

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

30

REACTIVIDAD DE LA CISTEINA DE LA INTERFASE Y
ESTABILIDAD ESTRUCTURAL DE LA TRIOSAFOSFATO
ISOMERASA DE *Trypanosoma brucei* Y *Trypanosoma cruzi*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A :
HORACIO REYES VIVAS

AGOSTO DE 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr Armando Gomez-Puyou en los laboratorios 104 y 105 oriente del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México Durante el proyecto doctoral Horacio Reyes Vivas recibió una beca del **CONACyT** con No. de Registro **85928**

A EDITH

AGRADECIMIENTOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Dr. Armando Gómez-Puyou

grantes del comité tutorial

Dr. Armando Gómez-Puyou, Dr. Mario Calcaño-Montans, Dr. Ruy Pérez-Montfort

mbros del examen de candidatura

Dra. Rosario Muñoz-Clarez, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Mario Calcaño-Montans, Dr. Rafael Zubillaga Luna, Dr. Hector Barrios López, Dr. Juan Luis Rendón Gómez, Dr. Arturo Rojo Domínguez.

mbros del Jurado

Dra. Marietta Tuena Sangri, Dra. Gloria Saab Rincón, Dr. Eduardo Horjales Reboredo, Dr. Guillermo Mendoza Hernández, Dr. Ruy Pérez-Montfort, Dr. Lorenzo Segovia Foncella y Dr. Andrés Hernández Arana.

fundio agradecimiento por el apoyo del Laboratorio de Bioquímica-Genética de la Torre de
ación del Instituto Nacional de Pediatría

sejos de mis maestros

Dra. Marietta Tuena, Dra. Rosario Muñoz-Clarez, Dr. Gómez-Puyou, Dr. Mario Calcaño Montans,
Dr. Rafael Moreno, Dr. Jorge Ramírez

n cariño a mi maestro

Dr. Edmundo Chávez Cossio

nocimiento muy especial

Sra. María Elena, Sr. Lino

mpañeros de laboratorio con quienes convivía a diario (incluso más que con mi familia)

Lenin Domínguez, Gabriel Mercado, Alfredo Tellez, Viviana Zomoza, Eduardo Martínez, Gerardo
Pérez, Xiu-Gon Gao, Ernesto Maldonado

ivos compañeros de laboratorio en el INP

López, Elvia Coballase, Dora Molina, Sara

manos putativos

con, Joel Nava, Xicotencatl Ulises, Ignacio Ugalde, Lupita

me número de *masters*.

orgina Garza, Dra. Leticia Ramírez, Jesús Orta, Dr. Alejandro Fernández, Dr. Edgar Contreras, Hugo Najera, Luis del
vid Cisneros, Oscar Flores, Cecilia García, Aida Uribe, Nallely Cabrera, Gloria Hernández, Ma. Elena Chávez, Marcela
Santiago Avila, Pablo Rangel, Miguel Beltrán, Adelaida Díaz, Dra. Cecilia Zazueta, Dra. McCarthy, Dr. Mohammed
García, Dr. José S. Rodríguez, Karla Carvajal, Sara Rodríguez, Concepción Bravo, Ricardo Jasso, Dr. Luis Silveira
y Minauro

INDICE	
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION.....	5
Barriles alfa-beta	9
Generalidades de la Triosafosfato isomerasa	11
-Propiedades catalíticas y estructurales	12
-Estructura y función de la TIM	16
-Asa catalítica.	16
-Interfase.	17
Quimioterapia contra la tripanosomiasis	19
-Desarrollo preclínico.	19
-Desarrollo clínico.	20
-Desarrollo de fármacos	20
La triosafosfato isomerasa como blanco para el diseño de fármacos	23
Susceptibilidad a la proteólisis limitada de la triosafosfato isomerasa	27
OBJETIVOS Y ESTRATEGIAS	28
MATERIAL Y METODOS	30
RESULTADOS	30
I) Los factores que regulan la reactividad de la cisteína de interfase en la triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i> y <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
II) Diferencias en susceptibilidad a la proteólisis limitada en la triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i> y <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
DISCUSION	35
- Elementos que afectan la reactividad de la Cys de interfase en TbTIM y TcTIM	35
-Hidrólisis limitada de la triosafosfato isomerasa	36
REFERENCIAS	41

RESUMEN.

Las secuencias primarias de la enzima homodimérica, trifosfato isomerasa de los parásitos *Trypanosoma brucei* (TbTIM) y *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) son muy similares (70 % de identidad). Sus estructuras tridimensionales son virtualmente idénticas. Ambas enzimas presentan en su región de interfase un asa 3 que sobresale de cada subunidad para insertarse en la otra. El asa 3 además rodea a una cisteína colocada en la posición 14 en ambas enzimas (Cys14). La Cys14 de TcTIM es casi dos órdenes de magnitud más reactiva que su homóloga en TbTIM al agente derivatizante de grupos -SH metilmetano tiosulfonato (MMTS). Para conocer los principios que gobiernan la diferente reactividad de la Cys de interfase, se midió la velocidad de reacción de TbTIM y TcTIM con el MMTS determinando la constante de segundo orden de inactivación (k_2) en distintas condiciones. A pH 7.4 la k_2 de TcTIM es 70 veces mayor que en TbTIM. Una triple mutación de TcTIM donde se sustituyeron 2 residuos del asa 3 y uno al inicio del α -hélice 3 por los que naturalmente se encuentran en TbTIM induce que la diferencia de 70 veces disminuya a 30. El pKa aparente (pK_a^{ap}) del grupo -SH de la Cys14 de TcTIM y su triple mutante fueron 0.7 unidades de pH menor que en TbTIM. Estas diferencias en pKa podrían explicar la distinta susceptibilidad a los agentes sulfhidrilo. Por tanto, se evaluó la k_2 al mismo grado de ionización de las Cys14. Los resultados mostraron que el cociente entre las k_2 de TcTIM y TbTIM fue de 8, mientras que entre la triple mutante de TcTIM y la TbTIM fue de solo 1.5. Un análogo de sustrato, el fosfoglicolato (PG) no perturbó el pK_a^{ap} del grupo -SH de la Cys14 en ninguna de las dos enzimas. Sin embargo, el PG disminuyó la k_2 . Asimismo, en presencia de PG y evaluando la inactivación al mismo grado de protonación, el cociente entre la k_2 de TcTIM y TbTIM disminuyó a 6.5. Bajo estas mismas condiciones la k_2 entre la triple mutante y TbTIM fue de 0.8. Con este tipo de análisis se logró definir los factores que intervienen en la reactividad de la Cys14 en ambas enzimas.

Por otra parte, se exploraron algunas características estructurales de ambas enzimas comparando su susceptibilidad a la digestión limitada por subtilisina. A pesar de que los cortes iniciales que presentaron TbTIM y TcTIM fueron muy similares, esta última mostró ser significativamente más susceptible a la hidrólisis. La inactivación de TcTIM y TbTIM correlacionó con el incremento en la proteólisis de sus estructuras. Para TcTIM los sitios de corte fueron entre Thr130-Asn131 y Gln181-182, mientras que en TbTIM los cortes fueron entre Thr139-Ala140 y Gln181-Gln182. Estos sitios se encuentran en la α -hélice 5 y en el extremo -NH de la hélice 6. La TcTIM no pudo estudiarse cinética o estructuralmente debido a su rápida inactivación y extensiva hidrólisis, por lo que tales estudios se realizaron en la TbTIM. La TbTIM hidrolizada en un 50 % y la nativa presentaron el mismo patrón de retención en cromatografía de exclusión molecular en HPLC y un patrón de migración en geles nativos similar. En este último sistema, la enzima cortada mostró una banda de menor migración. La integridad del sitio activo de la TbTIM cortada se evaluó determinando sus constantes cinéticas para el gliceraldehído 3-fosfato. Las K_m de la TbTIM nativa y cortada son muy similares, sin embargo, la k_{cat} de la enzima troncada disminuyó a la mitad. La fluorescencia intrínseca de la TbTIM troncada presentó un corrimiento hacia el rojo y una disminución de su intensidad de fluorescencia del 5%. Para evaluar si la proteólisis perturbó las interacciones de la interfase en TbTIM se realizaron experimentos de dilución. Las K_p aparentes entre los monómeros de la TbTIM cortada y nativa fueron muy similares. En conjunto, los resultados de la digestión limitada sugieren lo siguiente: 1) la estructura de

TcTIM es más flexible y por tanto, mejor sustrato para la proteasa que TbTIM, 2) la gran flexibilidad en TcTIM podría aumentar la exposición al solvente de regiones aparentemente ocultas, por ejemplo, la interfase entre sus dos monómeros, 3) el corte en el extremo NH de la hélice 6 parece ser el responsable de la inactivación en TcTIM y TbTIM, 4) La TbTIM parcialmente hidrolizada presenta una estructura tridimensional similar a la nativa; los cambios son sutiles y localizados, 5) La TIM de *T. brucei* proteolizada en un 50 % parece ser una enzima con solo uno de los monómeros cortado; esto sugiere que hay asimetría entre las dos subunidades.

ABSTRACT.

The primary sequences and three-dimensional structure of the homodimer triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* (TbTIM) and *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) are very similar. In the interface of the trypanosomal TIM's, loop 3 of each of its two subunits protrudes into the other subunit. Loop 3 of each monomer also surrounds the side chain of the residue at position 14 of the other monomer. In TbTIM and TcTIM, residue 14 is cysteine (Cys14). Cys14 of TcTIM is almost two orders of magnitude more sensitive than that of TbTIM to the thiol agent methylmethane thiosulfonate (MMTS). In order to explore the causes of this difference, we evaluated the second-order rate constant of inactivation by MMTS (k_2) of TbTIM and TcTIM under various experimental conditions. At pH 7.4 the k_2 of TcTIM was 70 times higher than in TbTIM. The substitution in TcTIM of two residues from loop 3 and one residue at the beginning of α -helix 3 for those present in TbTIM diminished to 30 the ratio in k_2 between the two enzyme. The apparent pKa (pK_a^{app}) of the -SH of Cys14 of TcTIM and that of the triple mutant were 0.7 pH units lower than that of Cys14 of TbTIM. To explore if this difference accounts for the different reactivity of MMTS, we evaluated the k_2 at the same ionization level of Cys14. The data show that the ratio between TcTIM and TbTIM was 8 times, whereas the ratio between triple mutant TcTIM and TbTIM was only 1.5 times. The substrate analog, phosphoglycolate (PG) did not change the pK_a^{app} of -SH for Cys14 in the two enzymes. However, PG decreased the k_2 . In the presence of PG and at the same level of ionization of the -SH group of Cys14, the ratio of k_2 between TcTIM and TbTIM was 6.5 times; the ratio between the triple mutant TcTIM and TbTIM was 0.8 times. Thus, we were able to characterize the factors that control the interface region.

Additional characteristics of TcTIM and TbTIM were determined by assessing their susceptibility to subtilisin. Notwithstanding that the initial nicks of both enzymes were very similar, TcTIM was more vulnerable to hydrolysis. Hydrolysis accompanied loss of catalytic activity. The sites of nicking in TcTIM were between Thr130-Asn131 and Gln181-Gln182, whereas in TbTIM the sites were Thr139-Ala140 and Gln181-Gln182. These are localized at α -helix 5 and at NH termini of helix 6. Because TcTIM exhibits fast inactivation and extensive hydrolysis it was not possible to study kinetically or structurally the proteolyzed enzyme. However, the characteristics of TbTIM nicked to an extent of 50 % could be determined and compared to those of native TbTIM. The two enzymes exhibit the same retention pattern in size exclusion HPLC and a similar electrophoretic pattern in native gels. However, TbTIM exposed to subtilisin showed another band with a lower electrophoretic mobility. The catalytic constants for glyceraldehyde 3-phosphate of nicked and native TbTIM were determined. In nicked and native form the K_m values were similar, however, the k_{cat} of truncated TbTIM was about 50 % of that native TbTIM. Nicking induced a red shift of the intrinsic fluorescence and a decrease of fluorescence intensity of 5 %. Hydrolysis did not change the interactions between the interface residues, since the apparent K_D from nicked and native TbTIM was almost the same.

The results of limited proteolysis suggest that 1) TcTIM is more flexible and consequently a better substrate for subtilisin than TbTIM, 2) The great flexibility of TcTIM may increase the solvent exposition of the apparent occult regions, such as the interface. 3) Interruption of peptide bond at the NH termini of helix 6, may account for enzyme inactivation in TbTIM and TcTIM 4) Partially hydrolyzed TbTIM has a native like three

mensional structure, and 5) Limited proteolysis of TbTIM to a level of 50 % yields an enzyme with the molecular mass of the native dimer in which only one of the monomers is saved; this suggests asymmetry between subunits.

INTRODUCCION

Un número considerable de proteínas se unen a otras proteínas para inducir funciones biológicas definidas, tales como la transmisión de señales celulares o la unión entre antígeno y anticuerpo. También son fundamentales en la regulación enzimática entre distintas subunidades proteicas. Al sitio de contacto entre proteína-proteína se le conoce como interfase. Se sabe que las interfases se generan a través de interacciones no covalentes. También se sabe que los residuos de aminoácidos que forman las interfases son relativamente poco conservados, incluso entre proteínas con la misma función catalítica (Valdar y Thorton, 2001). Uno de nuestros objetivos en este trabajo fue examinar las diferencias que existen en las interfases de enzimas homólogas de distintas especies. Esto con el fin de explorar la posibilidad de diseñar moléculas que inactiven específicamente a las enzimas de organismos indeseables.

Para estos estudios utilizamos a la enzima trifosfato isomerasa (TIM) cuya estabilidad y actividad, como en muchas otras proteínas, dependen de los contactos en la interfase. De hecho, en la TIM de prácticamente todas las especies, sólo la forma dimerica es activa (Waley, 1973, Casal et al., 1987). Los datos existentes indican además, que en las TIM existe un residuo en la zona de interfase que es absolutamente necesario para la asociación entre subunidades. Este se encuentra en la posición 14. En algunos parásitos, como los tripanosomátidos, el residuo que se localiza en dicha posición es una cisteína (Cys14) (en éste proyecto se emplea la numeración de la secuencia de la TIM de *Trypanosoma brucei*). Sin embargo, en otras especies el residuo que ocupa la posición 14 es diferente. En los mamíferos, por ejemplo *Homo sapiens*, el residuo localizado en la posición 14 de la TIM es una metionina (Mande, et al., 1994).

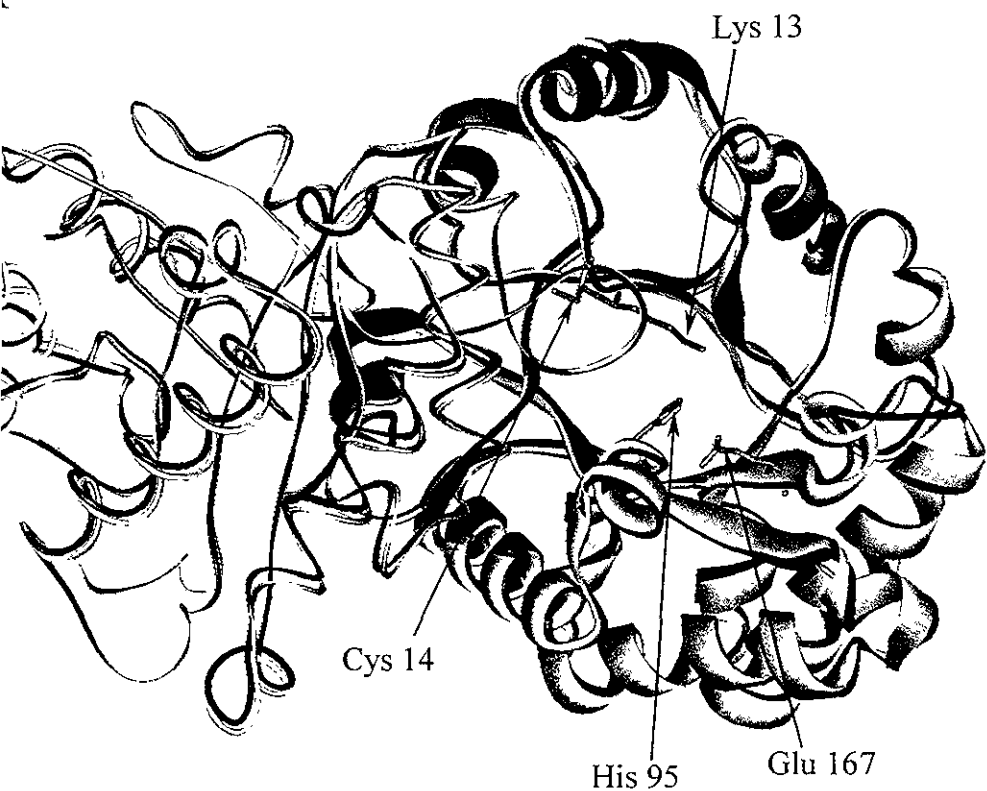
La TIM pertenece a la vía glicolítica que es la principal proveedora de recursos energéticos a los parásitos como *T. brucei*, *Entamoeba histolytica* o *Giardia lamblia*. Estudios previos sobre la modificación química de la Cys14 demostraron su importancia en la estabilidad y actividad en la TIM de *T. brucei*, *T. cruzi*, y *Leishmania mexicana* (Gómez-Puyou, et al., 1995, Ostoa-Saloma et al., 1997, Garza-Ramos et al., 1998). Además, se observaron diferencias importantes en la reactividad de la Cys 14 por agentes derivatizantes entre las TIM de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. mexicana*. La TIM de *T. cruzi* es casi 100 veces más sensible que la enzima de *T. brucei* y *L. mexicana*. Esto se observa a pesar de que existe una identidad del 80 % en la secuencia primaria de la región de interfase entre *T. brucei* y *T. cruzi* y que el arreglo espacial de los residuos que rodean a la Cys14 en ambas enzimas es muy similar.

Con estos antecedentes procedimos a caracterizar los posibles factores que regulan la reactividad a los agentes derivatizantes de la Cys14 de la TIM de *T. brucei* y *T. cruzi*. Los resultados indican que tanto el medio ambiente inmediato a la Cys 14 como interacciones a distancia de la interfase controlan esta reactividad.

Junto con el estudio de los factores que controlan la reactividad de la cisteína 14 en la región de la interfase de TIM, fue también de interés estudiar la contribución de las uniones covalentes periféricas sobre el resto de las uniones a la estabilidad estructural. Un ejemplo de las diferencias en estas interacciones es que el tiempo de permanencia que tiene cada enzima dentro de una célula es distinto. En este sentido, uno de los agentes desestabilizantes y de degradación *in vivo* de las proteínas es su hidrólisis por efecto de las proteasas. Por lo tanto, se piensa que la vida media de cada proteína se relaciona con las características intrínsecas que se presentan localmente en la estructura (Kidokoro, et al., 1990). En esta forma, las

enzimas hidrolizadas por proteasas muestran diferentes grados de alteración estructural. Sin embargo, existen ejemplos en los que la estructura tridimensional de una proteína permanece relativamente intacta después de hidrolizarse algunos de sus enlaces peptídicos (Hofsteenge, et al., 1988, Siddiqui, et al., 1993; Pollegioni, et al., 1995; Gupta, et al., 1995; Juul, et al., 1995, Huang, et al., 1997) En relación con esto último, los trabajos realizados sobre hidrólisis limitada en las TIM de conejo, levadura y *Plasmodium falciparum* mostraron que los cortes no modifican significativamente la estructura, presentando valores de actividad enzimática similares a sus formas nativas (Vogel y Chmielewski, 1994; Sun et al., 1992; Sun, et al., 1993, Ray, et al., 1999) Por todo esto, las TIM de *T. cruzi* y *T. brucei* con su gran similitud estructural parecen ser un buen modelo para estudiar el efecto de la proteólisis limitada sobre las uniones no covalentes que contribuyen a la estabilidad de la conformación proteica

Por lo anterior, se realizó un estudio comparativo sobre la sensibilidad a la proteólisis limitada de las TIM de *T. brucei* y *T. cruzi* Los resultados muestran marcadas diferencias en la susceptibilidad a la proteólisis En TbTIM se destaca además la cinética y las propiedades de la enzima truncada, sugiriendo que su estructura hidrolizada es más “rígida” que la enzima de *T. cruzi* Estos resultados contrastan con el hecho de que la identidad entre sus secuencias primarias es del 70 % (Ostoa-Saloma, et al., 1997) y de que además sus estructuras tridimensionales son muy similares En esta forma se demuestra que existe una gran diferencia en estabilidad que se presenta con el mismo patrón topológico de las TIM conocido como “Barril-TIM” o “Barriles alfa-beta



```

brucei -M-SKQPPIAAANWKCNGSQQLSELIDLFNSTSINHVDVQCQVASTFVHLMAMTKERLSHPK 59
brucei MASKPQPIAAANWFCNGSESLVPLIETLNAATFDHVDVQCQVASTFVHLPMTKARLTNPK 60
* *****: * ** : *:::*****. **:* : ** **::**

brucei FVIAAQNAIAKSGAFTGEVSLPILKDFGVNWIIVLGHSERRARYGETNEIVADKVAQAAVAS 119
brucei FQIAAQNAITRSGAFTGEVSLQILKDYGISWVVLGHSERRRLYGETNEIVAEKVAQACAA 120
* *****:***** ***: * :***** *****:*** * *:

brucei GFMVIACIGETLQERESGRTAVVVLQIAAIAKLLKADWAKVVIAYEPVWAIGTGKVVAT 179
brucei GFMVIVCVGETNDEEFAGRTAAVVLQLAAVAQFLSKEAWSRVVIAYEPVWAIGTGKVVAT 180
** **_*:*** :***:***. *****:***:*:*_* *: :*****

brucei PQQAQEAHALIRSWSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVGFLVGGASLK 239
brucei PQQAQEVHFLIRRWVRCILGTDIAAQLRILY GCSVTFANARTLYQMRPINGELVGGASLK 240
***** * * * ** *: * : * :*****. ***** ** :*****

brucei PEFVDIIKATQ 250
brucei PEFVLIKATQ 251
*****:***:***:

```

Fig. 1: A) Sobreposición de los homodímeros de TbTIM (negro) y TcTIM (gris). Para facilitar la comparación solo se muestran los residuos de TbTIM. B) Alineamiento de sus secuencias, los asteriscos muestran los residuos idénticos entre las dos enzimas.

BARRILES ALFA-BETA

Dentro de la diversidad estructural en las proteínas, existe un patrón de plegamiento que es común en muchas de ellas. Este plegamiento se conoce como dominio barril α/β o barril TIM. La triosafosfato isomerasa pertenece a una familia de enzimas con dominio barril α/β . Se sabe que cerca del 10 % de las enzimas que se conocen presentan este patrón topológico como estructura principal, o contienen a este dominio incorporado en alguna de sus regiones (Farber y Petsko, 1990, Nagano, et al., 1999). En general, la estructura de los barriles α/β se forma por ocho hebras β en el interior de la proteína, rodeadas de ocho hélices α . Normalmente se encuentra una hélice α entre 2 hebras β vecinas (Reardon y Farber 1995). Las hélices α y las hebras β se unen mediante asas. Ocasionalmente se presenta una asa dentro de una hélice. La secuencia global de la estructura secundaria es por tanto un dominio $(\alpha/\beta)_8$ (Fig. 1). En las distintas proteínas la longitud del dominio estructural varía desde un barril de 250 aminoácidos (TIM) hasta barriles con 327 aminoácidos, como en el dominio α/β de la xilosa isomerasa (Reardon y Farber 1995).

Los dominios α/β pueden presentar otras estructuras topológicas adicionales en las asas que conectan a las hebras β con las hélices α . Sus posiciones dentro del barril, junto con la forma misma del dominio α/β se han clasificado y dividido a los barriles α/β en seis familias. Estas se describen brevemente en la Tabla 1 (Farber y Petsko, 1990, Reardon y Farber, 1995).

Tabla 1 Clasificación del dominio barril α/β

FAMILIA	CARACTERISTICAS PRINCIPALES	ENZIMAS
A	1 Barriles casi circulares 2 La presencia de una pequeña hélice entre la hebra 8 y la hélice 8	Flavocitocromo b2, glioxilato oxidasa, ribulosa-1-, 5-bisfosfato carboxilasa/oxidasa (RUBISCO) Flavocitocromo b2, glioxilato oxidasa, trimetilamina deshidrogenasa
B	<i>Subfamilia A.</i> Barril elíptico con el eje mayor cercano a la hebra $\beta 1$. Carecen de la hélice α final del barril. Este espacio se ocupa por dos dominios <i>Subfamilia B.</i> Mismas características que la subfamilia "A" excepto que el espacio se ocupa por tres o mas dominios	Cloromuconato cicloisomerasa, mandelato racemasa. Ciclodextrin glucosiltransferasa, la α -amilasa y la piruvato cinasa
C	Un solo dominio, el eje mayor de su barril esta cercano a la hebra $\beta 3$ y contienen una pequeña hélice α entre la hebra $\beta 8$ y la hélice $\alpha 8$	N-(5'-fosforribosil) antranilato isomerasa (PRAI), indol-3-glicerol fosfato sintasa (IGPS), subunidad α de la triptofano sintasa (TS), Triosafosfato isomerasa, narbonina
D	Presentan una hélice α que precede al barril	Fructosa bisfosfato aldolasa, 2-dehidro-3-deoxifosfogluconato aldolasa, N-acetilneuraminato liasa
E	El barril tiene el eje mayor cerca de la hebra $\beta 1$ Presentan asas muy largas después de las hebras $\beta 4$ y 7	Aldosa reductasa, 3α -hidroxi-esteroide deshidrogenasa e histidina sintasa
F	El barril es estrecho, diferente a todos los de las demás familias descritas Presentan un grupo de hélices α entre la hebra $\beta 1$ y la hélice $\alpha 1$ Las hélices 1 y 4 son muy largas	Adenosin desaminasa, fosfotriesterasa

Algunas familias comparten también algunos aspectos químicos. Todos los barriles que requieren mononucleótido de flavina como cofactor pertenecen a la familia A. Excepto RUBISCO, todas las enzimas que requieren metales divalentes para su catálisis pertenecen a la familia B (la piruvato cinasa también utiliza K^+). Las enzimas de la familia E unen NAD

GENERALIDADES DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

La triosafosfato isomerasa (TIM o TPI, EC 5.3.1.1) es un homodímero. En las TIM de distintas especies las subunidades tienen una masa molecular que varía entre 22 a 34 kDa. Las subunidades muestran el prototipo del barril α/β , o "TIM barrel". La enzima cataliza la interconversión de los productos que provienen de la catálisis de la aldolasa en la vía de la glucólisis, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el (R)-gliceraldehído 3-fosfato (GAP). La reacción está presente en todos los organismos y se piensa que la TIM existía antes de la división entre archaeobacteria-procarionte-eucarionte (Marchionni y Gilbert, 1986). Sólo el GAP puede continuar en el camino de la glucólisis hasta el piruvato. La TIM también participa en el máximo aprovechamiento de la degradación de los ácidos grasos para obtener energía. Después de la transformación del glicerol de los triacilglicéridos en DHAP, éste se isomeriza nuevamente a GAP por la TIM.

Se conoce la secuencia de aminoácidos de aproximadamente 80 especies y la estructura tridimensional de 12 de ellas (Tabla 2). Además, se sabe la estructura de algunas enzimas modificadas genéticamente (Borchert, et al., 1993b; Gopal, et al., 1999; Alvarez, et al., 1999; Zhang, et al., 1999; Williams, et al., 1999; Norledge, et al., 2001), en presencia de diversos análogos de sustrato (Lolis y Petsko, 1990; Noble, et al., 1991; Wierenga y Noble, 1992; Noble, et al., 1993; Deiboni, et al., 1995; Alvarez, et al., 1998, 1999; Williams, et al., 1999; Zhang, et al., 1999), e incluso en presencia de solventes orgánicos (Gao, et al., 1999).

Tabla 2 Enzimas TIM cuya estructura ha sido resuelta a escala atómica

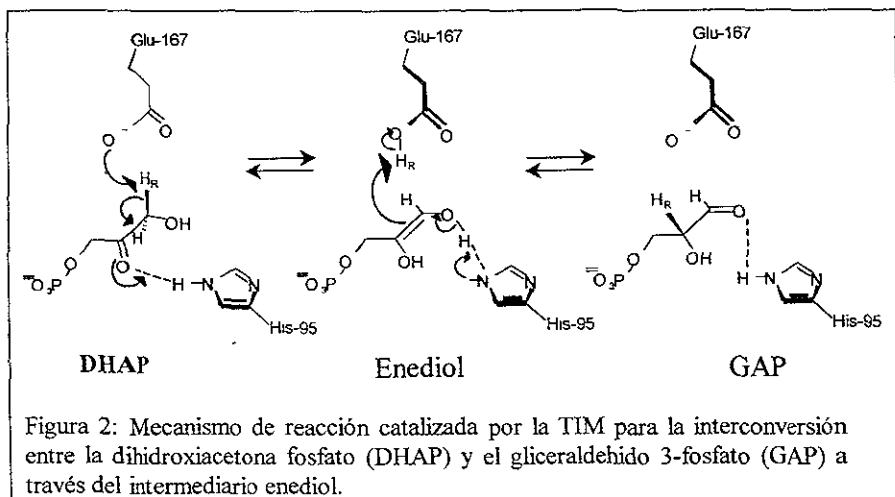
Organismo	Tipo de organismo	Resolución (Å)	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	1.9	Lolis et al , 1990
<i>Trypanosoma brucei</i>	Protoctista parásito del hombre	1.83	Wierenga et al., 1991
<i>Escherichia coli</i>	Procarionte mesófilo	2.6	Noble et al , 1993
<i>Gallus gallus</i>	Ave	1.8	Zhang et al , 1994
<i>Homo sapiens</i>	Mamífero	2.8	Mande et al , 1994
<i>Leishmania mexicana</i>	Protoctista parásito del hombre	1.83	Williams et al., 1999
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Procarionte hipertermófilo	2.8	Delboni et al , 1995
<i>Plasmodium falciparum</i>	Protoctista parásito del hombre	2.2	Velanker et al , 1997
<i>Vibrio marinus</i>	Procarionte psicrófilo	2.7	Alvarez et al , 1998
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Protoctista parásito del hombre	1.83	Maldonado et al , 1998
<i>Thermotoga maritima</i>	Procarionte hipertermófilo	2.85	Maes et al , 1999
<i>Entamoeba histolytica</i>	Protoctista parásito del hombre	1.6	No publicado

PROPIEDADES CATALITICAS Y ESTRUCTURALES

A excepción de la TIM de *Thermotoga maritima*, que es un dímero de dímeros fusionado con la enzima fosfoglicerato cinasa (Maes, et al , 1999), así como de *Proccocus woest* y *Methanothermobacter fervidus* que son homotetrameros (Kohlhoff, et al , 1996) el resto de las

TIM conocidas son homodiméricas. Se sabe muy bien el mecanismo de la reacción de isomerización que cataliza la TIM. Esta enzima es uno de los catalizadores más eficientes estudiados, ya que aumenta la velocidad de la reacción 10^9 veces (Richard, 1984). Su velocidad catalítica está limitada por la difusión, por lo que esta enzima se ha definido como un "catalizador perfecto" (Albery y Knowles, 1976, Knowles y Albery, 1977, Knowles, 1991). Además de la TIM, existen otros ejemplos de enzimas cuya catálisis se encuentra también limitada por difusión. Tal es el caso de la catalasa, la acetilcolinesterasa, la fumarasa, la anhidrasa carbónica y la diacilglicerol cinasa. Existen otros ejemplos menos conocidos de enzimas cuya catálisis se limita por difusión como es el caso de la elastasa del leucocito humano (Jackson, et al., 1995), la cinecina de la *Drosophila* (Huang y Hackney, 1994), y la peroxidasa equina (Dunford y Cotton, 1975).

Mecanicamente, la función biológica de la TIM consiste en disminuir las barreras energéticas que limitan la velocidad de protonación y desprotonación del GAP y la DHAP. La reacción procede a través de la formación de un intermediario *cis*-enediol (Rose y O'Connell, 1961, Fersht, 1985) (Fig. 2). El anillo imidazol de la His 95 es un catalizador electrofílico que polariza el grupo carbonilo del sustrato (Nickbarg y Knowles, 1998, Nickbarg et al., 1988, Lodi y Knowles, 1991), permitiendo su enolización (Knowles, 1991, Komives et al., 1991, Harris et al., 1998). Así, en el mecanismo "clásico" el Glu 167 cataliza la transferencia intramolecular de un protón entre C1 y C2, mientras la His 95 cataliza la transferencia del protón entre O1 y O2 (Fig. 2) (Komives et al., 1991, Harris et al., 1998).



La estabilidad estructural y la composición de aminoácidos de las TIM difieren de especie a especie; sin embargo, sus características cinéticas son muy similares (Tabla 3). La TIM presenta una cinética que sigue un modelo estricto tipo Michaelis-Menten. No obstante, recientemente Harris y colaboradores (1998) describieron que puede haber comunicación entre los monómeros y que ésta puede modular la transferencia intramolecular del protón entre C1 y C2.

La TIM puede formar metilglicoxal y fosfato inorgánico que son subproductos de la descomposición del intermediario enediol (Webb et al., 1977; Richard, 1984; Richard, 1991). Esta reacción de eliminación es lenta comparada con la reacción de isomerización (Webb et al., 1977; Richard, 1984; Sun y Sampson, 1999). Los valores de la relación k_{cat}/K_m para las reacciones de isomerización y eliminación son de 10^6 a 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ y 2 a 14 $M^{-1}s^{-1}$, respectivamente (Richard, 1991; Komives et al., 1991; Sun y Sampson, 1999).

Tabla 3. Parámetros Cinéticos de la Triosafosfato isomerasa de distintos organismos.

TIM	Km (GAP) (mM)	Km (DHAP) (mM)	k_{cat} (GAP) ($\text{min}^{-1} \times 10^5$)	k_{cat} (DHAP) ($\text{min}^{-1} \times 10^4$)	Referencias
Levadura	0.56 0.59 1.27 1.3 0.62	3.6 1.23	1.7 1.4 10 4.8 1.4	6.6 4.9	Komives et al., 1991 Sun et al., 1993 Krietsch et al., 1970 Sampson et al., 1992 Sun et al., 1992
<i>T. brucei</i>	0.25 0.19 0.66 0.6 0.3	1.2 1.1	3.7 3.6 3.5 3.2 3.0	6.5 6.0	Lambeir et al., 1987 Borchert et al., 1993 Garza-Ramos et al., 1998 Ostoa-Saloma et al., 1997 Gómez-Puyou et al., 1995
<i>E. coli</i>	1.03		5.4		Alvarez et al., 1998
<i>G. gallus</i>	0.47 0.39 0.42	0.97 1.57 0.65	2.6 2.6 5.0	2.6 2.9 3.6	Putman et al., 1972 Plaut et al., 1972 Zhang et al., 1999
<i>H. sapiens</i>	0.43 0.49	0.82			Sawyer et al., 1975 Mainfroid et al., 1996
<i>I. mexicana</i>	0.41 0.3 0.9	0.56 1.3	2.5 2.5 6.3	1.7 2.8	Williams et al., 1999 Kohl et al., 1994 Ostoa-Saloma et al., 1997
Conejo	0.39 0.43 0.68 0.39 0.32 0.32-0.46	0.62	1.86 5.2 6.3 5.1	5.4 5.2	Richard, 1991 Sun et al., 1992 Garza-Ramos et al., 1996 Lambeir et al., 1987 Krietsch et al., 1970 Haitman et al., 1974
<i>V. marinus</i>	1.9		4.2		Alvarez et al., 1998
<i>T. cruzi</i>	0.66 0.9 0.48		5.3 4.0 2.6		Garza-Ramos et al., 1998 Ostoa-Saloma et al., 1997 Reyes-Vivas et al., 2001
<i>I. histolytica</i>	0.61	0.62-0.87	2.4		Landa et al., 1997

Los residuos del sitio activo se encuentran en los extremos NII de las asas 1, 4, y 6 que conectan las hebras β con las siguientes hélices α y pertenecen a la estructura primaria de cada monómero. De esta forma, todos los residuos están en el monómero. Sin embargo, la

TIM es activa solo como dímero en donde cada monómero tiene un sitio activo (Waley, 1973, Casal et al., 1987) Se han identificados 3 residuos, el ácido glutámico 167 (Glu 167), la histidina 95 (His 95) que participan directamente en la reacción (Fersht, 1985, Lolis et al., 1990; Knowles, 1991) y la lisina 13 (Lys 13). Este último residuo tiene la función de neutralizar las cargas de los sustratos para que se unan correctamente al sitio activo (Lodi et al., 1994, Joseph-McCarthy, et al., 1994)

ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

Como se mencionó anteriormente, se conoce un número considerable de secuencias primarias de la TIM de distintas especies, así como las estructuras tridimensionales de las TIM de varios organismos (Tabla 2) La estructura conformacional es además altamente conservada (Alber et al., 1981, Nickbarg y Knowles, 1988)

Asa catalítica La TIM posee un asa β tipo Ω cerca del sitio activo y se localiza entre los residuos 168 a 178 (Fig 1) El asa se caracteriza por presentar un movimiento como un cuerpo rígido en forma "tapadera" Este movimiento se produce por cambios en el ángulo de torsión de la cadena primaria de algunos residuos que funcionan como "bisagra" (Sun y Sampson, 1998) Se conoce que el asa aísla al sitio activo del solvente, estableciendo un puente de hidrógeno entre la Gly172 del asa β y el grupo fosfato del sustrato Esta situación promueve además la conformación planar del intermediario enediol Todo esto favorece la transformación eficiente del sustrato que se acompaña de una disminución en la reacción de eliminación del grupo fosfato del intermediano, previniendo la formación de metilgloxal (Pompliano et al., 1990, Joseph et al., 1990, Richard, 1984, 1991, Knowles, 1991)

El asa 6 o catalítica presenta un movimiento de 7 Å desde una posición "abierta" hacia una "cerrada" que se revela en las estructuras tridimensionales de la TIM de pollo, levadura, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, humano, *Escherichia coli*, y *Bacillus stearothermophilus* (Lolis et al., 1990, Lolis y Petsko, 1990, Noble et al., 1991, 1993; Wierenga et al., 1991; Mande et al., 1994, Zhang et al., 1994, Delboni et al., 1995; Velanker et al., 1997) La posición cerrada se observó en presencia de análogos de sustrato o fosfato, mientras que la posición abierta se observa en ausencia de ligando.

Evidencias por espectroscopia de NMR muestran que la unión del sustrato o salida del producto *no* inducen el movimiento del asa 6. Sin embargo, el movimiento de esta asa se encuentra a escala de tiempo con el recambio catalítico (Williams y McDermott, 1995) Se ha demostrado además que la posición abierta predomina en ausencia de ligando por ser termodinámicamente más estable. Por el contrario, en presencia de ligando la conformación cerrada es la especie predominante y más estable (Williams y McDermott, 1995) Así, los datos sobre el asa catalítica sugieren que la unión del sustrato desplaza el equilibrio hacia la forma "cerrada" de la enzima, en tanto que la ausencia del sustrato desplaza el equilibrio hacia la forma "abierta"

Interfase Una porción considerable del homodímero lo forma la región de la interfase. Dicho contacto entre las dos subunidades de la TIM se establece a través del asa 3 formada por los residuos 67 a 79. El asa 3 de cada una de las subunidades penetra en una hendidura que se localiza cerca del sitio activo del otro monómero (Lolis et al., 1990) lo que da por resultado que los sitios activos y la interfase estén en cercanía. Por ejemplo, se conoce que el Glu 97, que se encuentra cercano al sitio activo establece un puente de hidrógeno con la amida de la Thr 75 de la subunidad vecina (Schnackerl y Gracy, 1991). Otro ejemplo es la

Lys en la posición equivalente a la 16 de la TIM de *B. stearotherophilus* Alvarez y colaboradores (1999) sugieren que este residuo contribuye de manera importante a la estabilidad del homodímero. Mas aún, en la TIM de este procarionte hipertermofílico su Lys 16 parece presentar una función de adaptación para la enzima a altas temperaturas (Alvarez et al., 1999). Trabajos recientes demuestran la presencia de otros residuos centrales para la estabilidad de la enzima. Un ejemplo extremo lo reportó Williams y colaboradores (1999) al sustituir el Glu 65 de la TIM de *L. mexicana* por una Gln la termoestabilidad de la enzima aumentó 25°C.

Existen otros datos que muestran la importancia del asa 3 (de interfase) en la estabilidad y actividad de la enzima. En la TIM de levadura el reemplazo de la Asn 77 por Asp incrementó la velocidad de inactivación térmica, disminuyó la k_{cat} y la desnaturalización inducida por dilución (Ahern et al., 1987). Otros estudios muestran que alteraciones en el asa 3 disminuyen drásticamente las constantes de asociación entre las subunidades (Borchert et al., 1994, Schliebs et al., 1997, Casal et al., 1987).

Otra peculiaridad de la interfase es que el asa 3 de una subunidad rodea la cadena lateral del residuo de la posición 14 del otro monómero. Estudios de mutagénesis dirigida y de modificación química demuestran que el residuo de esta posición contribuye significativamente a la estabilidad del dímero de TIM (Gómez-Puyou et al., 1995, Manfroid et al., 1996, Garza-Ramos et al., 1998, Pérez-Montfort et al., 1999). Las TIM de los parásitos patógenos *I. cruzi* (Ostoa-Saloma, et al., 1997), *I. brucei* (Wierenga, et al., 1991), *I. mexicana* (Khol, et al., 1994), *P. falciparum* (Velanker, et al., 1997), *Giardia lamblia* (Mowatt, et al., 1994) y *I. histolytica* (Landa, et al., 1997) poseen una Cys en posición 14. Por otro lado, un gran número de especies tienen un residuo distinto al de Cys

en dicha posición. En el humano, esta posición la ocupa un residuo de Met, mientras que en levadura es una Leu. Además, el asa 3 de la TIM de humano tiene un residuo más que en las TIM de *T. brucei* (TbTIM), *T. cruzi* (TcTIM) y *L. mexicana* (LmTIM). Las diferencias en la interfase de los tripanosomatidos y el humano tienen un interés adicional al considerarla como un posible sitio para el diseño de fármacos. Sin embargo, antes de sugerir a la TIM para el desarrollo de anti-tripanosomátidos, es importante comentar los esfuerzos de otros grupos para el combate de la tripanosomiasis.

QUIMOTERAPIA CONTRA LA TRIPANOSOMIASIS.

Se estima que por cada fármaco que apruebe la "Food and Drug Administration" de EUA se sintetizan 6200 compuestos y solo tres logran pasar la fase de pruebas clínicas. El proceso toma alrededor de 13 años con un costo cercano a 350 millones de dólares (Petsko, 1996). Recientemente Keiser y cols (2001) revisaron el avance farmacológico contra la tripanosomiasis africana (Fig 3). Este se divide en tres etapas: desarrollo de fármacos (en el cual la investigación básica es fundamental), desarrollo preclínico y desarrollo clínico. Primero se comentará la parte del desarrollo y posteriormente la de investigación al final de este apartado.

En el **Desarrollo preclínico** se realizan trabajos de toxicidad, farmacocinética, dosificación, carcinogénesis, y mutagenicidad. Más del 80 % de los compuestos evaluados se rechazan por su toxicidad y pérdida de eficacia (Spence, 1999). Ejemplo de ello es un derivado de triazina (SIPI) utilizado contra *T. evansi* (Zhou, et al., 1996), *T. brucei rhodesiense* y *gambiense* que no tuvo éxito en modelos con infección en el sistema nervioso central (Grebuki et al., 1999). Otros ejemplos son el megazol, un nitroimidazol y un inhibidor

de la S-adenosilmetionina (CGP 40215) que no fueron eficaces en modelos crónicos o de fase terminal (Bouteille et al., 1995; Keiser et al., 2001)

El **Desarrollo clínico** se divide en cuatro fases (I a IV, Fig 3) y su costo suele ser mayor que el preclínico. En cada fase se realizan estudios que comprenden desde conocer el metabolismo que sigue un compuesto en el organismo, hasta su vida media de almacenamiento. Es importante informar que NO existen compuestos antitripanosomátidos en la fase I a III del desarrollo clínico

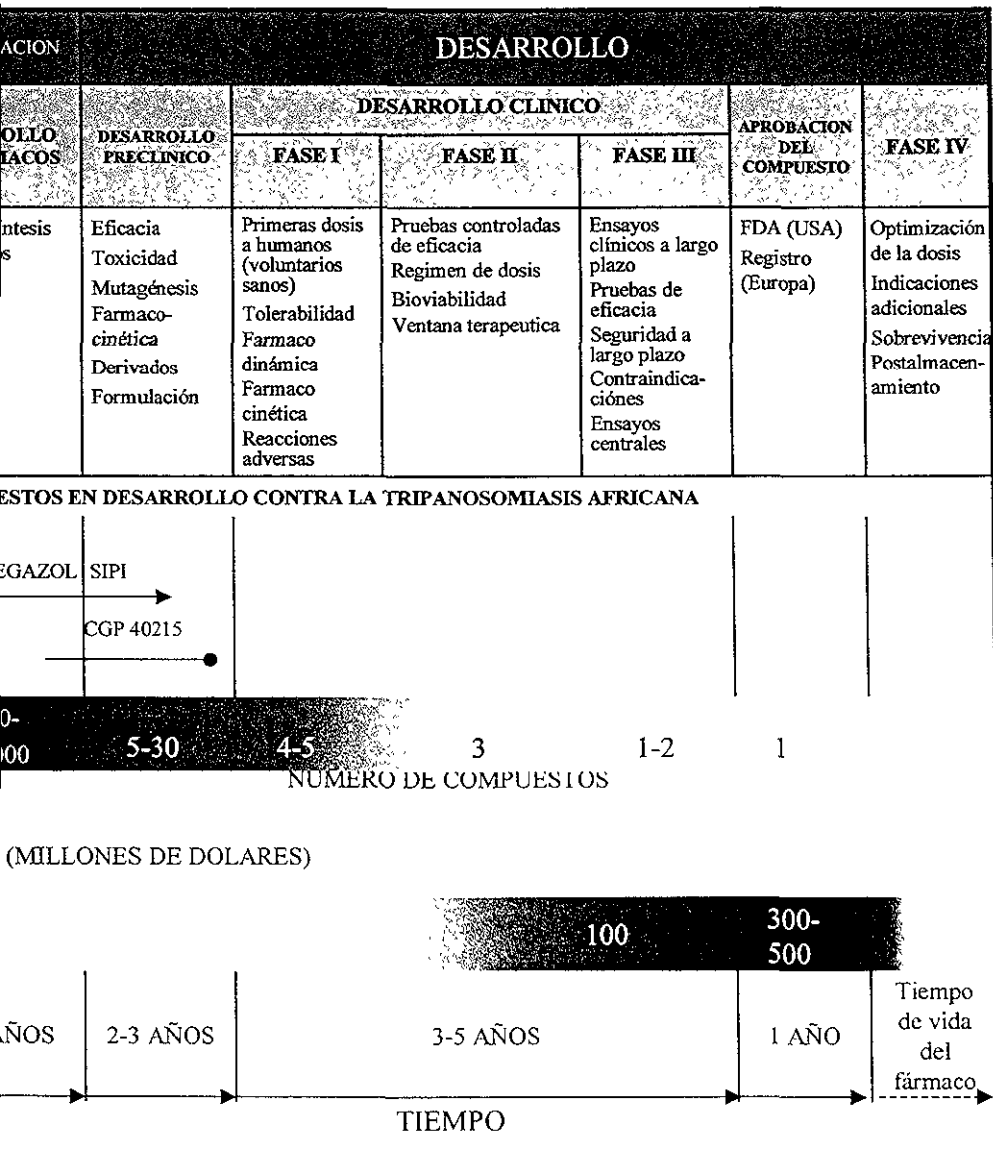
Desarrollo de fármacos Esta etapa comprende dos tipos de análisis: los estudios de “ensayo y error” y los estudios de “diseño de fármacos basados en estructura”. El primero tiene una ruta empírica de síntesis y ensayo que ofrece resultados rápidos. Normalmente se utilizan cantidades pequeñas del compuesto y no se requiere información de su estructura química o del “blanco” potencial. Sin embargo, la probabilidad de descubrir un compuesto exitoso es muy baja y requiere analizar un enorme número de compuestos. El método no contempla el papel del sistema inmune, la farmacocinética o el metabolismo. No obstante, la mitad de los 20 fármacos más vendidos en el mundo se descubrieron de esta manera, partiendo de recursos naturales (Keiser et al., 2001). Por tanto, este enfoque es digno de tomarse en consideración. Ejemplo de esto son algunas plantas con actividad antitripanosomal *in vivo* Como *Camabis sativa* y *Allium sativum* (Nok, et al., 1996, Nok et al., 1994,), e *in vitro* como *Scutellaria baicalensis* G., *Coptis japonica* M., la curcumina, *Monopsis buchtienii* y el ácido gálico (Yabu et al., 1998, Nose, et al., 1998, Waechter et al., 1999, Koide et al., 1998)

Otros ejemplos de compuestos antitripanosomales obtenidos por estudios de ensayo y error que se ubican en etapa de investigación son análogos de pumina como el s-HPMPA

utilizado contra el *T. b. rhodesiense* (Kaminsky, et al , 1996), inhibidores de la enzima farnesiltransferasa empleados contra *T. b. brucei* (Ali, et al , 1999), y análogos de aminoácidos aplicados también contra el *T. b. brucei* (Zweygarth y Kaminsky, 1991).

El método de diseño de drogas basado en estructura (Verlinde y Hol, 1994; Blundell, 1996, Hunter, 1997) se basa en diseñar fármacos utilizando la estructura tridimensional de proteínas blanco. Actualmente la técnica tiene un gran impulso debido a que se ha resuelto la estructura de unas 15,600 proteínas (pagina del PDB, [http //www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). La estrategia consiste en buscar sistemáticamente moléculas capaces de unirse con alta especificidad a la proteína blanco. Ello se realiza mediante simulaciones virtuales y búsqueda en bases de datos, como el Cambridge Structure Database. Después de seleccionar los compuestos, por medios computacionales se intenta aumentar la especificidad de unión. El siguiente paso es sintetizarlo o adquirirlo comercialmente y probarlo *in vitro*. La técnica ha sido efectiva en el desarrollo de antihipertensivos, anticancerígenos, antiartríticos (Blundell, 1996), así como inhibidores de proteasas del HIV (Wlodawer y Vondrasek, 1998).

Se han resuelto algunas estructuras de proteínas de tripanosomátidos y a continuación se presentan ejemplos del diseño racional de inhibidores para enzimas de estos parásitos. La tripanotión reductasa (Jacoby et al , 1996, Zhang et al , 1996) es una enzima que no se encuentra en el hombre. Se construyó un compuesto que inhibe *in vitro* a la enzima de *T. cruzi* (Bonnet et al , 1997). Sin embargo, en cultivos celulares la inhibición de la actividad de hasta un 85 % no disminuyó la velocidad de reproducción ni mató al parásito (Tovar y Fairlamb, 1996). Recientemente se describió una tripanotión peroxidasa en *Crithidia fasciculata* que podría servir como blanco alternativo (Flohe, 1998). Los compuestos que inhiben la síntesis de poliaminas por inactivación de la ornitina descarboxilasa y espermidina



3. Estadios de la investigación y desarrollo de fármacos. Tomado del Keiser et al., 2001

sintetasa mostraron un efecto moderado *in vivo* (Loiseau, et al , 1998) Recientemente se diseñó un compuesto contra la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa tripanosomal, la N⁶-(1-naftalenometil)-2'-(3-clorobenzamido)adenosina. El compuesto es prometedor *in vitro*, y logró eliminar a los parásitos en un cultivo de fibroblastos infectados (Aronov, et al., 1999)

Además de la enzima de la vía glucolítica, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, se conoce también la estructura y función de la triosafosfato isomerasa de tripanosomas Esta enzima homodimérica presenta propiedades particulares en la región de contacto entre sus subunidades, que podrían aprovecharse para el diseño racional de fármacos especie-específicos (Gómez-Puyou, et al , 1995, Ostoa-Saloma, et al , 1997, Maldonado, et al , 1997, Maldonado, 1998) A continuación se expone una serie de antecedentes que apoyan tal propuesta.

LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA COMO BLANCO PARA EL DISEÑO DE FARMACOS

Baker y cols (1997) así como Eisenthal y Cornish-Bowden (1998) modelaron la inhibición de las enzimas glucolíticas de *T. brucei* para determinar si podrían ser blancos adecuados para diseñar fármacos Estos análisis teóricos concluyen que ningún inhibidor competitivo sería exitoso También indicaron que solo la inhibición acompetitiva del transportador de piruvato sería buen candidato. En cambio, un inactivador irreversible que no compitiera con el sitio activo, y con una eficiencia del 100 % para cualquier enzima de la vía glucolítica del parásito tendría mayores posibilidades de éxito

Existen estudios en donde se propone a la TIM como un blanco potencial para el diseño de drogas contra parásitos patógenos (Noble et al , 1991, Willson et al , 1993, Verlinde et

l., 1994; Ray, et al , 1999) Estos trabajos se centran principalmente en el sitio catalítico como posible región de ataque de la TIM. Sin embargo, se sabe que una de las zonas de las enzimas más conservadas son los sitios catalíticos (Bajaj y Blundell, 1984). Un punto importante a considerar respecto a la función de la TIM, es que sólo el dímero es catalíticamente activo (Waley et al , 1973, Zabori et al , 1980, Garza-Ramos et al , 1992) De hecho, los monómeros que se han construido por mutagénesis exhiben una actividad catalítica mil veces menor que la enzima nativa (Borchert et al., 1994, Borchert et al , 1995; Schliebs et al., 1996, 1997)

Nuestro grupo ha trabajado bajo la hipótesis de que los residuos no conservados que son centrales para la estabilidad y catálisis de una enzima son excelentes sitios para el diseño de fármacos especie-específicos (Gómez-Puyou et al , 1995, Garza-Ramos et al., 1998). El residuo de la posición 14 es un aminoácido NO conservado, pero en todas las TIM forma parte del asa I que se encuentra entre la primera hebra β y la primera hélice α (Fig 1) Como se mencionó anteriormente, se conocen seis parásitos que presentan un residuo de Cys en la posición 14, mientras que el humano tiene una Met en dicha posición Así, esta región de la interfase aparece como buen candidato para el diseño de fármacos La estrategia podría afectar la asociación entre los monómeros de la TIM de los parásitos.

La TbTIM, TcTIM y LmTIM presentan una Cys de interfase por monómero En las tres enzimas, su modificación química por reactivos sulfhidrilo induce alteraciones estructurales *irreversibles* y la pérdida de la actividad (Garza-Ramos et al , 1998, Pérez-Montfort et al , 1999, Reyes-Vivas et al , 2001) Sin embargo, los reactivos que promueven alteraciones en las TIM de los tripanosomatidos afectan poco o nada a las enzimas que presentan un residuo

distinto a la Cys en la posición 14. Lo anterior incluye también a la TIM de humano (Mande et al., 1994)

Respecto a la sensibilidad que presentan las TIM de estos tres parásitos a los reactivos sulfhidrilo, es de interés señalar que la Cys 14 de TcTIM es cerca de dos ordenes de magnitud más reactiva que la TbTIM y LmTIM (Ostoa-Saloma et al., 1997, Garza-Ramos et al., 1998, Pérez-Montfort et al., 1999, Reyes-Vivas et al. 2001). En relación con la estabilidad entre estas enzimas, recientemente se comenzó a evaluar la desnaturalización por hidrocloreuro de guanidina en TcTIM y TbTIM. Datos preliminares mostraron que a pesar de que la sensibilidad a la inactivación por guanidina es similar entre las dos enzimas, existen diferencias muy significativas en el patrón de desnaturalización (Vázquez-Contreras y Chánez-Cárdenas, comunicación personal). Estos datos contrastan con la circunstancia de que la identidad de la estructura primaria entre TcTIM, TbTIM y LmTIM es aproximadamente del 70 %, y que la identidad de los residuos de interfase entre TcTIM y TbTIM es del 82 %. Más aún, sus áreas ocultas al solvente son casi idénticas (Ostoa-Saloma et al., 1997, Maldonado et al., 1998). Finalmente, la geometría de los residuos del asa 3 que rodean a la Cys 14 es muy similar en ambas proteínas.

Todos estos datos sugieren que diferencias mínimas entre las interfases de las TIM de los tripanosomatidos influyen significativamente en la sensibilidad a agentes derivatizantes de cisteínas. Sin embargo, también es posible que las diferencias en las interfases de estas tres enzimas se regulen por interacciones diferentes y lejanas a dicha región. Tales interacciones podrían llevarse a cabo mediante intrincadas redes de uniones no covalentes a lo largo de la proteína.

En este sentido, es apropiado señalar los estudios realizados en familias de proteínas oligoméricas (Clackson y Wells, 1995; Bogan y Thorn, 1998). En estos estudios se examinó cada residuo de la interfase para evaluar su aportación en la estabilidad. Los resultados demostraron que los residuos más importantes se distribuían en zonas discretas, en vez de localizarse a lo largo de la interfase. Además, existen evidencias que indican que residuos distantes a ésta región pueden jugar un papel importante en estabilizar interacciones proteína-proteína (Hedstrom, 1996). Se cree que tales residuos se encuentran acoplados energéticamente con aquellos directamente envueltos en la unión, por lo que la energía de unión entre las subunidades de proteínas se propaga a través de la estructura tridimensional (Lockless y Ranganathan, 1999).

Una tercera posibilidad es que entre las TIM de los tripanosomátidos existan diferencias importantes en las denominadas vibraciones atómicas (Anderson, et al 1997). En este sentido, es posible que la TcTIM presente gran movilidad atómica en su estructura, permitiendo que moléculas como los agentes derivatizantes penetren con mayor velocidad hacia la cisteína de interfase. Así, la TIM de *T. cruzi* presentaría una estructura con mayor flexibilidad molecular que la TbTIM.

La importancia sobre las diferencias en flexibilidad estructural entre ambas enzimas se exploró mediante el estudio de una propiedad distinta. Esto se discutirá en el siguiente apartado.

Con estas observaciones, se sugiere que la región de la interfase es un buen sitio para diseñar moléculas que perturben específicamente a las TIM de los parásitos. Además, un aspecto que contribuiría en el diseño de moléculas contra dicha región es comprender las propiedades que modulan la reactividad de sus residuos, como la cisteína 14.

SUSCEPTIBILIDAD A LA PROTEOLISIS LIMITADA DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

La proteólisis de proteínas tiene una importancia biológica ya que las proteínas se degradan a distintas velocidades *in vivo* por proteasas (Kidokoro, et al , 1990) La vida media *in vivo* de una proteína se ha definido como la “estabilidad biológica” A pesar de que una proteína tiene muchas zonas potencialmente hidrolizables, sólo algunas se cortan por proteasas. En otras palabras, cada sitio probable de corte tiene distinta susceptibilidad a la proteólisis, lo que indica que en la susceptibilidad a proteasas no solo es importante la secuencia primaria local, sino que otras propiedades de las proteínas afectan el mecanismo de digestión

Se han propuesto diversos factores que tienen un papel importante en la selectividad a la hidrólisis Uno de estos es la exposición al solvente (Richards, 1977, Richmond, 1984, Shrake y Rupley, 1973.), de hecho, se conoce que áreas expuestas al solvente como los “bordes” o “bisagras” de proteínas son reactivamente susceptibles a ser hidrolizados (Neurath, 1980, 1986, Benett y Huber, 1984) La hidrofobicidad (Sun, et al , 1993, Rose, et al , 1985, Eisenberg y McLachlan, 1986), y los factores de temperatura, conocidos también como flexibilidad molecular (Petsko y Ringe, 1984, Fontana et al , 1986) son de igual forma propiedades importantes para la proteólisis. Sin embargo, no existe una regla general acerca de cual es el factor principal que determina la susceptibilidad a la proteólisis

Existen estudios de digestión parcial por subtilisina de la triosafosfato isomerasa de conejo (Sun, et al , 1993, Vogel y Chmielewsky, 1994), levadura (Sun, et al , 1992), y *Plasmodium falciparum* (Ray, et al , 1999) Todas las TIM sufrieron cortes, pero en sitios diferentes Sin embargo, en todos los casos se encontro que las enzimas hidrolizadas

conservaban su actividad catalítica y no mostraban grandes cambios estructurales. Tal comportamiento no es frecuente y demuestra la robusta naturaleza que confiere el plegamiento de barril alfa-beta en estas enzimas

OBJETIVOS Y ESTRATEGIAS

El presente trabajo tiene dos principales objetivos. El primero es determinar los factores que contribuyen a las diferencias en reactividad de la Cys 14 de la triosafosfato isomerasa de *T. brucei* (TbTIM) y *T. cruzi* (TcTIM) a agentes químicos que modifican cisteínas. Este objetivo se cumplió de acuerdo a los siguientes experimentos.

- 1 -Debido a que existen diferencias en la composición de aminoácidos en el asa 3 de TbTIM y TcTIM, el primer factor que se evaluó fue el ambiente inmediato que rodea a la Cys 14. Por tanto, se llevó a cabo la sustitución sistemática en TcTIM de residuos de la interfase y del asa 3, por los que se encuentran en TbTIM. Las enzimas mutantes se expusieron al agente sulfhidrilo metilmetanotiosulfonato (MMTS) para evaluar los cambios del ambiente inmediato a la Cys 14 sobre su reactividad.
- 2 - Una vez que se estableció la contribución de los residuos de interfase, se determinó si las Cys 14 de TcTIM y TbTIM presentaban diferencias en el grado de ionización (pK_a^{app}). Este aspecto es importante debido a que el MMTS solo reacciona con la especie tiolato de la Cys14. Lo anterior se llevó a cabo titulando la reactividad por MMTS a distinto pH.
- 3 - A continuación se evaluó la contribución del pK_a^{app} de la Cys14 a la reactividad. Esto se realizó exponiendo a las TIM de *T. brucei*, *T. cruzi* y sus mutantes al MMTS en condiciones donde el estado de ionización de la Cys 14 fuera el mismo.

conservaban su actividad catalítica y no mostraban grandes cambios estructurales. Tal comportamiento no es frecuente y demuestra la robusta naturaleza que confiere el plegamiento de barril alfa-beta en estas enzimas.

OBJETIVOS Y ESTRATEGIAS

El presente trabajo tiene dos principales objetivos. El primero es determinar los factores que contribuyen a las diferencias en reactividad de la Cys 14 de la triosafosfato isomerasa de *T. brucei* (TbTIM) y *T. cruzi* (TcTIM) a agentes químicos que modifican cisteínas. Este objetivo se cumplió de acuerdo a los siguientes experimentos:

- 1 - Debido a que existen diferencias en la composición de aminoácidos en el asa 3 de TbTIM y TcTIM, el primer factor que se evaluó fue el ambiente inmediato que rodea a la Cys 14. Por tanto, se llevó a cabo la sustitución sistemática en TcTIM de residuos de la interfase y del asa 3, por los que se encuentran en TbTIM. Las enzimas mutantes se expusieron al agente sulfhidrilo metilmetanotiosulfonato (MMTS) para evaluar los cambios del ambiente inmediato a la Cys 14 sobre su reactividad.
- 2 - Una vez que se estableció la contribución de los residuos de interfase, se determinó si las Cys 14 de TcTIM y TbTIM presentaban diferencias en el grado de ionización (pK_a^{app}). Este aspecto es importante debido a que el MMTS solo reacciona con la especie tiolato de la Cys14. Lo anterior se llevó a cabo titulando la reactividad por MMTS a distinto pH.
- 3 - A continuación se evaluó la contribución del pK_a^{app} de la Cys14 a la reactividad. Esto se realizó exponiendo a las TIM de *T. brucei*, *T. cruzi* y sus mutantes al MMTS en condiciones donde el estado de ionización de la Cys 14 fuera el mismo.

El segundo objetivo fue el de explorar si existen diferencias en susceptibilidad a la proteólisis limitada por subtilisina en TbTIM y TcTIM. Este objetivo se cumplió de acuerdo a los siguientes experimentos

- 1 -Se comparó la susceptibilidad a la hidrólisis en ambas enzimas determinando la inactivación de las TIM a diferentes concentraciones de subtilisina. Posteriormente, se comparó la cinética de hidrólisis en ambas enzimas evaluando la inactivación de las TIM y valorando la hidrólisis mediante la determinación del monómero que queda aún sin cortar por densitometría óptica en geles desnaturalizantes de poliacrilamida
- 2 -Para explorar si las diferencias en velocidad de hidrólisis se debían a distinto número y sitio de cortes, se secuenciaron los NH-terminales de los péptidos que se obtienen por hidrólisis. En TcTIM se utilizó además espectrometría de masas
- 3 -Posteriormente se determinaron los cambios estructurales que la subtilisina ocasionó en TbTIM y TcTIM. Esto se determinó por cromatografía de exclusión molecular en HPLC y por su patrón de migración en geles no desnaturalizantes
- 4 -Asimismo, se determinó por fluorescencia intrínseca si la hidrólisis tenía efecto sobre el ambiente local de los residuos de triptofano de las TIM. Además, se evaluó la función del sitio activo mediante la obtención de las constantes cinéticas para el sustrato gliceraldehído 3-fosfato. Finalmente se obtuvo información sobre si la subtilisina modificaba las constantes de asociación entre los monómeros, ensayando la estabilidad de la TIM de *T. brucei* a distintas concentraciones de proteína

MATERIAL Y METODOS

Las técnicas y métodos que se utilizaron en cada trabajo, se detallan en la publicación y manuscrito que se adjuntan.

RESULTADOS

Lo siguiente es un resumen de los datos que se describen en los dos trabajos que se adjuntan en esta tesis. Uno está publicado (Reyes-Vivas, et al., 2001) y el otro se envió a evaluación para su posible publicación.

4) Los factores que regulan la reactividad de la cisteína de interfase en la trifosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* La identidad entre las secuencias primarias de la enzima homodimérica trifosfato isomerasa de los parásitos patógenos, *Trypanosoma brucei* (TbTIM) y *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) es de 70 %. Sus estructuras tridimensionales son también muy similares. En las dos TIM, la cadena lateral de la Cys 14 de cada subunidad se inserta en el asa 3 de la otra subunidad. Sin embargo, la Cys 14 de TcTIM es cerca de cien veces más susceptible al agente sulfhidrilo metilmetanotiosulfonato (MMTS) que la de TbTIM. Las causas de estas diferencias se exploraron midiendo la constante de segundo orden de inactivación por MMTS (k_2) bajo distintas condiciones. Primero se estudió si la distinta susceptibilidad al MMTS se debía al ambiente inmediato de la Cys14. Al inicio del extremo -NH del asa 3 de TcTIM se encuentran la Thr69 y la Arg70, mientras que al principio del extremo -NH de la hélice 3 se encuentra la Gln81. En estas posiciones la TbTIM tiene Ala, Lys y Pro respectivamente. Así, se sustituyeron en TcTIM silvestre los residuos naturalmente presentes en TbTIM. A pH 7.4 la k_2 en TcTIM es 70 veces mayor que en TbTIM. La triple mutación en TcTIM disminuyó la diferencia en k_2 a 30

MATERIAL Y METODOS

Las técnicas y métodos que se utilizaron en cada trabajo, se detallan en la publicación y manuscrito que se adjuntan

RESULTADOS

Lo siguiente es un resumen de los datos que se describen en los dos trabajos que se adjuntan en esta tesis. Uno está publicado (Reyes-Vivas, et al , 2001) y el otro se envió a evaluación para su posible publicación

) Los factores que regulan la reactividad de la cisteína de interfase en la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* La identidad entre las secuencias primarias de la enzima homodimérica triosafosfato isomerasa de los parásitos patógenos, *Trypanosoma brucei* (TbTIM) y *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) es de 70 % Sus estructuras tridimensionales son también muy similares En las dos TIM, la cadena lateral de la Cys 14 de cada subunidad se inserta en el asa 3 de la otra subunidad Sin embargo, la Cys 14 de TcTIM es cerca de cien veces más susceptible al agente sulfhidrilo metilmetanotiosulfonato (MMTS) que la de TbTIM Las causas de estas diferencias se exploraron midiendo la constante de segundo orden de inactivación por MMTS (k_2) bajo distintas condiciones Primero se estudió si la distinta susceptibilidad al MMTS se debía al ambiente inmediato de la Cys14 Al inicio del extremo -NH del asa 3 de TcTIM se encuentran la Thr69 y la Arg70, mientras que al principio del extremo -NH de la hélice 3 se encuentra la Gln81 En estas posiciones la TbTIM tiene Ala, Lys y Pro respectivamente Así, se sustituyeron en TcTIM silvestre los residuos naturalmente presentes en TbTIM A pH 7.4 la k_2 en TcTIM es 70 veces mayor que en TbTIM La triple mutación en TcTIM disminuyó la diferencia en k_2 a 30

veces. Estos resultados mostraron que el ambiente inmediato que rodea la Cys14 contribuye a la distinta reactividad entre TbTIM y TcTIM. Sin embargo, la diferencia de 30 veces es aún muy significativa y sugiere la existencia de otros posibles factores que asisten también al control de la reactividad de la Cys14. Por lo que se procedió a caracterizar una propiedad más de este residuo de interfase.

A continuación se determinó si las diferencias se debían al distinto grado de ionización del grupo $-SH$ de la Cys14. Debido a que el MMTS solo reacciona con la especie tiolato, fue posible determinar el pKa del grupo $-SH$ de la Cys14 midiendo la k_2 a distintos pHs. Los valores de pKa aparente (pK_a^{app}) de la Cys 14 de TcTIM y su triple mutante fueron 0.7 unidades de pH menores que en TbTIM. Para determinar la contribución del pK_a^{app} de la Cys 14 en las diferencias en sensibilidad al MMTS, se evaluó la reactividad de TcTIM y TbTIM bajo el mismo grado de protonación. En tal condición, la diferencia entre la k_2 de TcTIM y TbTIM fue sólo de 8 veces. Empleando la triple mutante de TcTIM, la contribución de los residuos del asa 3 se evaluó en condiciones de mismo grado de ionización de la Cys14. Así, la k_2 en ésta mutante fue sólo 1.5 veces mayor que TbTIM. Debido a que en estudios previos se demostró que el análogo de sustrato, fosfoglicolato (PG) disminuía a la mitad la k_2 en TcTIM, en este trabajo se examinó su posible efecto en el pK_a^{app} de la Cys14. Los datos mostraron que el PG no modificó el pK_a^{app} del tiol de la Cys14, a pesar de disminuir la k_2 . Cuando el efecto del análogo se ensayó en condiciones de mismo grado de ionización de la Cys14, se encontró que la diferencia en k_2 entre TcTIM y TbTIM fue de 1.5 veces, y de 0.8 veces entre la triple mutante y TbTIM. En esta forma, la ocupación del sitio activo por el análogo de sustrato transmite un cambio conformacional a la interfase disminuyendo la reactividad de la Cys14 sin alterar su pK_a^{app} . La posible forma de inducir este cambio

conformacional desde el sitio activo hacia la interfase se discutirá mas adelante. Todos estos resultados indican que la reactividad de la Cys14 depende de distintos factores.

II) Diferencias en susceptibilidad a la proteólisis limitada en la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* Como se mencionó, la triosafosfato isomerasa de los parásitos patógenos *Trypanosoma brucei* (TbTIM) y *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) son enzimas homodiméricas y muestran un 70 % de identidad en su secuencia primaria. Con la intención de estudiar la flexibilidad de sus estructuras se evaluó su susceptibilidad a la hidrólisis limitada por subtilisina de Carlsberg. Para ello, se midió la resistencia de ambas enzimas a distintas concentraciones de subtilisina. TcTIM mostró la pérdida de su actividad a concentraciones de proteasa menores que en TbTIM. Para determinar la dependencia entre inactivación e hidrólisis, la digestión parcial se evaluó en cursos temporales a una relación molar de una subtilisina por cada 4 TIM's. En tal condición, TcTIM mostró una inactivación exponencial (0.11 h^{-1}) que fue simultánea con el porcentaje de hidrólisis. En este tipo de experimentos tambien se observó que a pesar de que la enzima se hidrolizó completamente, no fue posible detectar fragmentos proteicos. Por otro lado, en la digestión de TbTIM por subtilisina se encontraron una fase rápida y una lenta en su inactivación y porcentaje de hidrólisis. Ajustando la fase rápida a un decaimiento exponencial sencillo, la velocidad de inactivación fue de 0.027 h^{-1} , siendo 4 veces menor que en TcTIM. La preparación de TbTIM mostro además fragmentos de proteína que se incrementaron con el tiempo de incubación.

Se exploró si el origen de las diferencias en hidrólisis entre ambas enzimas se debía a distintos sitios de corte. TbTIM presento un corte en el extremo NH de la segunda parte de la α -helice 5 (I139/A140) y otro en el extremo NH de la helice 6 (Q181/Q182). TcTIM

mostró un corte en el extremo -NH de la hélice 5 (T130-N131) y uno más, al extremo -NH de la hélice 6 (Q181/Q182). Como la TcTIM no se logró estudiar cinéticamente debido a su rápida inactivación e hidrólisis, se estudió la conducta cinética y estructural de la TbTIM. Así, se decidió analizar muestras de TbTIM que alcanzaron la fase lenta de hidrólisis y que exhiben un 50 % de actividad residual. Por lo que se determinó el perfil cromatográfico por exclusión molecular de la TbTIM expuesta a subtilisina durante 36 hrs. Los resultados mostraron que el tiempo de retención entre esta preparación y la enzima nativa fueron los mismos. Para corroborar si la hidrólisis afectaba la estructura tridimensional de TbTIM, se determinó en un curso temporal sus propiedades electroforéticas en condiciones no desnaturalizantes. Los datos mostraron que en la TbTIM la banda de la enzima nativa desaparece gradualmente al tiempo que aparece una de menor movilidad. TcTIM también se evaluó bajo estas condiciones, la proteína desaparece completamente sin mostrar otra banda. Asimismo se determinó la fluorescencia intrínseca de la TbTIM expuesta a subtilisina durante 36 hrs. La enzima truncada mostró un corrimiento hacia el rojo de 5 nm y una disminución en su emisión de un 5 %. Se sabe que en la TIM de levadura existe un residuo de Trp que se localiza en el extremo -NH del asa 6 (Trp170), y que es el principal contribuyente a la fluorescencia intrínseca de esta enzima (Sampon y Knowles, 1992). La TbTIM también presenta el Trp170, por lo que es posible que la perturbación en el espectro de emisión de la enzima hidrolizada sea un reflejo de alteraciones en su asa 6. La K_m para el gliceraldehído 3-fosfato de la TbTIM nativa y cortada fue similar, pero en la enzima cortada la k_{cat} disminuyó a la mitad, sugiriendo que solo un sitio es catalíticamente activo.

El tratamiento con subtilisina podría también afectar las interacciones en la interfase, teniendo como consecuencia la alteración de la afinidad entre los monómeros. Por tanto, se

evaluó la estabilidad a la dilución de la TbTIM expuesta a subtilisina. Las K_D aparentes entre los monómeros de las formas nativa y troncada de TbTIM fueron muy similares ($3 \times 10^{-8} M$ y $8 \times 10^{-8} M$ respectivamente) sugiriendo que los cortes no perturbaron la asociación entre los monómeros

En conjunto, los resultados de la digestión limitada muestran que en TcTIM los primeros eventos de hidrólisis facilitan acciones posteriores y extensivas de proteólisis, conduciendo la pérdida completa de su actividad y estructura. Por el contrario, la TbTIM parcialmente digerida mantiene una estructura similar a la nativa. Además, la hidrólisis de TbTIM parece ser asimétrica, cortándose primero una subunidad y después la otra.

DISCUSION

Elementos que afectan la reactividad de la Cys de interfase en TbTIM yTcTIM.

Como en general el número de residuos conservados es menor en la interfase de proteínas homólogas que en su sitio activo, pero mayor que en el resto de la proteína. La diferencia en composición de residuos en la interfase podría conferir propiedades individuales a las enzimas de cada especie. Además hay que recordar que existe una compleja red de interacciones no covalentes, locales y a distancia, que también modulan las propiedades de dicha región. Las diferencias en susceptibilidad a agentes perturbantes de la Cys 14 entre TbTIM y TcTIM es un ejemplo muy ilustrativo de cómo tales propiedades afectan radicalmente a la reactividad de un residuo de interfase.

Sustituyendo sistemáticamente algunos residuos mediante mutagénesis dirigida y evaluando la derivatización de la cisteína de interfase a distintos pH, encontramos que es posible determinar los factores que gobiernan la distinta susceptibilidad de este residuo a reactivos de grupo sulfhidrilo en TbTIM y TcTIM. Los datos demuestran que existen contribuciones locales y contribuciones que pueden calificarse como distantes. Los residuos vecinos a la Cys14 en TbTIM parecen formar una mejor barrera estérica contra la accesibilidad al agente derivatizante que en TcTIM. En tanto que las diferencias en el pK_a^{app} del -SH de la Cys 14 inducen una mayor población de la especie reactiva (tiolato) en TcTIM (Bednar, 1990, Bulaj, et al., 1998). Las interacciones que inducen las diferencias en el grado de ionización de la Cys 14 entre TbTIM y TcTIM parecen localizarse a distancia de este residuo e incluso, fuera de la región de la interfase.

En este sentido, resulta oportuno comentar las observaciones de Lockless y Ranganathan (1999) sobre una familia de enzimas donde se estudiaron sus contactos proteína-proteína

Ellos observaron que los miembros de esta familia contienen residuos fuera de la interfase que son importantes para la estabilidad. Estos residuos transmiten su energía de unión a través de la estructura tridimensional. Con respecto al control de la reactividad a distancia de una región, recientemente se analizó tal efecto en la activación alostérica de la enzima glucosamina 6 fosfato desaminasa, en términos de la flexibilidad molecular (Rudiño-Piñera, et al. en prensa). En este sistema se encontró que los cambios conformacionales entre el estado "T" y el estado "R" pueden llevarse a cabo a través de vibraciones atómicas. La importancia de la flexibilidad molecular en este sistema no solo se observa sobre la regulación alostérica, sino también sobre el proceso de unión con el sustrato, induciendo un incremento en afinidad por el sustrato. Los estudios con la TIM de levadura y tripanosoma confirman la existencia de relaciones a distancia entre centros catalíticos e interfase (Sun, et al., 1992, Pérez-Montfort, et al., 1999, Reyes-Vivas, et al. 2001) y entre centro catalítico y centro catalítico (Harris, et al., 1998). Por tanto, la posibilidad de que el grado de ionización de la Cys 14 se regule por residuos acoplados fuera de la interfase resulta atractiva. Esto último origina la siguiente pregunta: ¿Cuáles son las relaciones distantes que controlan la ionización de la cisteína de interfase? En éste sentido los resultados sobre el efecto de la subtilisina en TcTIM y TbTIM son interesantes.

Hidrólisis limitada de la triosafosfato isomerasa

Se ha observado que de un gran número de posibles sitios de hidrólisis en una proteína, las proteasas actúan sobre unos cuantos lugares. Esta preferencia parece estar sujeta a las propiedades locales del sitio de corte tales como exposición al solvente, flexibilidad e hidropatía. Por tanto, el método de digestión limitada permite hacer algunas inferencias sobre ciertas propiedades de las proteasas.

En este trabajo se presenta el análisis comparativo de la sensibilidad a la digestión limitada por subtilisina de TbTIM y TcTIM. Ambas enzimas presentan características estructurales muy similares (Fig. 1). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la sensibilidad a la hidrólisis entre las dos enzimas. TcTIM es más susceptible a la hidrólisis que TbTIM a pesar de que los sitios de corte entre ambas enzimas son similares. Uno de ellos se encuentra exactamente en el mismo sitio, en el extremo NH de la α -hélice 6. El otro sitio de corte fue en distintas partes de la α -hélice 5. Esta hélice se divide por una pequeña asa, en TcTIM el sitio de corte se encuentra al inicio de la primera parte de la hélice, mientras que en TbTIM el corte se encuentra al inicio de la segunda parte (ver figura 3 de segundo manuscrito).

Existen estudios previos sobre la susceptibilidad a la hidrólisis limitada de la TIM de otras especies (Sun, et al., 1993; Vogel y Chmielewski, 1994; Ray et al., 1999). Todas ellas se hidrolizaron con subtilisina de Carlsberg y de su análisis se observó que los sitios de corte se encuentran en distintas regiones de la proteína. Los autores también muestran que estas enzimas presentan actividades y propiedades estructurales similares a sus enzimas nativas. Por tanto, la posibilidad de que las diferencias en susceptibilidad a la subtilisina entre TcTIM y TbTIM se deban al distinto sitio de corte dentro de la α -hélice 5 resulta remota. La otra posibilidad es que las diferencias en susceptibilidad a la hidrólisis se deban al grado de movilidad o "flexibilidad" de las enzimas. En este sentido, pensamos que TcTIM tiene una alta flexibilidad y esto la hace un mejor sustrato para la subtilisina. Las diferencias en flexibilidad podrían explicar otras diferencias entre TcTIM y TbTIM. A pesar de que la K_D entre los monómeros de TbTIM y TcTIM es similar, es posible que una mayor flexibilidad en la estructura de esta última también induzca con mayor frecuencia la exposición al

solvente de zonas ocultas como por ejemplo, la interfase y su Cys14. Como consecuencia, el grado de ionización de la Cys14 se incrementaría y aumentaría su reactividad. En este punto, resulta adecuado comentar una revisión de Petsko (1996a). El autor señala que existen algunos ejemplos en donde moléculas orgánicas grandes son capaces de unirse a cavidades profundas e inaccesibles de proteínas. Tal es el caso de las fenilhidrazidas o el triyodomercurio que penetran a un sitio oculto al solvente de la mioglobina. La explicación de esto es que dichos ligandos deben difundir a través de la proteína mediante desplazamientos sutiles de los átomos y grupos. Así, la estructura tridimensional de una proteína es en realidad un promedio de las distintas conformaciones que puede adoptar (Petsko, 1996a; Luque y Freire, 2000)

La otra observación importante es que la enzima de *T. brucei* tratada con subtilisina mostró características muy particulares. TbTIM parece presentar una hidrólisis asimétrica: una subunidad se hidroliza e inactiva primero y después se hidroliza la otra subunidad. Se han propuesto dos posibles explicaciones para tal asimetría: a) uno de los monómeros es intrínsecamente más susceptible a la hidrólisis que el otro, b) la hidrólisis de uno de los monómeros induce en la otra subunidad cambios conformacionales que la vuelven más resistente a la acción de la subtilisina a proteolizar. Aunque en este momento no somos capaces de saber cual de las 2 propuestas es correcta, es importante señalar la existencia de observaciones a favor de ambas explicaciones. Por ejemplo, la asimetría entre los dos monómeros también se observó en varias estructuras cristalográficas. La mayoría de las TIM muestran un asa 6 (catalítica) en posición cerrada, mientras que el asa del otro monómero se encuentra en posición abierta, incluso en estructuras de TIM ausentes de ligando. La 1cTIM cristalizada en presencia de solvente orgánico (Gao, et al., 1999) presentó dos moléculas de

hexano en la interfase y una molécula fuera de esta región. Esta última molécula de hexano solo se observó en una de las subunidades. Resulta además interesante que este último hexano se presenta muy cerca de la α -hélice 5, que es la región del segundo corte de TcTIM y TbTIM. Estos datos apoyarían la posibilidad de que la TbTIM presenta asimetría intrínseca

Como se mencionó en la primera parte de la discusión, existen antecedentes que muestran comunicación entre sitio activo e interfase (Sun, et al., 1992; Pérez-Montfort, et al., 1999; Reyes-Vivas, et al. 2001) así como entre los sitios activos (Harris, et al., 1998). De esta forma, es posible que aquello que altere a una subunidad podría afectar a la otra subunidad, por lo que la asimetría podría ser un efecto inducido por un agente perturbante o un ligando

Una conclusión general del análisis de ambos trabajos es que, las diferencias observadas entre TcTIM y TbTIM parecen manifestar disimilitudes en una misma propiedad la existencia de distinto grado de flexibilidad estructural entre las dos enzimas. En este sentido, es interesante observar que TcTIM parece presentar mayor movilidad atómica que TbTIM, no obstante que estas enzimas comparten un 70 % de identidad en sus secuencias y sus estructuras tridimensionales son muy similares. Esta idea parece contraponerse además con la observación de que los factores de temperatura entre TcTIM y TbTIM no muestran diferencias significativas, que son una medida del grado de flexibilidad estructural. Sin embargo, debe advertirse que estos valores a menudo se obtienen de un refinamiento de datos de difracción que no estima suficientemente bien las diferencias en movilidad estructural. En este sentido, sería provechoso comparar la estructura de TcTIM con la de alguna TIM obtenida a muy alta resolución (la de *E. histolytica* por ejemplo) realizando un

álisis similar al expuesto para la regulación alostérica de la glucosamina 6 fosfato
esaminasa (Rudiño-Piñera et al , en prensa). El objetivo sería reevaluar la posible diferencia
que exista en vibraciones atómicas y conocer los residuos directamente involucrados en tales
diferencias. Esta información será de gran utilidad cuando se definan las propiedades que
requiere un compuesto para desestabilizar específicamente las interacciones de la interfase
de la TIM del parásito, sin alterar la del hospedero.

REFERENCIAS

- Ahern, T J , Casal, J I , Petsko, G A , Klibanov, A M. (1987) Proc. Natl Acad Sci. U S A 84 675-679
- Alber, T , Banner, D W , Bloomer, A C., Petsko, G. A., Phillips, D C., Rivers, P. S., Wilson, I A , (1981) Philos, Trens, R Soc. London B 293.159-171
- Alberty, W J , Knowles, J R (1976) Biochemistry 15:5631-5640
- Ali, B R , Pal, A , Croft, S L , Taylor, R. J , Field, M. C. (1999) Mol Biochem. Parasitol 104 67-80
- Alvarez, M , Zeelen, J. P , Mainfroid, V , Rentier-Delrue, F., Martial, J. A , Wyns, L , Wierenga, R K , Maes, D (1998) J Biol Chem. 273 2199-206
- Alvarez, M , Wouters, J , Maes, D , Mainfroid, V , Rentier-Delrue, F., Wyns, L , Depiereux, E , Martial. J A (1999) J Biol Chem 274 19181-19187
- Anderson, H D . Weiss, S M , Eisenberg, D (1997) J Mol Biol. 273 479-500
- Aronov, A M Suresh, S , Buckner, F S , Van Voorhis, W C , Verlinde, C L , Opperdoes F R , Hol, W G , Gelb, M H (1999) Proc Natl Acad Sci U S A 96 4273-4278
- Baker, B M , Michels, P A M , Opperdoes, F R Westerhoff, H V (1997) J Biol Chem 272 3207-3215
- Bajaj, M , Blundell, T (1984) Annu Rev Biophys Bioenerg 13 453-492
- Bennett, W S , Huber, R (1984) CRC Crit Rev Biochem 15 291-384
- Bednar, R A (1990) Biochemistry 29 3684-3690
- Blundell, T I (1996) Nature, 384, supp 7 23-26
- Bogan, A A , Thorn, K S (1998) J Mol Biol 280 1-9

- Bonnet, B , Soulez, D Davioud-Chavet, E , Landry, V , Horvath, D , Sergheraert, C
(1997) *Bioorg. Med Chem* 5 1249-1256
- Borchert, T V , Pratt, K , Zeelen, J P , Callens, M , Noble, M E , Opperdoes, F. R ,
Michels, P. A., Wierenga, R K (1993) *Eur. J Biochem.* 211:703-10
- Borchert, T. V , Abagyan, R., Radha Kishan, K. V , Zeelen, J Ph., Wierenga, R K (1993b)
Structure 1 205-213
- Borchert, T V., Abagyan, R , Jaenicke, R., Wierenga, R K (1994) *Proc. Natl. Acad Sci*
U S.A 91.1515-1518
- Borchert, T V., Zeelen, J. P , Schliebs, W , Callens, M , Minke, W , Jaenicke, R., Wierenga,
R. K. (1995) *FEBS Letts* 367 315-318
- Bouteille, B , Marie-Daragon, A , Chauviere, G , de Albuquerque, C , Enanga, B , Darde,
M L , Vallat, J M , Perie, J , Dumas, M (1995) *Acta Trop* 60 73-80
- Bulaj, G., Kortemme, T , Goldenberg, D P (1998) *Biochemistry* 37 8965-8972
- Casal, J I , Ahern, T J , Davenport, R C , Petsko, G A , Klibanov, A M (1987)
Biochemistry 26 1258-1264
- Clackson, T , Wells, J A (1995) *Science* 267 383-386
- 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) *Protein Sci* 4 2594-2604
- Dunford, H B , Cotton, M L (1975) *J Biol Chem* 250.2920-32
- Eisenthal, R , Cornish-Bowden, A (1998) *J Biol Chem* 273 5500-5505
- Lisenberg, D , McLachlan, A D (1986) *Nature* 319 199-203
- Fatber, G K , Petsko, G A (1990) *Trends Biochem Sci* , 15 228-234
- Fersht, A (1985) *Enzyme Structure and Mechanism* W H Freeman and Co

- Fersht, A R (1998) "Protein stability in Structure and mechanism in protein science". W
H. Freeman and Co. N.Y
- Flohe, L. (1998). Biofactors. 8 87-91
- Fontana, A , Fascina, G., Vita, C , Dalzoppo, D , Zamai, M , Zambonin, M (1986)
Biochemistry. 25:1847-1851
- Gao, X. G , Maldonado, E , Pérez-Montfort, R , Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-
Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Rodríguez-Romero, A. (1999) Proc Natl. Acad. Sci.
USA 96 10062-10067
- Garza-Ramos, G , Tuena de Gómez-Puyou, M , Gómez-Puyou, A , Gracy, R W. (1992)
Eur. J. Biochem 208 389-395
- Garza-Ramos, G , Pérez-Montfort, R , Rojo-Dominguez, A , de Gómez-Puyou, M T ,
Gómez-Puyou, A (1996) Eur J Biochem 241 114-20
- Garza-Ramos, G , Cabrera, N , Saavedra-Lira, E , Tuena de Gómez-Puyou, M , Ostoa-
Saloma, P . Pérez-Montfort, R , Gomez-Puyou, A (1998) Eur J Biochem 253 684-91
- Gichuki, C W Nantulya, V M , Sayer, P D (1999) Investigation on the clinical efficacy
against T rhodesiense infection and pharmokinetics of the novel compound SIPI 1029 in
African green (vervet) monkeys International Scientific Council for Typanosomiasis
Research and Control (ISCTRC), 25th Meeting, Mombassa, Kenya, Provisional Abstract
p 23
- Gómez-Puyou, A , Saavedra-Lira, E , Becker, I , Zubillaga, R A , Rojo-Dominguez, A ,
Pérez-Montfort, R (1995) Chem Biol 2 847-55
- Gopal, B , Rav, S S , Gokhale, R S , Balaram, H , Murthy, M R N , Balaram, P (1999)
Biochemistry 38 478-486

- Gupta, R A , Yuan, C S , Ault-Riché, D B , Borchardt, R. T (1995) Arch Biochem. Biophys 319:365-371.
- Harris, T K , Cole, R. N , Comer, F I , Mildvan, A S. (1998) Biochemistry. 37 16828-16838
- Hartman, F C , Norton, I. L. (1974) Methods. Enzymol 41:447-53
- Hedstrom, L. (1996) Biol Chem. 377 465-470
- Hofsteenge, J , Braun, P J , Stone, S. R. (1998). Biochemistry 27:2144-2151.
- Huang, H , Yuan, C S , Borchardt, R. T (1997). Protein Science 6:1482-1490.
- Huang, T G , Hackney, D D (1994). J. Biol Chem 269 16493-501
- Hunter, W N (1997) Parasitology. 114:S17-S29
- Jackson, D. S , Brown, A D., Schaeper, R J , Powers, J C. (1995). Arch Biochem Biophys 323 108-14
- Jacoby, E M , Schlichting, I , Lantwin, C B , Kabasch, W , Krauth-Siegel, R L (1996) Proteins 24 73-80
- Joseph, D , Petsko, G A , Karplus, M (1990) Science 249 1425-1428
- Joseph-McCarthy, D , Lohs, E , Komives, A E , Petsko, A G (1994) Biochemistry 33 2815-2823
- Juul, B , Turc, H , Durand, M L , Gómez de Garcia, A , Denoroy, L , Møller, J V , Champel, P , Maire, M L (1995) J Biol Chem 270 20123-20134
- Kaminsky, R , Schmid, C , Grether, Y , Holy, A , DeClercq, E , Naesens, L , Brun, R (1996) Trop Med Int Health 1 255-263
- Keiser, J , Stich, A , Burri, C (2001) IRI:NDS Parasitol 17 42-49

- Kidokoro, S., Miki, Y , Wada, A (1990) "Physical and biological stability of globular proteins" en *Protein structural analysis, folding and design* (Hatano, M ed) Japan scientific societies press Elsevier Amsterdam-Oxford-New York-Tokio.
- Knowles, J. R , Albery, W J. (1977) *Acc Chem Res* 10 105-111
- Knowles, J. R (1991) *Nature* 350 121-124
- Koide, T., Nose, M , Inoue, M , Ogihara, Y , Yabu, Y , Ohta, N (1998) *Planta Med.* 64.27-30
- Kohl, L , Callens, M , Wierenga, R K , Opperdoes, F R , Michels, P A (1994) *Eur J. Biochem* 220 331-8
- Komives, E. A , Chang, L C , Lolis, E , Tilton, R. F , Petsko, G A y Knowles, J R. (1991) *Biochemistry* 30 3011-3019
- Kohlhoff, M., Dahm, A , Hensel, R (1996) *FEBS Letters* 383 245-250
- Krietsch, W K G , Pentchev, P G , Klingenburg, H , Hofstatter, T y Bumcher, T (1970) *Eur J Biochem* 14 289-300
- Lamber, A M , Opperdoes, F R , Wierenga, R K (1987) *Eur J Biochem* 168 69-74
- Landa, A , Rojo-Dominguez, A , Jimenez, L , Fernandez-Velasco, D A (1997) *Eur J Biochem* 247 348-55
- Lodi, P , Chang, C L , Knowles, R J , Komives, A E (1994) *Biochemistry* 33 2809-2814
- Lolis, E , Alber, T , Davenport, R C , Rose, D , Hartman, F C , Petsko, G A (1990) *Biochemistry* 29 6609-6618
- Lolis, F , Petsko, G A (1990) *Biochemistry* 29 6619-6625
- Lockless, S W , Ranganathan, R (1990) *Science* 286 295-299

- Lodi, P J., Knowles, J R (1991) *Biochemistry* 30:6948-6956
- Loiseau, P. M Czok, M , Chauffert, O., Bourass, J , Letourneux, Y. (1998) *Parasite*.
5:239-246
- Luque, I , Freire, E (2000) *Proteins:Struct Function Genet. Suppl.* 4 63-71
- Maes, D , Celen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M H D , Backmann,
J., Martial, J A , Wyns, L , Jaenicke, R., Wierenga, R. K. (1999) *Proteins*. 37 441-453
- Mainfroid, V., Terpstra, P , Beaugard, M., Frere, J M , Mande, S. C , Hol, W G J.,
Martial, J. A , and Goraj, K (1996) *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 , Gómez-Puyou,
A (1997) *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 , Perez-Montfort, R (1998) *J Mol Biol*
283 193-203
- Maldonado, E (1998) "Cristalogénesis y análisis estructural de la triosafosfato isomerasa
de *Trypanosoma cruzi*" Tesis doctoral
- Mande, S C , Mainfroid, V , Kalk, K H , Goraj, K , Martial, J A , Hol, W G J (1994)
Protein Sci 3 810-821
- Marchionni, M , y Gilbert, W (1986) *Cell* 46 133-141
- Mowatt, M R , Weinbach, E C , Howard, T C , Nash, T E (1994) *Exp Parasitol* 78 85-
92
- Nagano, N , Hutchinson, G E , Thornton, J (1999) *Protein Science* 8 2072-2084

Neurath, H (1980) Protein folding (Jaenicke, R, ed) Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam, New York.

Neurath, H (1986) Chem Scripta. 27B 221-229

Nickbarg, E B., Knowles, J R (1988) Biochemistry 27:5939-5947

Nickbarg, E B., Daventport, R. C, Petsko, G A, Knowles, J R (1988) Biochemistry 27 5948-5960

Noble, M E, Wierenga, R W., Lambeir, A M, Opperdoes, F R, Thunnisen, A M. W H., Kalk, K. H., Groendijk, M. Hol, W. G J (1991) Proteins Struct Funct Genet. 10 50-69

Noble, M E, Zeelen, J P Wierenga, R K (1993) Proteins Struct Funct, Genet. 16:311-326

Nok, A J, Williams, S, Onyenekwe, P C (1996) Parasitol Res 82-634637

Nok, A J, Ibrahim, S, Arowosafe, S, Longdet, I, Ambrose, A, Onyenekwe, P C., Whong, C Z (1994) Vet Hum Toxicol 36 522-524

Norledge, B V, Lambeir, A M, Abagyan, R A, Rottmann, A, Fernandez, A M, Filmonov, V V, Pcter, M B, Wierenga, R K (2001) Proteins Struc Function Genet 42 383-389

Nose, M Koide, T, Ogihara, Y, Yabu, Y, Ohta, N (1998) Biol Pharm Bull 21 643-645

Ostoa-Saloma, P, Garza-Ramos, G, Ramirez, J, Becker, I, Berzunza, M, Landa, A, Gómez-Puyou, A, Tuena de Gómez-Puyou, M, Perez-Montfort, R (1997) Eur J Biochem 244 700-5

- Pérez-Montfort, R , Garza-Ramos, G , Hernández-Alcantara, G , Reyes-Vivas, H., Gao, X
 G , Maldonado, E , Tuena de Gómez-Puyou, M , Gómez-Puyou, A (1999)
 Biochemistry. 38 4114-4120
- Petsko, G A., Ringe, D (1984) Annu Rev. Biophys Bioeng 13 331-371
- Petsko, G A (1996). Nature 384,supp 7:7-9
- Petsko, G A. (1996a) Nature Struct. Biol. 3.565-566
- Plaut, B , Knowles, J. R. (1972) Biochem. J. 129 311-20
- Pollegioni, L , Ceciliani, F., Curti, B , Ronchi, S , Pilone, M S (1995) Biochem. J
 310 577-583
- Pompliano, d L , Peyman, A , Knowles, J. R. (1990) Biochemistry 29 3186-3194
- Protein Data Bank, Reseach Collaboratory for Structural Bioinformatics
- Putman, S J , Coulson, A F W , Farley, T R T , Rddleston, B Knowles, J R (1972)
 Biochem J 129 301-310
- Ray, S S , Balaram, H , Balaram, P (1999) Chem Biol 6 625-637
- Rcardon, D , Farber, G K (1995) FASEB J 9 497-503
- Reyes-Vivas, H , Hernández-Alcántara, G , López-Velázquez, G , Cabrera, N , Pérez-
 Montfort, R , Tuena de Gómez-Puyou, M Gómez-Puyou, A (2001) Biochemistry
 40 3134-3140
- Richard, J P (1984) J Am Chem Soc 106 4926-4936
- Richard, J P (1991) Biochemistry 30 4581-5
- Richards, F M (1977) Annu Rev Biophys Bioeng 6 151-176
- Richmond, T J (1984) J Mol Biol 178 63-89
- Rose, I A , O'Connell, F L. (1961) J Biol Chem 236 3086-3092

- Rose, G D , Gierasch, L. M , Smith, J A (1985) *Adv Protein Chem* 37 1-109
- Sampson, N S , y Knowles, J R. (1992) *Biochemistry* 31:8488-94
- Sawyer, T H, Gracy, R. W (1975) *Arch Biochem Biophys* 169 51-7
- Schliebs, W., Thanki, N , Eritja, R , Wierenga, R K (1996) *Protein Sci.* 5:229-239
- Schliebs, W Thanki, N , Jaenicke, R , Wierenga, R K., (1997) *Biochemistry* 36:9655-9662
- Schnackerz, K D., Gracy, R W. (1991) *Eur J. Biochem* 199:231-238
- Shrake, A , Rupley, J. A (1973) *J Mol. Biol* 79 351-71
- Siddiqui, K S , Rangarjan, M , Hartley, B S , Kitmitto, A , Panico, M., Plench, I P ,
Morris, H R , (1993). *Biochem J* 289 201-208
- Spence, P (1999) *Prog Drug Res.* 53:157-191
- Sun, A Q., Yuksel, K U , Gracy. R W. (1993) *J Biol Chem* 268 26872-26878
- Sun, A Q , Yuksel, U , and Gracy, R (1992) *J Biol Chem* 267 20168-20174
- Sun, J , Sampson, S (1998) *Protein Science* 7 1495-1505
- Sun, J , Sampson, S (1999) *Biochemistry* 38 11474-11481
- Tovar, J , Fairlamb, A N (1996) *Nucleic Acids Research* 24:2942-2949
- Valdar, W S J , Thorton, J M. (2001) *Proteins structure, function, Genet* 42 108-124
- Velanker, S S , Ray, S S , Gokhale, R S , Suma, S , Balaram, H , Balaram, P , Murthy, M
R N (1997) *Structure* 5 751-761
- Verlinde, C L J , Merrit, E A , van der Akker, F , Kim, H , Fiel, I , Delboni, L F , Mande,
S C , Sarfaty, S , Petra, P H Hol, W G J (1994) *Protein Sci* 3 1670-1686
- Verlinde, C I. M J , Hol, W G J (1994) *Structure.* 2 577-587
- Vogel, K , Chmielewski, J (1994) *J Am Chem Soc* 116 11164
- Waley S G (1973) *Biochem J* 135 165-172

- Waechter, A I Cave, A , Hocquemiller, R , Bories, C., Munoz, V., Fournet, A (1999)
Phytother, Res 13 175-177
- Webb, M R., Standing, D. N. Knowles, J. R. (1977) *Biochemistry* 16.2738-2741
- Wierenga, R K , Noble, M. E M., Vriend, G., Nauche, S., Hol, W G J (1991) *J. Mol. Bio* 220:995-1015
- Wierenga, R K , Noble, M. E M (1992) *J Mol Biol.* 224 1115-1126
- Williams, J C., McDermott, A. E. (1995) *Biochemistry.* 34:8309-8319
- Williams, J C , Zeelen, J P., Neubauer, G , Vriend, G., Backmann, J , Michels, P. A., Lambeir, A M , Wierenga, R K (1999) *Protein Eng* 12:243-250
- Willson, M , Callens, M , Kuntz, D A , Perié, J , Opperdoes, F. R. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol* 59:201-210
- Wlodawer, A , Vondrasek, J (1998) *Annu, Rev Biophys. Biomol Struct* 27 249-284
- Yabu, T , Nose, M , Koide, T . Ohta, N , Ogihara, Y (1998) *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 29.599-604
- Zabori, S , Rudolph, R , and Jaenicke, R (1980) *Z Naturforsch* 35 999-1004
- Zhang, Z , Sugio, S , Komives, E A , Liu, K D , Knowles, J R , Petsko, G A , Ringe, D (1994) *Biochemistry* 33.2830-2837
- Zhang, U , Bond, C S , Bailey, S . Cunningham, M L , Fairlamb, A H , Hunter, W N (1996) *Protein Sci* 5 52-61
- Zhang, Z , Komives, E A , Sugio, S , Blacklow, S C., Narayana, N , Xuong, N H , Stock, A M , Petsko, G A , Ringe, D (1999) *Biochemistry* 38 4389-97
- Zhou, W C , Xin, Z M , Zhang, X P , Shen, J , Qiu, Q P (1996) *Yao Hsueh Hsueh Pao* 31 823-830

Zweygarth, E , Kaminsky, R. (1991) Acta Trop. 48.223-32

Factors That Control the Reactivity of the Interface Cysteine of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*[†]

Horacio Reyes-Vivas,^{1,††} Gloria Hernández-Alcantara,[‡] Gabriel López-Velazquez,[§] Nallely Cabrera,[‡] Ruy Pérez-Montfort,[‡] Manetta Tuena de Gómez-Puyou,[‡] and Armando Gómez-Puyou*[‡]

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70243, 04510 México, D.F. México, and Instituto Nacional de Pediatría, Torre de Investigación Apartado Postal 3700C, 04530 México, D.F. México

Received November 14, 2000, Revised Manuscript Received January 2, 2001

ABSTRACT: The amino acid sequences and X-ray structures of homodimeric triosephosphate isomerase from the pathogenic parasites *Trypanosoma brucei* (TbTIM) and *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) are markedly similar. In the two TIMs, the side chain of the only interface cysteine (Cys14) of one subunit docks into loop 3 of the other subunit. This portion of the interface is also markedly similar in the two enzymes. Nonetheless, Cys14 of TcTIM is nearly 2 orders of magnitude more susceptible to the thiol reagent methylmethane thiosulfonate (MMTS) than Cys14 of TbTIM. The causes of this difference were explored by measuring the second-order rate constant of inactivation by MMTS (k_2) under various conditions. At pH 7.4, k_2 in TcTIM is 70 times higher than in TbTIM. The difference decreases to 30 when the amino acid sequence of loop 3 and adjoining residues of TbTIM are conferred to TcTIM (triple mutant). The pK_a values of the thiol group of the interface cysteine of TcTIM and the triple mutant were 0.7 pH unit lower than in TbTIM. Because this difference could account for the different sensitivity of the enzymes to thiol reagents, we determined the k_2 of inactivation at equal levels of ionization of their interface cysteines. Under these conditions, the difference in k_2 between TcTIM and TbTIM became 8-fold, whereas that of the triple mutant to TbTIM was 1.5 times. The substrate analogue phosphoglycolate did not modify the pK_a of the thiol group of the interface, albeit it diminished the rate of its derivatization by MMTS. In the presence of phosphoglycolate, under conditions in which the interface cysteines of the enzymes had equal levels of protonation, the difference in k_2 of TcTIM and TbTIM became smaller, whereas k_2 of the triple mutant was almost equal to that of TbTIM. Thus, from measurements of the reactivity of the interface cysteine in various conditions, it was possible to obtain information on the factors that control the dynamics of a portion of the dimer interface.

Triosephosphate isomerase (TIM)¹ is a glycolytic enzyme that catalyzes the interconversion between glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. The crystal structures of TIMs from a wide variety of species have been determined (1–10). Except for TIM from *Thermotoga maritima* which is a tetramer (10), all TIMs so far described are formed by two identical monomers which have a central core formed by β -strands surrounded by α -helices. The eight β -strands and α -helices are joined by loops numbered 1–8. The catalytic residues in each monomer belong to the same polypeptide chain; however, only in its dimeric form is TIM catalytically active (11–13). In this respect, it has been advanced that the association of the two monomers brings

about the proper orientation of the residues (14–18). However, there are reports that suggest that the dimer interface plays a dynamic role in catalysis (19).

A large portion of the enzyme is formed by the dimer interface. A conspicuous region of the interface is formed by loop 3. The residues of loop 3 of each of the two subunits submerge into the other subunit. Another relevant feature of loop 3 is that, in each monomer, the residues of loop 3 surround the side chain of residue 14 of the other subunit (the numbering system of TIM from *Trypanosoma brucei* will be used). Site-directed mutagenesis studies of residue 14 or loop 3 (16–18, 20) have shown that this portion of the interface is central in dimer stability. Likewise, it has been shown that chemical perturbation of Cys14 of TIMs from trypanosomatids provokes structural alterations and abolition of catalysis (9, 20–25).

The portion of the interface formed by loop 3 and residue 14 has an additional interest. TIMs from the pathogenic parasites *Trypanosoma cruzi* (23), *Trypanosoma brucei* (3), *Leishmania mexicana* (26), *Plasmodium falciparum* (7), *Giardia lamblia* (27), and *Entamoeba histolytica* (28) possess a cysteine in an equivalent position. In TIMs from many other species, position 14 is occupied by a different residue, for example, in mammalian TIM, it is a methionine

* This work was supported by CONACYT Grant No. 627551M and DGAPA-UNAM Grant No. IN206297 IIR-V. is the recipient of a fellowship from CONACYT.

† To whom correspondence should be addressed: Tel (525) 6225629 Fax (525) 6225630 E-mail apuyou@ifisicel.unam.mx

† Universidad Nacional Autónoma de México

‡ Instituto Nacional de Pediatría

§ Present address: Instituto Nacional de Pediatría, México, D.F. México

¹ Abbreviations: MMTS, methylmethane thiosulfonate; PCR, polymerase chain reaction; TIM, triosephosphate isomerase; IPTG, isopropyl β -D-thiogalactopyranoside; TbTIM and TcTIM, triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*, respectively.

nd in yeast a leucine. In addition, loop 3 of human TIM is 16 residue longer than those of TIMs from *T. brucei* (TbTIM), *T. cruzi* (TcTIM), and *L. mexicana*. Thus, this region of the interface appears to be a good target for the design of molecules that affect the association between monomers in TIM from parasites. This is of importance, since millions of people are infected by the aforementioned parasites.

The interfaces of TbTIM, TcTIM, and leishmanial TIM have one cysteine per monomer in the dimer interface, and derivatization with thiol reagents causes irreversible structural alterations and total inactivation of the three enzymes (24). The thiol reagents that inactivate TIMs from trypanosomatids exert a small effect or have no effect at all on TIMs that lack a cysteine in position 14, the latter including human TIM (5). Therefore, these observations suggest that it is indeed possible to design molecules that perturb specifically the interface of TIMs from the trypanosomatids.

In studies on the inactivating effect of thiol reagents on TIMs from parasites, it was observed that the interface cysteine of TcTIM is about 2 orders of magnitude more sensitive to thiol reagents than that of TbTIM and *L. mexicana* (23, 24). This is somewhat remarkable, since the amino acid sequences of the three TIMs have an identity of 8% and their X-ray structures are strikingly similar (9, 24). The picture becomes more intriguing if it is considered that the identity of the residues that form the dimer interface is 2% and that the buried surface areas of the cysteines of TbTIM and TcTIM are almost identical (see Table 1 in ref. 9). The packing of the sulfur of Cys14 by the residues of loop 3 in TbTIM and TcTIM is also markedly similar.

Because of the importance of this portion of the interface in the design of molecules that induce destabilization of TIMs from parasites, we carried out a systematic analysis to ascertain why very similar enzymes exhibit such marked differences in regions that appear to be nearly identical. This involved a stepwise approach in which, initially, the amino acid sequence of TbTIM was conferred to TcTIM. This was followed by studies in which the reactivities of the thiol groups of the interface cysteines were compared at the same protonation state. The results illustrate that the local environment and events that are distant to the interface cysteine affect its reactivity with a thiol reagent. The data also show that as each of these factors is equalized, the difference in reactivity of the interface cysteine of TbTIM and TcTIM becomes progressively smaller.

MATERIAL AND METHODS

Enzymes Recombinant TIM from *T. cruzi*, *L. mexicana*, *T. brucei*, and the Cys14Ser mutant of TbTIM were purified as described elsewhere (24, 25, 29). The mutant enzymes of TcTIM described below were purified following the methodology described for wild-type TcTIM. All enzymes were stored as suspensions at 4 °C in 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM sodium azide, pH 8.0 and 70% saturation ammonium sulfate. For the experiments, the enzymes were dialyzed against 100 mM triethanolamine and 10 mM EDTA, pH 7.4.

The Glu18Gln, Gln81Pro, and Thr69Ala/Arg70Lys vs. Gln81Pro TcTIMs were prepared by polymerase chain

reaction (PCR) using the Expand High Fidelity PCR System (Boehringer). The mutagenic oligonucleotides were 5'-CAACGGCTCCAGAGTTTGCT-3' (Glu18Gln Fw), 5'-AGCAAACCTCTGGGAGCCGTTG-3' (Glu18Gln Rv), 5'-CTCTCTGCCGATCCTCAAGG-3' (Gln81Pro Fw), 5'-CCTTGAGGATCGGCAGAGAG-3' (Gln81Pro Rv), 5'-GAACGGCATCGCSAARTCGGCGCT-3' (Thr69Ala/Arg70Lys Fw), and 5'-AGCCCCGAYTTTSGCGATCGCGTTC-3' (Thr69Ala/Arg70Lys Rv) (where R = G/A, S = G/C, Y = C/T). The PCR products were ligated to the pCR 2.1 vector (Invitrogen) and sequenced. Once the genes with the appropriate mutations were identified, they were sequenced completely, subcloned into pET3a, and introduced by transformation into BL21(DE3)pLys cells (Novagen). For expression of the mutant enzymes, cells were grown as described by Borchert et al. and induced with IPTG (29).

Assay of Activity Activity in the direction of glyceraldehyde 3-phosphate to dihydroxyacetone phosphate was measured at 25 °C as described elsewhere (21). The 1-mL reaction mixture at pH 7.4 contained 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, 1 mM substrate (except when the catalytic constants were determined), 0.9 U α -glycerophosphate dehydrogenase, 0.2 mM NADH, and 5 ng of TIM. Activity was calculated from the decrease in absorbance at 340 nm.

Effect of MMTS The standard conditions for measuring the rate of chemical modification by MMTS were as follows. The enzymes were incubated at 25 °C at a concentration of 5 μ g/mL of 100 mM triethanolamine and 10 mM EDTA that had the indicated pH and MMTS concentrations. Aliquots were withdrawn periodically and diluted with the same buffer that had pH 7.4 in order to measure the residual activity. The pseudo-first-order k_1 was determined from plots of percent of activity versus time. The second-order kinetic constant k_2 was then calculated from plots of the first-order rate constant versus MMTS concentration.

Determination of the pK_a of the Interface Cysteines To determine the pK_a of the cysteine, the enzymes were incubated at a concentration of 5 μ g/mL in 100 mM triethanolamine and 10 mM EDTA adjusted to the desired pH. MMTS at the concentrations indicated under Results was also included. The ionic strength of mixtures was maintained constant by inclusion of the appropriate amounts of NaCl. At different times aliquots were withdrawn, diluted with buffer pH 7.4 and activity measured as described above. The apparent pK_a of the interface of the various TIMs was determined from plots of \ln of percent remaining activity versus pH. Data were fitted to a model derived from the Henderson-Hasselbalch equation

$$\ln(\% \text{ activity}) = \frac{Y_h + Y_i \times 10^{pK_a - \text{pH}}}{1 + 10^{pK_a - \text{pH}}} \quad (1)$$

where Y_h and Y_i represent the initial and final activities, respectively.

In the experiments the incubation of MMTS and the indicated TIMs was less than 1 min. This was because at relatively alkaline pH, MMTS undergoes spontaneous decomposition. In fact, at pH 9.7, the highest pH assayed, the decomposition of MMTS is about 60% in 1 min; its rate constant of decomposition is 4.1 M⁻¹ s⁻¹. Thus, at this

Table 1 Kinetic Constants of Wild-Type and Mutant TcTIMs^a

TJM	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)
TcTIM	0.48 ± 0.01	2.6 × 10 ⁵	5.4 × 10 ⁵
E18Q TcTIM	0.62 ± 0.06	1.8 × 10 ⁵	2.9 × 10 ⁵
Q81P TcTIM	0.72 ± 0.05	2.9 × 10 ⁵	4 × 10 ⁵
triple mutant of TcTIM	0.56 ± 0.05	2.2 × 10 ⁵	3.9 × 10 ⁵

^a Activity was determined with various concentrations of glyceraldehyde 3-phosphate (0.05–4 mM) as described under Materials and Methods. K_m (±SEM) and k_{cat} were calculated from nonlinear regression plots.

particular pH, the rate constant of inactivation of TbTIM (see data in Figure 2) was calculated taking into account the rate constant of decomposition of MMTS as described by Gomi and Fujioka (38). In the rest of the experimental points, the correction was not made, since the MMTS breakdown was less than 6% in 1 min. In addition, it is noted that at pH 10, the enzymes undergo rapid inactivation. This precluded the determination of the effect of MMTS at pH 10 or higher. At pH 9.7 the enzymes were stable for at least 10 min.

Protein concentration of the enzymes was determined from their absorbance at 280 nm using the molecular extinction coefficients (ϵ_{280}) of 34 950 M⁻¹ cm⁻¹ for TbTIM and Cys14Ser TbTIM (25), 33 460 M⁻¹ cm⁻¹ for TcTIM and mutant TcTIM, and 36 440 M⁻¹ cm⁻¹ for TIM from *L. mexicana* (23).

RESULTS

Effect of MMTS on the Glu18Gln Mutant of TcTIM
Although the structures of TbTIM and TcTIM are markedly similar, the enzymes differ in the portion of the interface formed by loop 1 of one monomer and helix 3 of the other subunit (9). At the end of loop 1, TbTIM has glutamine in position 18. Its amide group is H-bonded to the peptide oxygen between Asp85 and Phe86 of helix 3 of the other subunit. At variance with TbTIM, TcTIM has glutamic acid in position 18 and its side chain points toward the solvent. Thus, in the respective three-dimensional structures this portion of the interface is more open in TcTIM than in TbTIM. To test if this difference is related to the accessibility of thiol reagents to Cys14, we constructed a mutant of TcTIM in which its glutamic acid was exchanged for a glutamine. The enzyme was purified and characterized. The K_m of the mutant enzyme for glyceraldehyde 3-phosphate was similar to that of wild-type TcTIM, its k_{cat} was about 30% lower (Table 1). The second-order rate constant of the inhibition (k_2) induced by MMTS was determined from plots of the pseudo-first-order rate constants (k_1) at various concentrations of MMTS and compared to those in TcTIM and TbTIM (Table 2). The mutant enzyme exhibited a slightly higher sensitivity to MMTS. Hence, it would appear that the existence of a glutamic acid or glutamine in position 18 does not account for the marked differences in sensitivity to thiol reagents between TbTIM and TcTIM.

Properties of the Gln81Pro Mutant of TcTIM and a Mutant of TbTIM with Its Loop 3 Identical to That of TbTIM
TIM from *L. mexicana* also has a cysteine in position 14 and its side chain is surrounded by the residues of loop 3 of the other subunit (30). The derivatization of this cysteine by MMTS or other thiol reagents causes its inactivation (24)

Table 2 Second-Order Rate Constants for the Reaction of MMTS with the Interface Cysteine of Various TIMs at pH 7.4^a

TJM	k_2 (M ⁻¹ s ⁻¹)
TbTIM	0.6 ± 0.05 ^b
TcTIM	40 ± 2 ^b
E18Q TcTIM	90 ± 3.6
Q81P	32 ± 2
TcTIM triple mutant	18 ± 3
<i>L. mexicana</i>	0.16 ± 0.005

^a The enzymes were incubated in the standard conditions at pH 7.4 with MMTS, and at various times aliquots were withdrawn, diluted and their activity measured. From the data, pseudo-first-order rate constants were determined from plots of percent activity versus time fitted by nonlinear regression analysis. The second-order rate constants (k_2 (±SEM)) for the reaction were calculated as described under Materials and Methods. The concentrations of MMTS used with the various TIMs were for E18Q TcTIM, 20, 30, 40, and 50 μM MMTS, for Q81P TcTIM, 30, 40, and 50 μM MMTS, for the triple mutant of TcTIM, 5, 10, 15, and 20 μM MMTS, for TIM from *L. mexicana*, 0.4, 0.8, 1.2, and 1.6 mM MMTS. ^b Data from Pérez-Montfort et al. (25)

At pH 7.4, the k_2 of inactivation by MMTS of leishmanial TIM was about 3 times lower than in TbTIM and about 250 times lower than in TcTIM (Table 2). To understand the causes of the significantly higher sensitivity of TcTIM when compared to TbTIM and leishmanial TIM, their amino acid sequences were examined, particularly in loop 3 and in the neighboring residues (Figure 1). At the end of loop 3, TbTIM and leishmanial TIM have proline in position 81, the corresponding amino acid in TcTIM is glutamine. Another relevant feature of the sequences is that the amino acid compositions of loop 3 of TbTIM and leishmanial TIM are identical and differ from TcTIM in residues 69 and 70. The former two TIMs have alanine and lysine in these positions, whereas in TcTIM the residues are threonine and arginine, respectively.

To determine if these differences account for the high susceptibility of TcTIM to thiol reagents, we prepared two mutants of TcTIM. In one of them, Gln81 was exchanged for proline. This Gln81Pro TcTIM was used to construct another mutant in which its Thr69 and Arg70 were replaced by the residues that exist in TbTIM and leishmanial TIM. This Thr69Ala/Arg70Lys/Gln81Pro TcTIM will be referred throughout as the triple mutant. The enzymes were purified to homogeneity and characterized. The kinetics of these two mutants did not differ significantly from those of wild-type TcTIM (Table 1). However, in Gln81Pro TcTIM, the second-order rate constant of inhibition by MMTS was about 30% lower than in the wild-type TcTIM (Table 2). In the triple mutant, the second-order rate constant of inactivation by MMTS was even lower (Table 2). These findings indicate that the amino acid sequences of loop 3 and adjacent residues contribute partially to the susceptibility of the interface cysteine to thiol reagents. Nonetheless, it is somewhat remarkable that the triple mutant, which has loop 3 identical to that of TbTIM and leishmanial TIM, has a sensitivity to MMTS that is 31 and 114 times higher than that of TbTIM and leishmanial TIM, respectively.

Ionization of the Interface Cysteine of TbTIM and TcTIM
The X-ray structures of TcTIM and TbTIM show that their interface cysteines are not exposed to the solvent (9). This is in accord with data that indicate that the derivatization of the cysteine is relatively slow (20, 25). Since the transfer of ionized groups from the solvent to the interior of proteins is

		*				60
<i>T. brucei</i>	-MSKPQPIAA	ANWKCNGSQQ	SLSELIDLFN	STSNHVDVQC	VVASTFVHLA	MTKERLSHPK
<i>T. cruzi</i>	MASKPQPIAA	ANWKCNGSES	LLVPLIETLN	AATFDHVDQC	VVAPTFLHIP	MTKARLTNPK
<i>L. mexicana</i>	MSAKPQPIAA	ANWKCNGTTA	SIEKLVQVFN	EHTISHDVQC	VVAPTFFVHP	LVQAKLRNPK
		* *		*		120
<i>T. brucei</i>	FVIAAQNALA	KSGAFTGEVS	LPILKDFGVN	WIVLGHSEER	AYYGETNEIV	ADKVAVAAS
<i>T. cruzi</i>	FQIAAQNAIT	RSGAFTGEVS	LQILKDYGIS	WVVLGHSEER	LYYGETNEIV	AEKVAQACAA
<i>L. mexicana</i>	YVISAENALA	KSGAFTGEVS	MPILKDIGHV	WVILGHSEER	TYYGETDEIV	AQKVSEACKQ
						180
<i>T. brucei</i>	GFMVIACIGE	TLQERESGR	AVVVLTIQIAA	IAKLKKKADW	AKVVIAYEPV	WAIGTGKQVAT
<i>T. cruzi</i>	GFHVIVCVGE	TNEEREAGRT	AAVVLTLQIAA	VAQKLSKEAW	SRVVIAYEPV	WAIGTGKQVAT
<i>L. mexicana</i>	GFMVIACIGE	TLQQREANQT	AKVVLSTQSA	IAAKLTKDAW	NQVVLAYEPV	WAIGTGKQVAT
						240
<i>T. cruzi</i>	PQQAQEVHEL	LRRWVRSLKG	TDIAAQLRIL	YGGSVTAKNA	RTLYQMRDIN	GFLVGGASLK
<i>T. brucei</i>	PQQAQEAHAL	IRSWVSSKIG	ADVRGELRIL	YGGSVNGRNA	RTLYQQRDVN	GFLVGGASLK
<i>L. mexicana</i>	PEQAQEVHLL	LRKWVSENI	TDVAAKLRIL	YGGSVNAANA	ATLYAKPDIN	GFLVGGASLK
		250				
<i>T. cruzi</i>	PEFVEIIEAT	K				
<i>T. brucei</i>	PEFVDIIKAT	Q				
<i>L. mexicana</i>	PEFRDIIDAT	R				

FIGURE 1. Sequence alignment of TbTIM, TcTIM, and *L. mexicana* TIM. The residues that form loop 3 are in bold. The residues of TcTIM that were substituted are marked with an asterisk (*).

energetically unfavorable, buried acidic groups exhibit a relatively high pK_a (31, 32). It is also well-documented that sulphydryl agents react almost exclusively with the thiolate form of cysteine (33-37). To explore if the different sensitivity of TbTIM and TcTIM to sulphydryl reagents is related to differences in the protonation level of the interface cysteines, the apparent pK_a of their thiol groups was determined. TbTIM and TcTIM were incubated with MMTS at various pH, and aliquots were withdrawn to measure the remaining activity under standard conditions at pH 7.4. The results showed that as the pH of the media was increased, the inactivating effect of MMTS increased (Figure 2). From plots of the remaining activity at various pH, the pK_a of the interface cysteines was calculated (Table 3). Regarding the result at pH 9.7, it is noted that at this pH, there is an important spontaneous decay of MMTS with a rate constant of 44 M⁻¹s⁻¹. Therefore, the rate of inactivation of TbTIM was calculated taking into account the rate of decomposition of MMTS (see ref 38 and Materials and Methods). The correction was not made for the rest of the points in Figure 2, because the loss of MMTS was less than 6% in the course of the experiments.

The experiments on the effect of MMTS at various pH included another control. In addition to the interface cysteine, TbTIM has cysteines at positions 40 and 126, and TcTIM has three at positions 40, 117, and 126. Although at pH 7.4, inactivation of the two enzymes by MMTS results from the initial derivatization of their interface cysteine (25) there was the possibility that at relatively high pH, inactivation by MMTS was due to derivatization of cysteines, other than Cys14. Therefore, we determined the effect of MMTS on

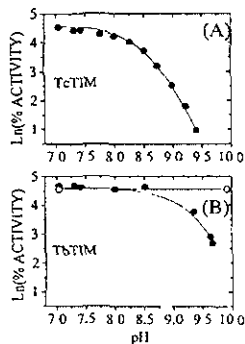


FIGURE 2. pH dependence of the effect of MMTS on the activity of (A) TcTIM and (B) wild-type TbTIM (●) and Cys14Ser TbTIM (○). The enzymes were incubated at a concentration of 5 μg/mL in a mixture of 100 mM triethanolamine and 10 mM EDTA at the indicated pH. The concentration of MMTS used was 10 μM (A) and 80 μM (B). After 1 min of incubation, an aliquot was withdrawn and diluted in order to measure activity, the latter was measured at a concentration of 5 ng/ml, (see Materials and Methods). The results are expressed as Ln(% activity) in which 100% was 3000, 2900, and 3000 μmol min⁻¹ mg⁻¹ for TcTIM, TbTIM, and Cys14Ser mutant TbTIM, respectively. The lines are fitted according to eq 1.

the activity of a mutant of TbTIM in which its interface cysteine was replaced by serine. At all pH, the latter mutant was insensitive to MMTS (Figure 2B). Thus, inactivation by MMTS of trypanosomal TIMs is due to alkylation of their interface cysteine.

Table 3 Apparent pK_a of the Interface Cysteine of Wild-Type TcTIM and Its Triple Mutant and TbTIM in the Absence (-) or Presence (+) of Phosphoglycolate^a

TIM	- phosphoglycolate	+ phosphoglycolate
TcTIM	9.28 ± 0.07	9.33 ± 0.02
TcTIM triple mutant	9.33 ± 0.04	9.44 ± 0.03
TbTIM	10.08 ± 0.03	10.1 ± 0.04

^a The pK_a were calculated as described under Materials and Methods. For calculation of the pK_a of the interface cysteine of TcTIM and TbTIM in the absence of phosphoglycolate the data of Figure 2 were used. The same protocol with 10 μ M MMTS was used for determination of the pK_a of the interface cysteine in the triple mutant of TcTIM. Where indicated, the pK_a was calculated with 5 mM phosphoglycolate and MMTS at a concentration of 5, 10, and 30 μ M for TcTIM, the triple mutant, and TbTIM, respectively.

Table 4 Second-Order Rate Constants for the Reaction of the Interface Cysteine with MMTS When 33% of the Interface Cysteines Were in the Thiolate Form Effect of Phosphoglycolate^a

TIM	k_2 ($M^{-1} s^{-1}$)	
	- phosphoglycolate	+ phosphoglycolate
TcTIM	3380 ± 212	1695 ± 18
TcTIM triple mutant	654 ± 30	218 ± 23
TbTIM	420 ± 16	266 ± 2

^a The experimental conditions and calculation of the rate constant for inactivation (\pm SEM) were as in Table 2, except that the pH of the incubation mixtures was 9.0 for TcTIM and its triple mutant and 9.7 for TbTIM. For the experiments the following concentrations of MMTS were used: TcTIM without phosphoglycolate, 4, 6, 8, and 10 μ M; TcTIM with phosphoglycolate, 8, 12, 16, and 20 μ M; triple mutant without phosphoglycolate, 6, 8, 10, and 12 μ M; triple mutant with phosphoglycolate, 8, 12, 16, and 20 μ M; TbTIM without phosphoglycolate, 25, 50, 75, and 100 μ M; TbTIM with phosphoglycolate, 37, 75, 112, and 150 μ M.

The pK_a of the thiol group of Cys14 of TbTIM and TcTIM was calculated (Table 3) and was higher in both cases than the reported value for cysteine in aqueous solutions, which is 8.5–8.8. The pK_a of the interface cysteine of TcTIM was about 0.7 unit lower than that of TbTIM.

The pK_a of cysteines may be affected by the properties of neighboring residues, in particular lysines and arginines (39). As there are differences in the amino acid sequence of loop 3 of TcTIM and TbTIM, we also determined the pK_a of the interface cysteine of the triple mutant. Its pK_a did not differ significantly from that of the wild-type TcTIM (Table 3).

Inactivation Rate Constant by MMTS of TbTIM, TcTIM, and the Triple Mutant at the Same Ionization Level of the Thiol Groups of Their Interface Cysteine. The lower pK_a of the interface cysteine of TcTIM in comparison to that of TbTIM could account for its higher sensitivity to thiol reagents in media with a pH lower than the pK_a of the cysteine. For example, at pH 7.4, k_2 is about 70 times larger in TcTIM than in TbTIM (Table 2). If the latter difference were solely due to the differences in the pK_a of their cysteines, it would be expected that the three enzymes would exhibit the same inactivation rate constant at equal ratios of thiol to thiolate groups. Accordingly, the rate constant of inactivation by MMTS in the three enzymes was determined in media that had a pH in which 33% of the interface cysteines were in the thiolate form. Under these conditions, the k_2 for MMTS in TcTIM was still significantly higher than in TbTIM (Table 4). In the triple mutant, however, the k_2 of the reaction was only slightly higher than in TbTIM.

Effect of Phosphoglycolate on the Action of MMTS on TcTIM and TbTIM. The latter results indicate that differences in the ionization level of the interface cysteine and the amino acid sequence of loop 3 are central in the sensitivity of trypanosomal TIMs to thiol reagents. However, it has been shown (25) that the occupancy of the catalytic site by the substrate analogue phosphoglycolate affects the reactivity of the interface cysteine with thiol reagents. Therefore, we examined if this effect of phosphoglycolate is accompanied by changes in the pK_a of the interface cysteine. The results showed that in the three enzymes, phosphoglycolate did not modify the pK_a of interface cysteines (Table 3). We also determined k_2 in the presence of phosphoglycolate under conditions in which the interface cysteines of the three enzymes had the same ionization level. Phosphoglycolate diminished the k_2 of the inactivation reaction by MMTS in the three enzymes (Table 4). However, in wild-type TcTIM and its triple mutant, the decrease of k_2 induced by phosphoglycolate was about 2 times, whereas in TbTIM, the decrease was rather modest. In consequence, the difference in rate constants of inactivation between TcTIM and its triple mutant with TbTIM became smaller. In fact, k_2 in the triple mutant of TcTIM was slightly lower than in TbTIM.

DISCUSSION

TIMs from *T. cruzi* and *T. brucei* are markedly similar in amino acid sequence and three-dimensional structure. Nonetheless, TcTIM is many times more sensitive to agents that derivatize the interface cysteine (9, 22–25). The purpose of this work was to determine the cause(s) of these differences. Because in the trypanosomal TIM the side chain of the interface cysteine is closely packed by the amino acids of loop 3 of the other monomer, the studies could also provide information on the factors that control the interactions between subunits in that region of the dimer interface. In this respect it is noted that the K_{diss} of TIM monomers has been reported to range between 10^{-13} and 10^{-14} M (2, 16). In our experiments on the effect of MMTS on TIM, the concentration of the enzyme was 0.1 μ M, thus, the effect of the thiol reagent was determined under conditions in which TIM was in its dimeric form.

Figure 3 summarizes part of the results of this work. It shows the ratios of the second-order rate constant of inactivation by MMTS (k_2) of TcTIM and that of the triple mutant to the k_2 in TbTIM. The difference in the ratios in the various experimental conditions can be used to estimate the extent to which each of the explored factors contributes to the reactivity of the cysteine. At pH 7.4, the ratio in the sensitivity of TcTIM to TbTIM to MMTS is around 70. At this pH, the ratio decreases to about 30 when the residues of loop 3 of TcTIM are made identical to those of TbTIM. Because the pK_a of the cysteines of the triple mutant and the wild-type TcTIM are almost the same (Table 3), the decrease from 70 to 30 reflects mainly the contribution of the residues in the vicinity of the sulfur of the interface cysteine.

When the sensitivities of the enzymes to MMTS are compared at equal levels of protonation of their interface cysteine, the ratios of k_2 of wild-type TcTIM to TbTIM drops from 70 to 8 and that of the triple mutant to TbTIM from 30 to 1.5. The fact that at equal levels of ionization of the

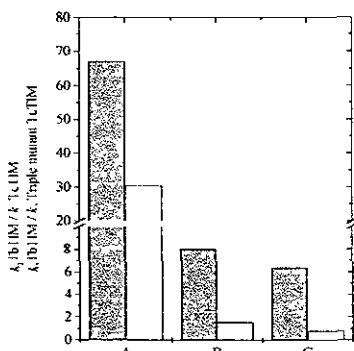


FIGURE 3: Ratio of the second-order rate constant (k_2) of inactivation by MMTS between TcTIM and TtTIM (closed bars) and the triple mutant of TcTIM: TtTIM (open bars). The ratios were calculated from the data in Tables 2 and 4: (A) ratios at pH 7.4; (B) ratios in conditions in which 33% of the interface cysteine is in thiolate form; (C) the latter conditions in the presence of 5 mM phosphoglycolate.

ol groups the ratios are lower than at pH 7.4 indicates that at the latter pH, the hindrances imposed by the ionization level of the cysteine are higher in TtTIM than in TcTIM and its triple mutant.

It has been shown that the occupancy of the catalytic site by phosphoglycolate affects the reactivity of the interface cysteine to MMTS (25). With respect to this action of phosphoglycolate, it is mechanistically important that although phosphoglycolate does not modify the pK_a of the interface cysteine (Table 3), it nonetheless diminishes the k_2 of inactivation in the three enzymes. It is also relevant that at equal levels of ionization of the interface cysteine, phosphoglycolate diminished the difference of k_2 between TcTIM and TtTIM and that in these conditions, k_2 in the triple mutant became lower than that of TtTIM, albeit slightly. The changes in the k_2 ratios induced by phosphoglycolate also illustrate that in very similar enzymes, the occupancy of the catalytic site does not affect to the same extent the reactivity of the cysteine. In summary, the overall data show that the reactivity of the interface cysteine is controlled by several factors: i.e., the structure of loop 3, the pK_a of the cysteine, and the occupancy of the catalytic site. In addition, the data show that the difference between the two trypanosomal TIMs is a consequence of differences in local factors and events or interactions that are far from the interface residue.

From a broader point of view, there are two additional comments. This work illustrates that by probing a property of a particular amino acid residue under different conditions, it is possible to ascertain the factors that govern the behavior of the residue. The other point concerns the properties of regions of enzymes with identical amino acid sequences. In his classical work, Anfinsen (40) showed that the structure of proteins is determined by their amino acid sequence. Nonetheless, it has been observed that a protein may require a drastically different structure (41) depending on the nature of the solvent. Likewise, in an analysis of 5420 proteins, Sudarsanan (42) found that the same amino acid sequence could exist in several different structural conformations. In this context, the characteristic of the triple mutant of TcTIM

and TtTIM illustrate an aspect of the relationship between structure and function that, as far as we know, has not been described before. We found that two enzymes with identical amino acid compositions in the region that surrounds the interface cysteine exhibit significant differences in the pK_a of the cysteine. This suggests that in proteins, the same amino acid sequence in homologous enzymes may exhibit distinct characteristics that, apparently, are the consequence of distant events or interactions.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. P. A. M. Michels (Research Unit for Tropical Diseases, ICP-TROP, Brussels, Belgium) for the TtTIM gene and Dr. Rosario Muñoz-Clares and Dr. Mario Calcagno-Montañs for helpful discussions.

REFERENCES

- 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.
- Lohs, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C., and Petsko, G. A. (1990) *Biochemistry* 29, 6609–6618.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., and Hol, W. G. J. (1991) *J. Mol. Biol.* 220, 995–1015.
- Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohmout, A. C., and Martial, J. A. (1993) *Acta Crystallogr.* D49, 403–417.
- Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A., and Hol, W. G. J. (1994) *Protein Sci.* 3, 810–821.
- Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-DeLuc, F., Mainfroid, V., Turely, S., Vellieux, F. M. D., Martial, J. A., and Hol, W. G. J. (1995) *Protein Sci.* 4, 2594–2604.
- Velankar, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Surma, S., Balaran, H., Balaran, P., and Murthy, M. R. N. (1997) *Structure* 5, 751–761.
- Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-DeLuc, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K., and Maes, D. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 2199–2206.
- Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Pérez-Montfort, R. (1998) *J. Mol. Biol.* 283, 193–203.
- Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Dao Thi, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R., and Wierenga, R. (1999) *Proteins* 37, 441–453.
- Waley, S. G. (1973) *Biochem. J.* 135, 165–172.
- Zabari, S., Rudolph, F., and Jaenicke, R. (1980) *Z. Naturforsch.* 35, 999–1004.
- Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Gracy, R. W. (1992) *Eur. J. Biochem.* 208, 389–395.
- Wierenga, R. K., Borchert, T. V., and Noble, M. E. M. (1992) *FEBS Lett.* 307, 34–39.
- Borchert, T. V., Abagyan, R., Radha Krishna, K. V., Zeelen, J. P., and Wierenga, R. K. (1993) *Structure* 1, 205–213.
- Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Freze, J. M., Mande, S. C., Hol, W. G. J., Martial, J. A., and Goraj, K. (1996) *J. Mol. Biol.* 257, 441–456.
- Schliebs, W., Thanki, N., Britja, R., and Wierenga, R. K. (1996) *Protein Sci.* 5, 229–239.
- Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1997) *Biochemistry* 36, 9655–9662.
- Harris, I. K., Cole, R. N., Camer, F. I., and Mildvan, A. S. (1998) *Biochemistry* 37, 16828–16838.
- Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R. A., Rojas Domínguez, A., and Pérez-Montfort, R. (1998) *Chem. Biol.* 2, 847–855.
- Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Rojas Domínguez, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1996) *Law. J. Biochem.* 21, 114–120.

22. Maldonado, E., Moreno, A., Pannierselvaru, K., Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Soriano-García, M., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1997) *Protein Pept Lett* 4, 139-144
23. Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramírez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Pérez-Montfort, R. (1997) *Eur J Biochem* 244, 700-705.
24. Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R., and Gómez-Puyou, A. (1998) *Eur J Biochem* 253, 684-691
25. Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Gao, X. G., Maldonado, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1999) *Biochemistry* 38, 4114-4120.
26. Kohl, I., Callens, M., Wierenga, R. K., Opperdoes, F. R., and Michels, P. A. M. (1994) *Eur. J Biochem* 220, 331-338.
27. Mowatt, M. R., Weinbach, E. C., Howard, T. C., and Nash, T. E. (1994) *Exp Parasitol* 78, 85-92
28. Landa, A., Rojo-Domínguez, Jiménez, L., Fernández, V., and Velasco, F. (1997) *Eur J Biochem* 247, 348-355.
29. Borchdt, 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
30. Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauch, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeur, A. M., and Wierenga, R. K. (1999) *Protein Eng* 3, 243-50
31. Yang, A. S., and Hong, B. (1993) *J. Mol. Biol.* 231, 459-474.
32. Kortemme, T., and Creighton T. E. (1995) *J. Mol. Biol.* 253, 799-812
33. Jocelyn, P. C. (1972) *Biochemistry of the SH Group*, Academic Press, New York
34. Roberts, D. D., Lewis, S. D., Ballou, D. P., Olson, S. T., and Shafer, J. A. (1986) *Biochemistry* 25, 5595-5601
35. Bernard, R. A. (1990) *Biochemistry* 29, 3684-3690
36. Talfournier, F., Colloc'h, N., Mornon, J. P., and Branlant, G. (1998) *Eur J Biochem* 252, 447-457
37. Bulaj, G., Kortemme, T., and Goldenberg, D. P. (1998) *Biochemistry* 37, 8965-8972
38. Gomi, T., and Fujioka, M. (1983) *Biochemistry* 22, 137-143.
39. Fersht, A. (1998) *Structure and Mechanism in Protein Science*, W. H. Freeman and Co., New York.
40. Anfinsen, C. B. (1973) *Science* 181, 223-230
41. Damaschun, G., Damaschun, H., Gast, K., and Zirwer, D. (1999) *J. Mol. Biol.* 291, 715-725
42. Sudarsanan, S. (1998) *Proteins Struct Funct Genet* 30, 228-231

LIMITED PROTEOLYSIS OF TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM

Trypanosoma brucei AND *Trypanosoma cruzi*

Abstract

We studied the susceptibility to subtilisin of homodimeric triosephosphate isomerase from the pathogenic parasites *Trypanosoma brucei* (TbTIM) and *Trypanosoma cruzi* (TcTIM). The enzymes are markedly similar in amino sequence and three-dimensional structure. In 36 hours of incubation at a molar ratio of 4 TIM per subtilisin, TcTIM underwent extensive hydrolysis, complete loss of activity and large alterations of its tertiary and quaternary structures. In contrast in TbTIM only about 50 % of the monomers were cleaved between Gln181 and Gln182, and Thr139 and Ala140. Cleaved TbTIM had the mass of the intact dimer. With glyceraldehyde 3-phosphate, it exhibited a k_{cat} that was about 50 % of that of native TbTIM with no significant change in K_m . Compared with the native enzyme, the peak of intrinsic fluorescence emission of TbTIM was red shifted by 5 nm. In nicked TbTIM the association between subunits was not affected. Since the starting preparation was homogeneous, the results indicate that cleaved TbTIM is formed by an intact catalytically competent monomer attached to an inactive monomer, that had undergone cleavage in two of its peptide bonds. The high sensitivity of TcTIM to subtilisin is probably due to its high intrinsic flexibility. The data with TbTIM suggest that there are structural differences in the two monomers, or that alterations of one subunit change the characteristics of the other subunit. In comparison to the reported action of subtilisin on TIMs from other species, it would appear that the trypanosomal enzymes have unique characteristics.

Introduction

Anfinsen showed in 1973 that the structure of a native protein depends on its amino-acid sequence. Now it is also clear that the structure of the protein is stabilized by numerous and precise non-covalent interactions between its constituent amino acids, oligomeric proteins are also stabilized by the formation of non-covalent bonds between interface residues. In view of the importance of non-covalent interactions in protein structure, several laboratories have addressed the question of how the splitting of a limited number of peptide bonds affects the overall structure of proteins. So far, it has been documented that in several proteins the cleavage of a few peptide bonds does not induce large structural modifications and loss of function (Hofsteenge et al., 1988, Siddiqui et al., 1993, Pollegioni et al., 1995; Gupta et al., 1995, Juul et al., 1995; Huang et al., 1997). This suggests that intrinsic non-covalent interactions resist, at least to a large extent, the splitting of some peptide bonds. Nonetheless, it can be asked if this is the general rule, or if this only applies to proteins that have particular, but still not clearly defined intrinsic properties that stabilize their tertiary and quaternary structures. In this context, it is noteworthy that Luque and Freire (2000) have recently described that the Gibbs free energy of protein stabilization is not uniformly distributed throughout its overall structure, instead, there are regions of high and low stability constants. Thus, the stability or lack of stability of nicked enzymes can be a reflection of the forces that maintain their three-dimensional structure.

Here, we examined the susceptibility to a proteolytic enzyme (subtilisin) of two homologous homodimeric enzymes from organisms that are close in the evolutionary scale. The purpose was to assess if the changes that have taken place in their amino acid

sequence affect their stability after limited proteolysis, but have not affected their catalytic properties and stability to an important extent. The enzymes were triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) and *Trypanosoma brucei* (TbTIM). These parasites are the causative agents of Chagas disease and sleeping sickness that affect millions of people in the America and Africa, respectively. The identity of their amino acid sequence is 68 %, The crystal structure of the two enzymes has also been described and the RMS of their α C traces is 0.96 Å.

The two trypanosomal TIMs, as well as many other TIMs, are homodimeric enzymes that catalyze the interconversion between glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate through well characterized mechanisms (Albery and Knowles 1976, Alber, et al., 1981, Nickbarg and Knowles 1988, Knowles 1991). They belong to the family of the α - β barrels proteins. The crystal structure of TIMs from several species has been determined at good resolution levels (Delboni et al., 1995, Noble et al., 1993, Wierenga et al., 1991, Velankar et al., 1997, Lolis et al., 1990, Banner et al., 1975, Mandé et al., 1994, Alvarez et al., 1998; Maldonado et al., 1998). In all TIMs, the 8 β -strands are surrounded by 8 α -helices, joined by loops. An additional characteristic of TIM is that, only in its dimeric state, is the enzyme catalytically active. Regarding this work, it is important to note that the effect of limited proteolysis by subtilisin on TIMs from rabbit (Vogel and Chmielewski 1994, Sun et al., 1992), yeast (Sun et al., 1993), and *Plasmodium falciparum* (Ray et al., 1999) has been previously described. Thus, it was instructive to compare the impact of limited proteolysis on the trypanosomal TIMs with that on TIMs from other species. This revealed that, although all the enzymes have the same basic structure, the trypanosomal TIMs exhibit some

unique features. Moreover, the data with the two trypanosomal TIMs showed that they differ markedly in their sensitivity to subtilisin.

Material and Methods

Enzymes. Recombinant TIMs from *T. brucei* and *T. cruzi* were expressed and purified as described elsewhere (Borchert et al., 1993; Garza-Ramos et al., 1998). The enzymes were stored at 4°C as suspensions in 70% saturation ammonium sulfate that had 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and 1 mM sodium azide, pH 8.0. For the experiments, the enzymes were dialyzed in 100 mM triethanolamine and 10 mM EDTA, pH 7.4.

Assay of Activity. Activity in the direction of glyceraldehyde 3-phosphate to dihydroxyacetone phosphate was measured at 25°C as described elsewhere (Garza-Ramos et al., 1996). The reaction mixture at pH 7.4 (1 mL) contained 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, 1 mM substrate (except when the catalytic constants were determined), 0.9 U α -glycerophosphate dehydrogenase, 0.2 mM NADH, and 5 ng of TIM. Activity was calculated from the decrease in absorbance at 340 nm.

Proteolytic Digestion. The trypanosomal TIMs at a concentration of 1 mg/mL were incubated with Carlsberg subtilisin (Sigma) at the indicated molar ratios in 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, pH 7.4 at 30°C. Similar data were obtained in the absence of 10 mM EDTA. In all experiments, proteolysis of TcTIM was arrested by the addition of PMSF (2-3 mM final concentration). In the controls, native TIMs were supplemented with PMSF; PMSF did not have any effect on native TIMs.

Electrophoresis. The enzymes were analyzed in SDS PAGE that had 16% acrylamide according to Schagger and von Jagow (1987). The gels were stained with Coomassie

brilliant blue G and the intensity of the bands was evaluated densitometrically. The enzymes were also analyzed in non-denaturing polyacrylamide slab gel electrophoresis (in 83 X 74 X 1.5 mm gels with 10 % acrylamide) according to McLellan (1982) using 16 mM imidazole and 40 mM HEPES pH 7. Due to the high pI of TbTIM, the cathode was at the bottom of the gel. Gels were run for 165 min at 4°C and stained with Coomassie brilliant blue G.

NH₂-terminal analysis of electroblotted proteins. Fragments of digested TIMs were electroblotted from SDS-PAGE (16 %) onto polyvinylidene difluorobenzene membranes (Problott). Transfer was performed according to Yuen et al (1988) in 10 mM 3-(cyclohexylamino)-1-propane-sulfonic acid, pH 11, 10 % methanol at 5 mA/cm² for 3 h at 4°C. The transferred proteins were stained with 0.1 % Coomassie brilliant blue G in 50 % methanol. The N-terminal sequence was determined by automated Edman degradation on a gas-phase protein sequencer (LF 3000, Beckman Instruments) equipped with an on-line Beckman System Gold high performance liquid chromatography system. The HPLC equipment included a model 126 pump and a diode array detector set at 268 y 293 nm for signal and reference, respectively. The HPLC column was a Beckman Spherogel Micro PTH (2 x 150 mm). Standard Beckman sequencing reagents were used.

Size-exclusion gel chromatography. Zonal size exclusion chromatography of both the native and nicked protein was performed using a Beckman high performance liquid chromatography (HPLC) system with a 7.5 X 300 mm Ultra-Spherogel-SEC 3000 column, pore size of 230 Å (M_r range 5×10^4 to 7×10^5). The mobile phase contained 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, and 100 mM sodium phosphate (pH 7.0). The column was

equilibrated and eluted at room temperature at a flux rate of 1 ml/min. Elution profiles were determined by recording the absorbance of the eluted samples at 280 nm.

Mass spectrometry. The molecular masses of the fragments obtained from PVDF membranes were sent to SynPep Corporation service (Dublin, CA) for electrospray mass spectroscopy analysis. SDS-PAGE and trans-blotting were performed several times to accumulate sufficient protein.

Protein concentration. Protein concentration of the enzymes was determined from their absorbance at 280 nm. The molecular extinction coefficients of the enzymes (ϵ_{280}) were calculated according to Pace et al (1995), 34950 M⁻¹cm⁻¹ for TbTIM (Pérez-Montfort et al., 1999), 33460 M⁻¹cm⁻¹ for TcTIM, and 24870 M⁻¹ cm⁻¹ for Carlsberg subtilisin.

Results

The effect of subtilisin on the activity of TbTIM and TcTIM was studied at a temperature of 30 °C. In the experiments of Figure 1, the concentration of the TIMs was maintained constant, while that of subtilisin was varied in the molar ratios of subtilisin : TIM that ranged from 0.019 to 1. After 36 hours, the activity of the enzymes was measured, and it was found that as the concentration of subtilisin increased, the activities of the trypanosomal enzymes decreased. However, TcTIM and TbTIM differed in their sensitivity to subtilisin. TcTIM exhibited a progressive decay of activity and at a ratio of 1 subtilisin : TcTIM, its activity was almost completely abolished. The decrease in activity of TbTIM was less marked, and abolition of catalytic activity required much higher concentrations of subtilisin.

In order to determine how changes in activity relate to proteolysis, we carried out a time course of the action of subtilisin on the two enzymes. The enzymes were incubated at a molar ratio of 1 subtilisin per 1 TIMs, at different times. Samples were quenched with PMSE, and the

activity of TIM and its electrophoretic profile in SDS gels were determined (Fig 2). In TcTIM, there was a progressive diminution of the 27 kDa band that corresponds to the TcTIM monomer; this was accompanied by loss of catalytic activity (Fig 2, A). Under the conditions of the experiment, log plots of remaining activity versus time were linear; the pseudo-first-order rate constant of the inactivation process was $0.11 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$. Because the half-times for loss of catalytic activity and disappearance of the 27 kDa band were in the same range (6.2 and 8.4 hours, respectively), it would appear that the two processes were closely related

The effect of subtilisin on TbTIM was markedly different. In the first 16 hours of incubation there was a progressive loss of the 27 kDa band. However, between 16 and 36 hours of incubation, the level of the protein band remained at a level that was around 40 to 50 % of the control (Fig. 2, B). The activity of TbTIM exposed to subtilisin also decayed by about 50 % in the first 16 hours of incubation, but after that time, the activity remained rather constant for another 20 hours (Fig 2, B). After this time, activity decayed and after 60 hours of incubation activity was fully abolished, and the 27 kDa band had completely disappeared (the latter data are not shown)

Another difference between the two trypanosomal enzymes may be observed in Figure 2. The SDS PAGE electrophoretic pattern of TbTIM exposed to subtilisin, showed three clearly evident fragments of 13, 7.8 and 5.9 kDa and a faint band of 11.8 kDa. Apparently, subtilisin hydrolyzed some specific peptide bonds of TbTIM yielding fragments that were inaccessible to further action of subtilisin. On the other hand, in TcTIM the progressive disappearance of the 27 kDa was not accompanied by a concomitant appearance of lower molecular protein bands. This very likely indicates that the fragments that arose from the initial action of subtilisin underwent further degradation.

Determination of the sites of proteolysis in TbTIM and TcTIM.

The enzymes were incubated with subtilisin for 36 hours in the conditions of Figure 2, subsequently the proteolytic fragments were isolated from SDS PAGE gels. The 13, 7.8 and 5.9 kDa fragments derived from TbTIM were sequenced by Edman degradation. The largest fragment had the sequence MSKPQPIAA which corresponds to the amino terminal region of TbTIM. The amino acid sequence of the 7.8 kDa fragment was QAQEAHALIRSWVSS, whereas that of the 5.9 kDa fragment was AVVVLTQIA. Thus, the peptide bonds of TbTIM that were cleaved by subtilisin were those between Thr139 and Ala140, and Gln181 and Gln182. According to their amino acid composition, the three fragments have molecular weights of 15, 7.4 and 4.4 kDa, which is in consonance with the masses of the fragments calculated from their migration in SDS PAGE.

The determination of the sites of cleavage of TcTIM was more difficult. This is because its degradation by subtilisin was quite extensive, indeed, in gels loaded with 8 µg of protein, no fragments of proteolysis were detected (Fig. 2). However, when 300 µg of protein were applied to the gels, two fragments with apparent molecular masses of 15 and 8.9 kDa were clearly apparent. The N-terminal sequence of the low molecular weight fragment was QAQEVHEL, indicating cleavage between Gln181 and Gln182. According to its amino acid compositions, the latter cleavage should give the carboxyl terminal peptide of 7.7 kDa, which is in the range of the mass of the peptide observed in SDS gels. The latter cleavage should also give the fragment between Met1 and Gln181 with a mass of 19.6 kDa. However, in SDS PAGE, the apparent mass of the fragment that had the sequence of the N-terminal region of native TcTIM (MASKPQP) was 15 kDa. The relatively low mass of the latter peptide indicated that there was another site of cleavage in the span between Met1 and Gln181. Therefore, the peptide that had the N-terminal

region of native TcTIM was analyzed by mass spectrometry. The results showed two main molecular masses of 14,188 and 14,223 Daltons. The latter corresponds to a peptide that ends in Asn131, whereas the former ends in Thr130. Thus, the overall results indicate that in TcTIM, subtilisin hydrolyzes the bonds between Gln181 and Gln182, and those between Thr130-Asn131 and Asn131-Glu 132.

The sites of cleavage by subtilisin of TbTIM and TcTIM and those in other TIMs are depicted in Figure 3.

Molecular mass of nicked TbTIM

TbTIM incubated with subtilisin exhibits an initial drop of activity that is followed by a relatively long interval in which activity and the concentration of the 27 kDa protein band remained at a level of about 50 % of the control (Fig. 2). The biphasic pattern in the hydrolysis of TbTIM could reflect the existence of two enzyme populations. However, this possibility seems unlikely, since the enzyme we used was a recombinant product, and we observed the same results in three separate preparations. That is, in the three preparations, the drop in activity leveled off at about *one half* of the original activity. Perhaps of more significance is that native TbTIM exhibits only one protein in gels run under non-denaturing conditions (see below), indicating that the population of TbTIM was homogeneous.

Therefore, we examined the characteristics of TbTIM that had been hydrolyzed to the point in which it had about half of the starting monomer concentration and about 50 % of the original activity. TbTIM in this state was prepared by incubating the enzyme with subtilisin at a molar ratio of 4 TbTIM : 1 subtilisin, after 36 hours, the proteolytic reaction was arrested with PMSF. The elution times of the resulting TbTIM and native TbTIM in size-exclusion silica chromatography were determined (Fig. 4). The retention times of control and subtilisin treated

TbTIM were almost identical. Samples of the enzyme that eluted at various times (arrows in Fig 4) were examined by SDS PAGE. TbTIM exposed to subtilisin exhibited the band of 27 kDa plus the other three protein bands that were produced by hydrolysis. Thus, the experiments are strongly indicative that the proteolytic cleavage of TbTIM was not accompanied by dissociation of the fragments that result from proteolysis.

Electrophoretic mobility of TbTIM and TcTIM exposed to subtilisin.

The electrophoretic mobility of TbTIM that was exposed to subtilisin for various times was determined in gels run under non-denaturing conditions (Fig. 5). In the first 10 hours of incubation, only one band with an electrophoretic mobility equal to the native enzyme was observed. After that time and up to 35 hours, a band with slower migration became apparent, the intensity of this second band increased with time. These observations indicate that nicked TbTIM conserves the structure of the native dimer, albeit with time, it undergoes progressive alterations that slow down its migration towards the cathode. The change in migration of nicked TbTIM could reflect oxidation of cysteines or deamidation of asparagines of TbTIM. Indeed, these relatively slow spontaneous reactions have been documented in TIMs from other sources (Gracy et al , 1990, Tang et al , 1990, Sun et al , 1992). It must be added that at incubation times of more than 35 hours, the band of higher mobility gradually disappeared with a concomitant increase in the band of lower mobility, moreover, in those times, a third protein band with an even lower mobility became discernible (data not shown). In control TbTIM the changes in electrophoretic mobility were not observed. Thus, it could be that nicking of TbTIM predisposes it for undergoing alterations of its cysteines or asparagines.

In non-denaturing gels, TcTIM exposed to subtilisin exhibited a nearly complete absence of the protein band that corresponds to native TcTIM, in the gels, no other protein bands were

detected. This is further confirmation of the extensive proteolysis induced by subtilisin in TcTIM. The data in Figure 5 also show that the migration of native TcTIM was lower than that of TbTIM which is a reflection of its lower iso-electric point.

Kinetics and intrinsic fluorescence of nicked TbTIM

The activities of native and nicked TbTIM were measured with different concentrations of glyceraldehyde 3-phosphate. The Lineweaver-Burk plots of the data were linear. The K_m of native and nicked enzymes were similar (0.56 and 0.45 mM, respectively). However, the k_{cat} of nicked TbTIM ($1.1 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$) was about 50 % lower than that of the native enzyme ($2 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$).

The emission spectra of the intrinsic fluorescence of nicked TbTIM were recorded after exciting at 280 and 295 nm. At an excitation wavelength of 295 nm, and in comparison to native TbTIM, the fluorescence intensity of the nicked enzyme was about 8 % lower, and its spectral center of mass was 5 nm higher (Fig. 6 and inset). At an excitation wavelength of 280 nm, the same spectral differences between native and nicked TbTIM were observed (inset in Fig. 6). At an excitation wavelength of 280 nm, the emission spectra reflects excitation of tyrosines and tryptophans, whereas at 295 nm, the main contribution to fluorescence derives from excitation of the five tryptophans of TbTIM. Thus, it would appear that nicking predominantly perturbs the environment of the tryptophans.

The emission fluorescence spectrum of TcTIM that had been exposed to subtilisin was also determined (Fig. 6 and inset). The spectrum showed that subtilisin causes profound alterations in the structure of TcTIM. The spectral center of mass was red shifted by 25 nm, and its fluorescence intensity decreased by 38 %. These findings are in consonance with preceding data that show that TcTIM is highly sensitive to subtilisin action.

Stability of nicked TbTIM

In addition to ascertaining the kinetics and intrinsic fluorescence of nicked TbTIM, it was considered relevant to assess if limited proteolysis affects the stability of the quaternary structure of TbTIM. Oligomeric proteins dissociate according to the association constant between subunits. Since in its monomeric form TIM is catalytically inactive (Waley 1973, Zabori et al., 1980; Garza-Ramos 1992), it is possible to gain insight into the stability of the dimer from measurements of its specific activity after it has been pre-incubated at different protein concentrations.

Accordingly, native and nicked TbTIM were pre-incubated for two hours at 36 °C in a concentration range that varied from 20 to 10,000 ng of enzyme per mL, at that time, activity was measured. The curves of specific activity versus the concentration of both, the native and nicked enzymes in the pre-incubation period were sigmoid (Fig 7). At low protein concentrations, activity was low and constant. This phase was followed by an ascent in specific activity up to a point in which specific activity reached a maximum constant level. The curves essentially reflect dissociation of the dimer as the concentration of protein is decreased. The curves of the native and nicked TbTIM were markedly similar. The *apparent* K_D were 3×10^{-8} and 3.8×10^{-8} M for the native and nicked TbTIM, respectively. The marked similarity of the latter values indicated that limited proteolysis of TbTIM did not perturb to a significant extent, the association between subunits.

Discussion

There are two main points in the results of this work. One is that two very similar enzymes in amino acid sequence and structure exhibit marked differences in sensitivity to the

proteolytic action of subtilisin. The other is that limited hydrolysis of TbTIM yields an enzyme with characteristics that have not been described before.

Why is TcTIM more sensitive than TbTIM to the proteolytic action of subtilisin?

In the two enzymes, subtilisin hydrolyzes a common peptide bond, that between Gln181 and Gln182. However, the bonds between Thr130 and Asn 131, and Asn 131 and Glu132 are hydrolyzed in TcTIM, but not in TbTIM. In TbTIM, the peptide bond that is exclusively hydrolyzed is between Thr139 and Ala 140. Since different bonds are hydrolyzed in the two enzymes, it may be reasoned that if the bonds cleaved in TcTIM are central for its stability, their breakage would facilitate a further action of subtilisin. Hence, it is instructive to examine the positions of the sites of cleavage in the crystallographic structures of two enzymes. In the two enzymes, helix 5 is divided by a short loop. TcTIM was nicked before the beginning of the short loop, whereas TbTIM was hydrolyzed at the end of the short loop. Thus, assuming that the large differences in sensitivity to subtilisin of TcTIM and TbTIM result from different sites of cleavage, it becomes intriguing that hydrolysis of peptide bonds that are in the same region of the enzyme account for such drastic differences.

There could be, however, another explanation for the high sensitivity of TcTIM to subtilisin. The effect of subtilisin on TIMs from rabbit (Vogel and Chmielewski, 1994, Sun et al, 1992), yeast (Sun et al, 1993) and *Plasmodium falciparum* (Ray et al, 1999) has also been studied. All TIMs were cleaved, but there were marked differences in the positions of the sites of cleavage (see Fig. 3). Notwithstanding the wide distribution of the sites of hydrolysis, the nicked TIMs preserved their tertiary and quaternary structures, and exhibited essentially unimpaired catalytic function. This indicates that the three TIMs have a robust structure that resists splitting of peptide bonds that are located in different positions. Accordingly, TIM from *T. cruzi* would

seem to be rather exceptional. Along this line, it is recalled that the accessibility of thiol reagents to a cysteine that is buried within the interface of trypanosomal enzymes is much higher in TcTIM than in the other TIMs that have that cysteine, for example TbTIM (Garza-Ramos et al., 1998, Pérez-Montfort et al., 1999, Reyes-Vivas et al., 2001). Because in TbTIM and TcTIM, the contacts of the cysteine with the surrounding atoms are markedly similar (Maldonado et al., 1998), it is possible that the higher susceptibility of TcTIM to thiol reagents is consequence of a relatively high intrinsic flexibility. This could also be the cause of its high sensitivity to subtilisin.

Nicked TbTIM

As noted, the exposure of TIMs from rabbit (Vogel and Chmielewski, 1994, Sun et al., 1992), yeast (Sun et al., 1993), and *P. falciparum* (Ray et al., 1999) to subtilisin yields nicked enzymes with catalytic properties similar to those of the native enzymes. The SDS gels of these nicked TIMs show the complete absence of the protein band that corresponds to the monomer, thus, the nicked monomers of the three TIMs are catalytically competent. When TbTIM is exposed to subtilisin, there is a long interval in which the enzyme has about 50 % of its original concentration of intact monomers (Fig. 2). In this state, the enzyme exhibits the mass of the intact dimer, and a k_{cat} that is approximately 50 % of that of the original enzyme. Since the starting preparation was homogeneous, the logical interpretation of the overall data is that nicked TbTIM is formed by an intact catalytically competent monomer and a nicked monomer that is unable to carry out catalysis. It is noteworthy that nicked TbTIM exhibited a K_m for glyceraldehyde 3-phosphate almost equal to that of native TbTIM. Thus, the kinetics of the intact monomer were not perturbed, albeit it was attached to an inactive nicked monomer. In a certain sense, nicked TbTIM is similar to the dimer formed by an intact monomer and a monomer that

had chloroacetal phosphate covalently bound to its catalytic center (Sun et al , 1992b). This enzyme exhibited half of the catalytic activity of the intact dimer without important alterations in K_m .

If other nicked monomers carry out catalysis, why is the nicked monomer of TbTIM catalytically inert? The reason could be that the peptide bond that was hydrolyzed in TbTIM was between Gln181 and Gln182, a peptide bond that was not cleaved in the other aforementioned TIMs. This peptide bond is close to the end of loop 6 (residues 168 to 178) which is a mobile loop that closes over the catalytic site in order to prevent hydrolysis of the enediol intermediate of the catalytic cycle (Sampson and Knowles, 1992) Furthermore, in its closed conformation, Gly175 of loop 6 places the substrate in a position favorable for proton transfer from substrate to product The amino acid requirements for the hinge that supports the movement of loop 6 (residues 168, 169 and 170, and 176, 177, 178 in the amino and carboxyl regions, respectively) have been carefully documented (Sun and Sampson, 1998, Sun and Sampon, 1999, Xiang et al , 2001) Nonetheless, it could be that the integrity of the peptide bond between Gln181 and Gln182 is necessary for the movement of loop 6 In this context, it may be relevant that the fluorescence intensity of TbTIM is slightly lower than in TbTIM and that its spectral center of mass is red shifted by 5 nm Because it has been shown that Trp170 of loop 6 contributes strongly to the overall fluorescence of yeast TIM (Sampson and Knowles, 1992) it could be that the emission spectra of nicked TbTIM may reflect perturbations of loop 6

The existence of TbTIM in which only one of its monomers was cleaved raises a further question Why was only one of the two monomers of homodimeric TbTIM cleaved by subtilisin? In principle, there are two possibilities i) one of the monomers is intrinsically more sensitive to subtilisin, or ii) the action of subtilisin is random but the cleavage of one monomer induces

resistance to subtilisin in the other monomer. At the moment we are unable to distinguish between the two alternatives. However, it is worth noting that crystals of TcTIM soaked in hexane showed the presence of three hexane molecules (Gao et al., 1999). Two were at outer region of the dimer interface: the other was within 4 Å distances of Thr139 that is one of the sites of cleavage by subtilisin in TbTIM. The latter hexane molecule was observed in only one of the subunits. Thus, it is possible that there is an intrinsic asymmetry between the two subunits. With respect to the possibility that cleavage of one monomer induces resistance to proteolysis in the other subunit, it is noted that although TIM exhibits classical Michaelis-Menten kinetics, it has been documented that there is cross-talk between the catalytic centers of the two monomers (Harris et al., 1998). In addition, it was reported that events at the catalytic site are transmitted to the dimer interface (Sun et al., 1992b; Pérez-Montfort et al., 1999). Thus, it could be that alterations in one monomer modify the characteristics of the other subunit.

REFERENCE

- Albert T, Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Philips DC, Rivers PS, Wilson IA 1981 On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triosephosphate isomerase *Phil Trans Roy Soc ser B* 293 159-171
- Albery WJ, Knowles JR 1976 Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry* 15:5631-5640.
- Alvarez M, Zeelen JP, Mainfroid V, Rentier-Delrue F, Martial JA, Wyns L, Wierenga RK, Maes D 1998. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J Biol Chem* 273:2199-2206
- Anfinsen CB 1973 Principles that Govern the Folding of Protein Chains *Science* 181:223-181
- Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman JD, Offord RE, Priddle JD, Waley SG 1975 Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data *Nature* 255 609-614
- Borchert TV, Pratt K, Zeelen JP, Callens M, Noble ME, Opperdoes FR, Michels PA, Wierenga RK 1993 Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur J Biochem* 253 684-691
- Delbont LF, Mande SC, Rentier-Delrue F, Mainfroid V, Turley S, Vellieux FMD, Martial JA, Hol WGJ 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

- Gao XG, Maldonado E, Pérez-Montfort R, Garza-Ramos G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Rodríguez-Romero A 1999 Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proc Natl Acad Sci USA* 96.10062-10067.
- Garza-Ramos G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Gracy RW 1992 Dimerization and reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles. *Eur J Biochem* 208 389-395
- 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 cysteine residues of triosephosphate isomerase. *Eur J Biochem* 241 114-120.
- Garza-Ramos G, Cabrera N, Saavedra-Lira E, Tuena de Gómez-Puyou M, Ostoa-Saloma P, Pérez-Montfort R, Gómez-Puyou A 1998 Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur J Biochem* 253 684-691
- Gracy KN, Tang CY, Yuksel KU, Gracy RW 1990 The accumulation of oxidized isoforms of chicken triosephosphate isomerase during aging and development. *Mech Ageing Dev* 56 179-86
- Gupta RA, Yuan CS, Ault-Riché DB, Borchardt RT 1995 Limited proteolysis of S-adenosylhomocysteine hydrolase. Implications for the three-dimensional structure. *Arch Biochem Biophys* 319 365-371
- Harris TK, Cole RN, Corner FI, Mildvan AS 1998 Proton transfer in mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 37 16828-16838

- Hofsteenge J, Braun PJ, Stone SR 1988. Enzymatic properties of proteolytic derivatives of human α -Thrombin *Biochemistry* 27: 2144-2151.
- Huang H, Yuan CS, Borchardt RT 1997 Effect of limited proteolysis on the stability and enzymatic activity of human placental S-adenosylhomocysteine hydrolase *Protein Science* 6:1482-1490
- Juul B, Ture H, Durand ML, Gomez de Gracia A, Denoroy L, Møller JV, Champeil P, Maire MI 1995. Do transmembrane segments in proteolized sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase retain their functional Ca^{2+} binding properties after removal of cytoplasmic fragments by proteinase K? *J Biol Chem* 270:20123-20134
- Knowles JR. 1991. Enzyme catalysis, not different, just better *Nature* 350 121-124.
- Lolis E, Alber T, Davenport RC, Rose D, Hartman FC, Petsko GA 1990 Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution *Biochemistry* 29 6609-6618
- Luque I, Freire E 2000 Structural stability of binding sites Consequences for binding affinity and allosteric effects *Proteins Struct Funct Genet* 4 63-71
- Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R 1998 Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes *J Mol Biol* 283 193-203
- Mande SC, Mainfroid V, Kalk KH, Goraj K, Martial JA, Hol WG 1994 Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme *Protein Sci* 3 810-821

- McLellan T. 1982. Electrophoresis Buffers for polyacrylamide gel at various pH. *Anal Biochem* 126 94-99
- Nickbarg EB, Knowles JR 1988 Triosephosphate isomerase; energetics of the reaction catalyzed by the yeast enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 27:5939-5947.
- Noble MEM, Zeelen JP, Wierenga RK, Mainfroid V, Goraj K, Gohimont AC, Martial JA. 1993. Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution *Acta Crystallog sect D* 49 403-417
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T 1995 How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein *Protein Sci* 4:2411-2423
- Pérez-Montfort R, Garza-Ramos G, Hernández-Alcantara G, Reyes-Vivas H, Gao X, Maldonado E, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A 1999 Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface *Biochemistry* 38 4114-4120
- Pollegioni L, Ceciliani F, Curti B, Ronchi S, Pilone MS 1995 Studies on the structural and functional aspects of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase by limited trypsinolysis *Biochem J* 310 577-583
- Ray SS, Balaram H, Balaram P 1999 Unusual stability of a multiply nicked form of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase *Chem Biol* 6 625-637
- Reyes-Vivas H, Hernandez-Alcantara G, López-Velázquez G, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A 2001 Factors that control the reactivity of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* *Biochemistry* 40 3134-3140

- Sampson NS, Knowles J. 1992 Segmental movement definition of the structural requirements for loop closure in catalysis by triosephosphate isomerase *Biochemistry* 31:8482-8487.
- Schagger H, von Jagow G. 1987 Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa *Analytical Biochemistry* 166 368-379.
- Siddiqui KS, Rangarjan M, Hartley BS, Kitmitto A, Panico M, Plench IP, Morris HR. 1993. Archaeobacter D-xylose isomerase; partial proteolysis with thermolysin. *Biochem J* 289:201-208.
- Sun AQ, Yüksel KÜ, Gracy RW. 1992. Relationship between the catalytic center and the primary degradation site of triosephosphate isomerase: effects of active site modification and deamidation *Arch Biochem Biophys* 293 382-390.
- Sun AQ, Yüksel KÜ, Gracy RW 1992b Interactions between the catalytic centers and subunit interface of triosephosphate isomerase probed by refolding, active site modification, and subunit exchange *J Biol Chem* 267 20168-20174
- Sun AQ, Yüksel KU, Gracy RW 1993 Limited proteolysis of Triose-phosphate isomerase and characterization of the catalytically active peptide complex *J Biol Chem* 268 26872-26878
- Sun J, Sampson NS 1998 Determination of the amino acid requirements for a protein hinge in triosephosphate isomerase *Prot Sci* 7:1495-1505.
- Sun J, Sampson NS. 1999 Understanding protein lids kinetic analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase *Biochemistry* 38:11474-11481
- Xiang J, Sun J, Sampson NS 2001 The importance of hinge sequence for loop function and catalytic activity in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase *J Mol Biol* 307 1103-1112

- Tang CY, Yuksel KU, Jacobson TM, Gracy RW 1990 Isoforms of chicken triosephosphate isomerase are due to specific oxidation of cysteine126 *Arch Biochem Biophys* 283:12-9
- Velanker SS, Ray SS, Gokhale RS, Suma S, Balaram H, Balaram H, Murthy MRN. 1997 Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*; the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* 5:751-761.
- Vogel K, Chmielewski J. 1994 Rapid and efficient resynthesis of proteolyzed triosephosphate isomerase. *J Am Chem Soc* 116: 11163-11164
- Waley SG. 1973. Refolding of triosephosphate isomerase. *Biochem J* 135.165-172
- Wierenga RK, Noble MEM, Vriend G, Nauche S, Hol WGJ. 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.
- Yuen S, Hunkapiller MW, Wilson KJ, Yuan PM 1988 Applications of tandem microbore liquid chromatography and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/electroblotting in microsequence analysis *Anal Biochem* 168 5-15
- Zabori S, Rudolph R, Jaenicke R 1980 Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle *Z Naturforsch* 35c 999-1004

Figure Legends

Figure 1. Effect of different concentrations of subtilisin on the activity of TcTIM and TbTIM. TcTIM and TbTIM were incubated at 30 °C at concentration of 1 mg / mL of 100 mM triethanolamine and 10 mM EDTA at pH 7.4. The mixture also contained subtilisin in the indicated molar subtilisin : TIM ratios. After 36 hrs of incubation, proteolysis was arrested by the addition of 3 mM PMSF and activity was measured as described in the Methods section. The results are expressed as % residual activity in which 100 % was 2400 and 2900 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ for TbTIM and TcTIM respectively

Figure 2. Time course of the effect of subtilisin on TcTIM (A) and TbTIM (B). The experimental conditions were as Figure 1 except that the enzymes were incubated with subtilisin at a molar ratio of 4 TIM : 1 subtilisin. At the indicated times the reaction was arrested with 3 mM PMSF. The samples (8 μg of protein) were analyzed by SDS/PAGE electrophoresis (upper sections in A and B). Activity of the samples was also determined. The lower part of the Figure shows the percent residual activity (open circles), and the extent of hydrolysis of the 26.9 kDa protein band (the protein that corresponds to the monomer) at the indicated times. The extent of hydrolysis was determined by densitometric scanning (closed circles)

Figure 3. Sites of cleavage by subtilisin of TbTIM, TcTIM, and TIMs from *P. falciparum*, yeast, and rabbit. The secondary structure depicted on the top of the sequence belongs to TbTIM and TcTIM. The sites of nicking by subtilisin in each of the enzymes are boxed. The data on rabbit, yeast and *P. falciparum* TIMs were taken from Vogel and Chmielewski (1994), Sun et al (1993), and Ray et al (1999), respectively

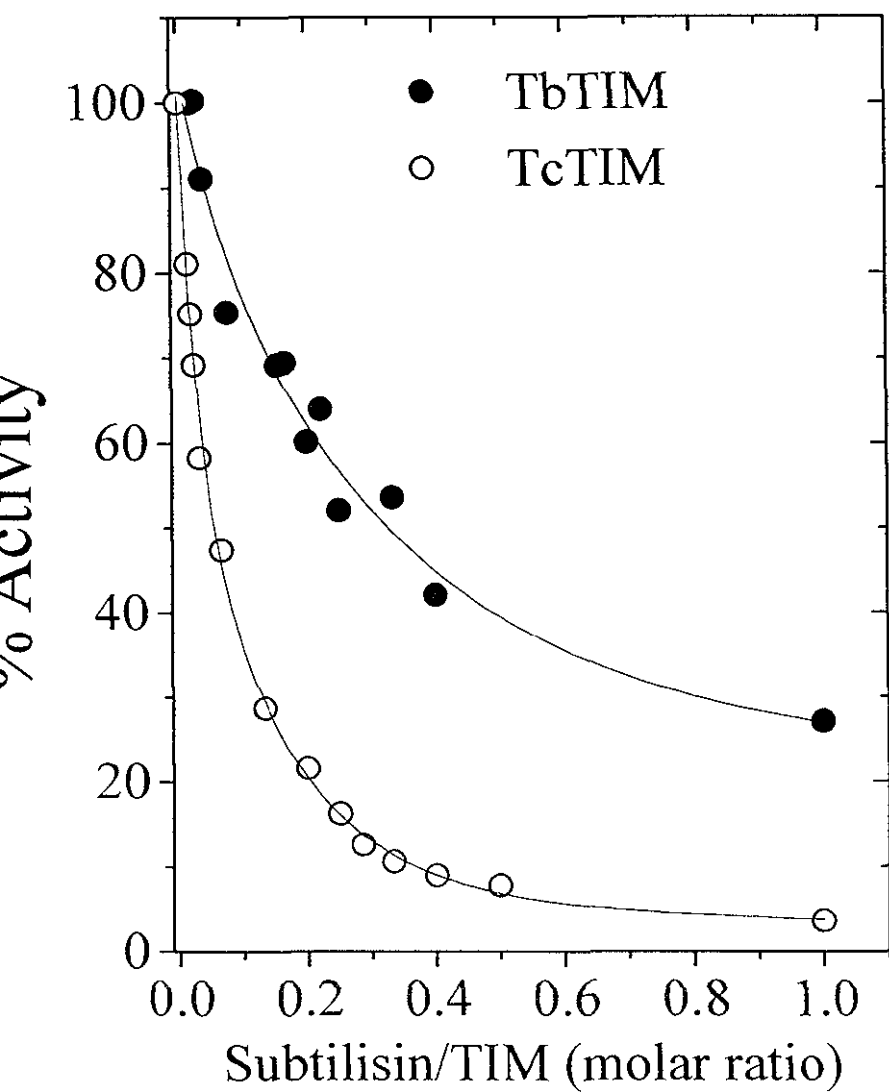
Figure 4. Size-exclusion chromatography of native and nicked TbTIM. Nicked TbTIM was obtained after incubation of the native enzyme at a molar ratio of 4 TbTIM per subtilisin for 36 hours. At this time the reaction was arrested with 3 mM PMSF. Size exclusion chromatography of native TbTIM (A) and of the nicked enzyme (B) was performed as described under Methods. Samples at the indicated times of elution (arrows) were analyzed by SDS/PAGE (C).

Figure 5. Non-denaturing gel electrophoresis of native TbTIM (A) and TcTIM (B) and after their exposure to subtilisin. The experimental conditions were as in Figure 2, except that the reaction was arrested at the indicated times with 3 mM PMSF. Samples were analyzed in gels run under non-denaturing conditions as described in the Methods section.

Figure 6. Intrinsic fluorescence of TbTIM and TcTIM in their native state and after their exposure to subtilisin. The experimental conditions were as in Figure 2. After 36 hours of incubation, the reaction was arrested with 3 mM PMSF and the intrinsic fluorescence emission spectra of the enzymes were determined at room temperature in media that contained 100 mM triethanolamine and 10 mM EDTA, pH 7.4. The concentration of the enzymes was 60 µg/mL. The spectra shown (FI = fluorescence intensity) were obtained after subtracting the blank (no enzyme) from the experimental. The spectral center of mass at excitation wavelengths of 280 nm and 295 nm were calculated. The data are shown in the lower part of the Figure.

Figure 7. Activity of native and nicked TbTIM after their incubation at various protein concentrations. Nicked TbTIM was obtained as in Figure 2 after 36 hours of incubation. Native

and nicked TbTIM (closed and open circles, respectively) were incubated at 36 ° C at the indicated protein concentrations in 100 mM triethanolamine and 10 mM EDTA at pH 7.4. After 2 hours of incubation activities were determined. The results are expressed as percent of residual activity in which 100 % was 2400 and 1200 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ for native and nicked TbTIM, respectively



HRS → C 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33

HRS → C 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33

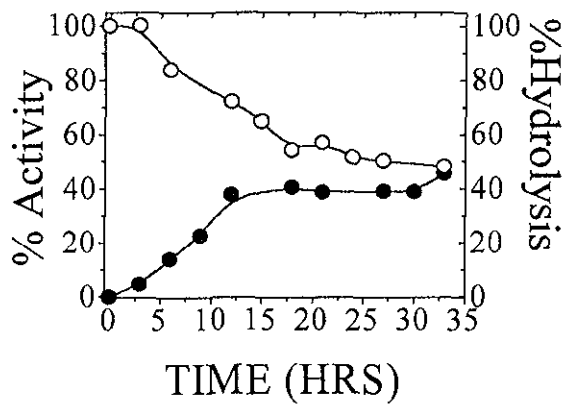
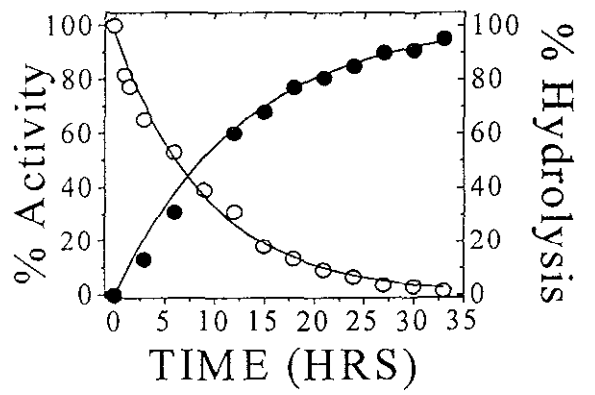
27.3 kDa →

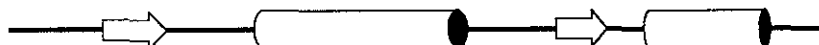
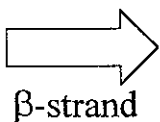
26.9 kDa →

13.0 kDa →

7.8 kDa →

5.9 kDa →

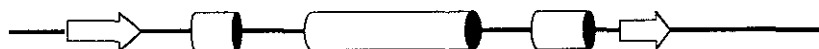




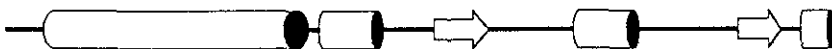
M-SKPQPIAA	ANWKCNGSQ	SLSELIDLFN	STSI-NHDVQ	CVVASTFVHL	AMTKERLSHP	58
MASKPQPIAA	ANWKCNGSES	LLVPLIETLN	AATF-DHDVQ	CVVAPTFLHI	PMTKARLTNP	59
MARK--YFVA	ANWKCNGTLE	SIKSLTNSFN	NLDFDPSKLD	VVFPVSVHY	DHTR-KLLQS	57
M-ART-FFVG	GNFKLNGSKQ	SIKEIVERLN	TASI-PENVE	VVICPPATYL	DYSVSLVKKP	57
APSRK-FFVG	GNWKMNGRKK	NLDELITTLN	ARKV-PADTE	VVCAPPTAYI	DFARQKLD-P	57



KFVIAAQNA-	IAKSGAFTGE	VSLPILKDFG	VNWIVLGHSE	RRAYYGETNE	IVADKVAADV	117
KFQIAAQNA-	ITRSGAFTGE	VSLQILKDYG	ISWVVLGHSE	RRLYYGETNE	IVAEKVAQAC	118
KFSTGIQNV	KFGNGSYTGE	VSABIAKDLN	IEYVIIGHFE	RRKYFHETDE	DVREKLQASL	117
QVTVGAQNAY	LKASGAFTGE	NSVDQIKDVG	AKWVILGHSE	RRSYFHEDDK	FIADKTKFAL	117
KIAVAAQNCY	KVTNGAFTGE	ISPGMIKDCG	ATWVVLGHSE	RRHVFGESE	LIGQKVAHAL	117



ASGMVIAICI	GETLQERESG	RINVVVLTQI	AAIAKLLKKA	DWAKVVIAYE	PVWAIGTGKV	177
AAGFHVIVCV	GETNEEREAG	RTAAVVLTQL	AAVAQKLSKE	AWSRVVIAYE	PVWAIGTGKV	178
KNNLKAIVCF	GESLEQREON	KTIEVITKQV	KAFVDLI--D	NFDNVILAYE	PLWAIGTGKT	175
GGVGVILCI	GETLEEKKAG	KTLDVVEROL	NAVLEEVK--	DWTNVVVAYE	PVWAIGTGLA	175
SEGLGVIACI	GEKLDEREAG	ITPKVVFEQT	KVIADNVK--	DWSKVVLAYE	PVWAIGTGKT	175

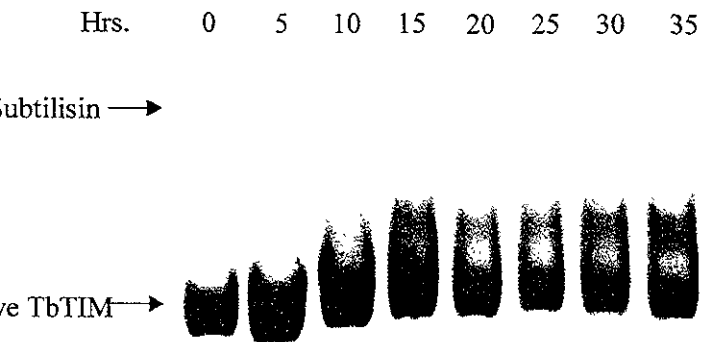


ATPQQAQEAH	ALIRSWVSSK	IGADVRGELR	ILYGGSVNGK	NARTLYQQRD	VNGFLVGGAS	237
ATPQQAQEVH	ELLRRWVRSK	LGTDIAAQLR	ILYGGSVTAK	NARTLYQMRD	INGFLVGGAS	238
ATPEQAQLVH	KEIRKIVKDT	CGEKQANQIR	ILYGGSVNTE	NCSSLIQQED	IDGFLVGNAS	235
ATPEDAQDIH	ASIRKFLASK	LGDKAASELR	ILYGGSANGS	NAVTFKOKAD	VDGFLVGGAS	235
ATPQQAQEVH	EKLRLGWLKSN	VSDAVAQSTR	IIYGGSVTGA	TCKELASQPD	VDGFLVGGAS	235

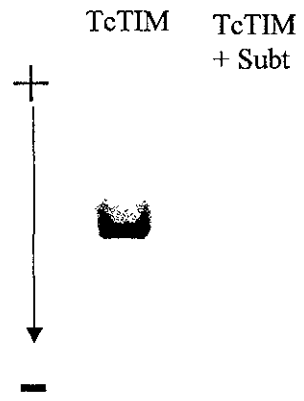


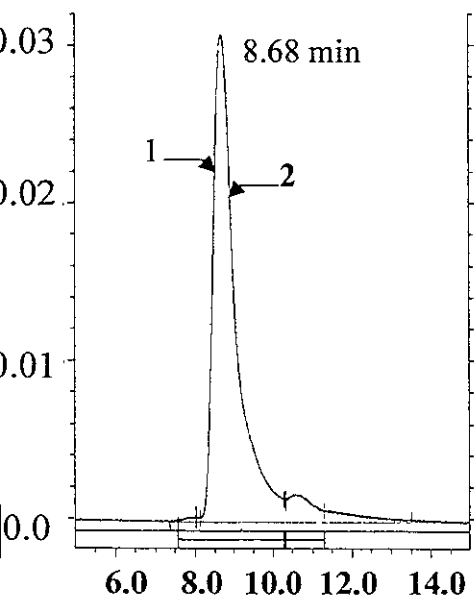
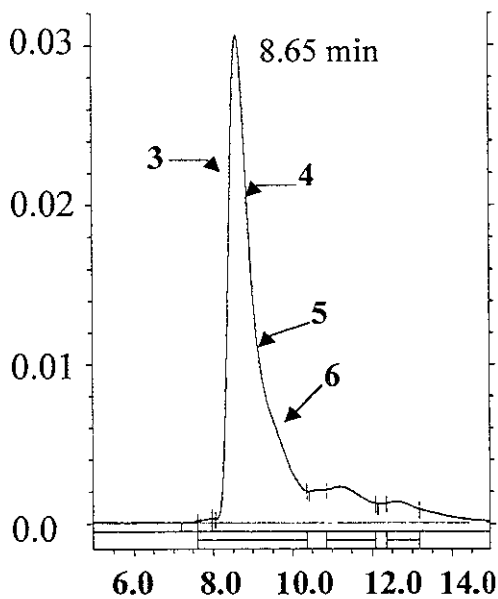
LKPEFVDIHK	ATQ	250
LKPEFVEIIE	ATK	251
LKESFVDIHK	SAM	248
LKPEFVDIIN	SRN	248
LKPEFVDIIN	AKO	248

A

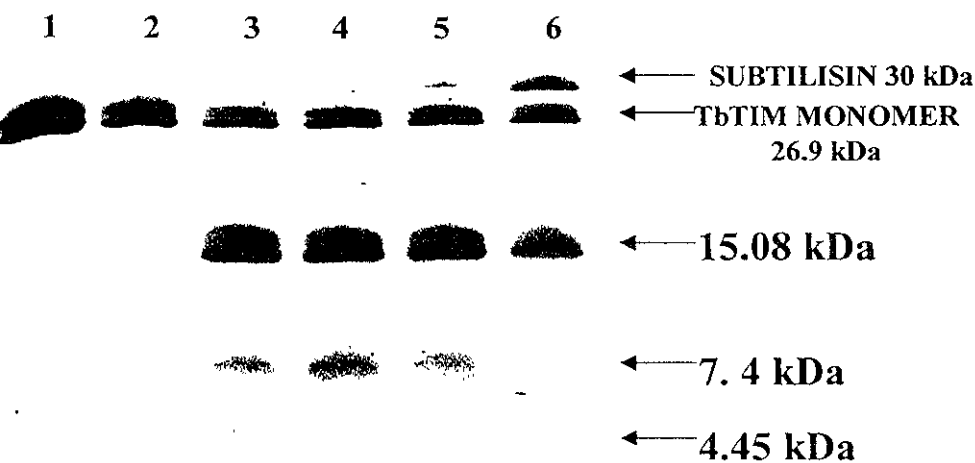


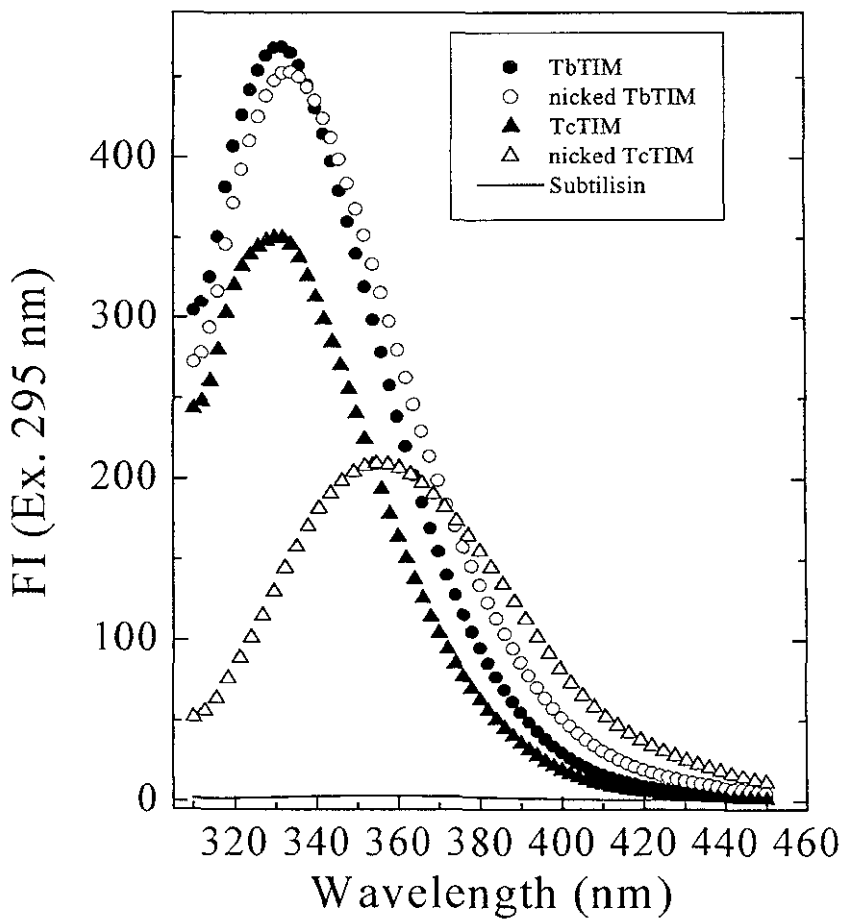
B



A**B**

RETENTION TIME, min





	Spectral mass center (nm)	
	Ex. 280 nm	Ex. 295nm
TbTIM	343.1	342
nicked TbTIM	348	348
TcTIM	341.6	340.8
nicked TcTIM	369.4	365.3

