aided Mol. Design.* 6, 131-147.
- [18] Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rójo-Dominguez, A. and Pérez-Montfort, R. (1995) *Chem. and Biol.* 2, 847-855.
- [19] Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Rójo-Dominguez, A., Gómez-Puyou, M.T. and Gómez-Puyou, A. (1996) *Eur. J. Biochem.* 241, 114-120.
- [20] Cazzulo, J.J. (1994) *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 157-165.

- [21] Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramírez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gómez-Puyou, A., Gómez-Puyou, M.T. and Pérez-Montfort, R. Submitted.
- [22] Borchert, T.V., Pratt, K., Zeelen, J.P., Callens, M., Noble, M.E.M., Opperdoes, F.R., Michels, P.A.M. and Wierenga, R.K. (1993) *Eur. J. Biochem.* 211, 703-710.
- [23] McPherson, A. (1982) *Preparation and analysis of protein crystals*, Krieger Malabar, Florida.
- [24] McRee, D.E. (1993) *Practical protein crystallography*, Academic Press.
- [25] Ducruix, A. and Giegé, R. (1992) *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins a Practical Approach*. Oxford: IRL Press.
- [26] Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491-497.

Received December 9, 1996, accepted February 1, 1997.