



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**LAS INTERACCIONES NO ESPECÍFICAS DE LAS PROTEÍNAS
FAVORECEN SU ESTABILIDAD Y PLEGAMIENTO.
ESTUDIOS SOBRE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA Y
PROTEÍNA-MEMBRANAS BIOLÓGICAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A:

LAURA PAULETTE FERNÁNDEZ CÁRDENAS.

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARMANDO GÓMEZ PUYOU.

CIUDAD UNIVERSITARIA

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INTEGRANTES DEL JURADO

PRESIDENTE:	<i>DR. RUY PÉREZ MONTFORT</i>
SECRETARIO:	<i>DR. ARMANDO GÓMEZ PUYOU</i>
VOCAL:	<i>DR. ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO</i>
SUPLENTE:	<i>DRA. LAURA CAMARENA MEJÍA</i>
SUPLENTE:	<i>DRA. LETICIA RAMÍREZ SILVA</i>

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Armando Gómez Puyou en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

***Logic will take you from A to B.
Imagination will take you everywhere.***

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme otorgado formación académica y por la oportunidad de integrarme a un ambiente donde se propicia el intercambio de ideas y el respeto.
- Agradezco al Dr. Armando Gómez Puyou y a la Dra. Marietta Tuena Sangri por creer en mí. Por ayudarme a desarrollar un pensamiento crítico y concientizar la pasión por la ciencia. Agradezco su paciencia y enseñanzas, su ejemplo como científicos y como seres humanos. Por tener siempre tiempo para discutir resultados y comunicarle inquietudes. Gracias por toda la belleza intelectual, emocional y práctica que me han transmitido en estos años. Los admiro.
- A la Q.F.B Beatriz Aguirre López por su participación en el desarrollo de este proyecto, así como su asistencia técnica que fue indispensable en el presente trabajo.
- A los miembros del jurado: Dr. Armando Gómez Puyou, Dra. Leticia Ramírez Silva, Dr. Ruy Pérez Montfort, Dr. Alejandro Fernández Velasco y Dra. Laura Camarena Mejía, por sus observaciones y correcciones a esta tesis.
- A la Dra. Clorinda Arias por su apoyo como asesora y amiga, por motivarme y creer en mí.
- A la Lic. Cynthia Lima por su organización y colaboración en la gestión académica relacionada con esta licenciatura. Gracias por su amistad.
- A la Q.F.B María Concepción José Núñez y Bióloga Nallely Cabrera por su asesoría técnica.
- A la Sra. Guadalupe Franco por su ayuda en el laboratorio, por su amistad y apoyo.
- A los ingenieros Juan Manuel Barbosa e Ivette Rosas por su asesoría en el área de cómputo.
- Al personal de la biblioteca del Instituto de Fisiología Celular por ayudarme a la adquisición de bibliografía y préstamo de libros.
- A la biblioteca del Instituto en Investigación Biomédica Básica, especialmente a Martha Cariño Aguilar.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- Quiero agradecer a mis padres, Laura y Jaime, por su apoyo incondicional, por su paciencia y su amor. Porque siempre me han dado el coraje de seguir adelante aún cuando el camino se haya visto difícil. Gracias porque me han inculcado el ser una persona de bien, por preocuparse por mí todos los días, por consentirme y guiarme. Les admiro y amo.
- A mis abuelitos, Socorro y Luis, porque siempre me han dado su amor y sus cuidados. Porque desde pequeña han hecho todo lo posible por hacerme sonreír. Porque al igual que mis padres han sido mi brújula.
- A mis tíos y tías: Luis, Javier, Gera, Ne, Eva, Pepe, Tayde, Carlos, Norma, Paty, Coco, Gallo, Lucy, Agustín, Toño†, Lau, Soco y Marcela. Por proteger a las sobrinas, por su amor, alegría y consejos. Tengo una familia increíble. Gracias.
- A mis primas y pequeños primos: Marianis, Melis, Luis Alfredo, Pixie y Aylene, Monchis, gracias porque con pocas palabras y muchas sonrisas hacen mi vida hermosa y sencilla.
- A mis amigas: Carla, Den, mi Afri, Lulú, Janike y Damarita. Gracias por los años de amistad, por los momentos tan especiales que hemos vivido, por las risas, por la aventura, por ser mi apoyo. Gracias amigas por estar ahí siempre!
- A mis amigos: Fewer, Wendell, Víctor, Diego, Goyo y Gopeto. Gracias por su cariño y su buen humor. Disfruto enormemente estar con ustedes.
- A mis amigos de la licenciatura: En especial a Jony, Emma, Raúl, Nat y Damián, Dany R., Andrea, Du, Annie, la Branchis, Dani M. y Davido. Gracias por su lealtad, sinceridad, bailes, risas, pláticas coloquiales y científicas. Agradezco a la vida que nuestros caminos se hayan cruzado.
Gracias por haber compartido estos cuatro años conmigo, gracias por ser todos tan únicos y reales. Quiero decirles que nunca se sientan defraudados por haber elegido el camino de la ciencia. A veces no es valorada por los demás, no se valora tampoco nuestra formación, nos sentimos sin un camino fijo, lo vemos algo difuso. Sin embargo existe, nosotros lo estamos creando...gracias por crearlo para mí y ayudarme a darle sentido.
- A mis amigos del laboratorio: Laurita (Sensei), Gabysu, Mariel, Memín Pingüin, Osvi, Julito, Gaby, David, Yolanda, Claudia, Anita, Martincillo, Quique, Octavio (Master) y Gilda. Gracias porque pasamos juntos los momentos difíciles en el laboratorio; por haberme enseñado, escuchado, contestar mis preguntas, por las canciones, por darme su apoyo, su amistad y confianza. Gracias, porque sin ustedes la vida en el laboratorio NUNCA hubiera sido tan divertida.

- A Bety, por ser mi amiga, por su sinceridad, por ser positiva, por su sencillez, por ayudarme en todo momento, por su comprensión y confianza. Jamás olvidaré las pláticas acompañadas de un café.
- Al Dr. Alfredo (Hola!). Gracias amigo por el intercambio de ideas y opiniones, porque me has escuchado y guiado.
- Al laboratorio del Dr. Ruy Pérez: Nallely, Selmis, Moni, Itzel, Lupita, Beto y Jorge. Gracias por su amistad, su ayuda y calidez.
- A la pandilla de “las proteínas” (Jesús, Carlitos, Gus, Mari, Horacio, Lety, J.J., Edgar, etc): Por los grandiosos seminarios, comentarios y observaciones críticas, dirigidas siempre con el afán de ayudar y guiar. Gracias por darme un excelente ejemplo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN	3
INTERACCIONES MACROMOLECULARES	3
Antecedentes.....	3
Efecto de la Aglomeración Macromolecular en la Formación de Interacciones Macromoleculares.....	4
INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	5
Tipos de Interacción Proteína-Proteína	5
Formación de Interacciones Proteína-Proteína	6
INTERACCIONES PROTEÍNA-MEMBRANA BIOLÓGICAS	6
Membrana Lipídica y Proteínas Periféricas.....	6
Las Interacciones Proteína-Membranas Biológicas	7
LAS INTERACCIONES ESPECÍFICAS ENTRE PROTEÍNAS RELACIONADAS TIENEN UNA FUNCIÓN METABÓLICA	8
LAS INTERACCIONES NO ESPECÍFICAS ENTRE PROTEÍNAS NO RELACIONADAS INCREMENTAN LA ESTABILIDAD Y FORMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....	9
ENZIMAS MODELO.....	11
Triosafofosato Isomerasa (TIM).....	11
Características Estructurales y Mecanismo Catalítico de la TIM	11
Desamidación de la TIM.....	13
Lactato Deshidrogenasa (LDH)	13
Características Estructurales y Mecanismo Catalítico de la LDH	14
Plegamiento de la LDH	15
Citrato Sintasa (CS)	¡Error! Marcador no definido. 16
Características Estructurales y Mecanismo Catalítico de la CS.....	17
OBJETIVOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Proteínas.....	20
Triosafofosato Isomerasa (TIM)	20
Lactato Deshidrogenasa (LDH)	20
Citrato Sintasa (CS)	20
Actividad enzimática.....	20
Triosafofosato Isomerasa (TIM)	20
Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	21
Citrato Sintasa (CS).....	21
Determinación de la concentración de proteína.....	21
Desnaturalización y reactivación de la LDH	22
Estabilidad de la LDH y CS.....	22
Desamidación de <i>Tb</i> TIM	22

Identificación de la desamidación de la <i>Tb</i> TIM	22
Preparación de membranas biológicas.....	22
a) Vesículas invertidas de eritrocito de humano	22
b) Liposomas.	23
Estabilidad de <i>Tb</i> TIM en presencia de vesículas invertidas.	23
Unión de <i>Tb</i> TIM a membranas biológicas.	23
a) Vesículas invertidas	23
b) Liposomas	24
 RESULTADOS	 25
Efecto de la <i>Tb</i> TIM en la reactivación de la LDH.	25
Estabilidad de la LDH y CS en ausencia y presencia de diferentes proteínas	27
Características de la estabilidad de la LDH en presencia de varias proteínas.....	29
La desamidación de la <i>Tb</i> TIM en ausencia y presencia de LDH y CS.....	29
Estabilidad de los dímeros de <i>Tb</i> TIM al interactuar con vesículas invertidas.....	31
Unión de <i>Tb</i> TIM a vesículas invertidas.	32
Características de la unión de <i>Tb</i> TIM a vesículas invertidas.	32
Unión de TIM de diferentes especies a vesículas invertidas.....	34
Unión de <i>Tb</i> TIM a liposomas	35
Importancia de la catálisis en la unión de <i>Tb</i> TIM a vesículas invertidas.....	36
 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	 38
 BIBLIOGRAFÍA	 42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caricatura del ambiente intracelular magnificado a 1,000,000x.....	4
Figura 2. Estructura de la bicapa de fosfolípidos y localización de proteínas periféricas.....	7
Figura 3. La dilución del contenido celular favorece la disociación de multicomplejos.....	8
Figura 4. Efecto de diferentes proteínas en la formación y estabilización del dímero de <i>Tb</i> TIM.....	10
Figura 5. Estructura y sitio catalítico de la TIM.....	12
Figura 6. Estructura y sitio catalítico de la LDH.	15
Figura 7. Estructura y sitio catalítico de la CS.	18
Figura 8. Preparación de vesículas invertidas.....	23
Figura 9. Efecto de la <i>Tb</i> TIM en la reactivación de la LDH.....	26
Figura 10. Estabilidad de la LDH y CS en presencia y ausencia de distintas proteínas.....	28
Figura 11. El efecto de distintas proteínas en la estabilidad de la LDH es aditivo. ...	29
Figura 12. La desamidación de la <i>Tb</i> TIM en ausencia y presencia de proteínas.....	30
Figura 13. Efecto de las vesículas invertidas en la estabilización del dímero de <i>Tb</i> TIM	31
Figura 14. Características de la unión de <i>Tb</i> TIM a vesículas invertidas.....	33
Figura 15. Unión de TMs de diferentes especies a vesículas invertidas.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Unión de <i>Tb</i> TIM a vesículas invertidas.....	32
Tabla 2. Unión de <i>Tb</i> TIM a vesículas invertidas en presencia de sales.....	34
Tabla 3. Unión de <i>Tb</i> TIM a liposomas.....	36
Tabla 4 y 5. Importancia de la catálisis en la unión de <i>Tb</i> TIM a vesículas invertidas.	37

ABREVIATURAS

BSA	Albumina de suero de bovino
CS	Citrato sintasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTNB	5,5-ditiobis (2-nitro-ácido benzóico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
α -GDH	Glicerolfosfato deshidrogenasa
GdnHCl	Hidrocloreuro de guanidina
LDH	Lactato deshidrogenasa
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
pI	Punto isoeléctrico
PEG	Polietilenglicol
rpm	Revoluciones por minuto
TEA	Trietanolamina
TIM	Triosafofosfato isomerasa
TNB ²⁻	2-nitro-5-thiobenzoate
<i>GTIM</i>	TIM de <i>Giardia lamblia</i>
<i>LmTIM</i>	TIM de <i>Leishmania mexicana</i>
<i>ScTIM</i>	TIM de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>OcTIM</i>	TIM de <i>Oryctalogus cuniculus</i>
<i>TcTIM</i>	TIM de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>TbTIM</i>	TIM de <i>Trypanosoma brucei</i>
VI	Vesículas invertidas

RESUMEN

El medio intracelular contiene concentraciones de proteína que pueden llegar hasta 400 mg/ml. En un medio de tales características se puede suponer que existen numerosas interacciones de tipo no específico que pueden afectar el equilibrio de las reacciones. Es decir que si dentro de la célula ocurren numerosas interacciones proteína-proteína, algunas características de las proteínas podrían ser diferentes a las estudiadas *in vitro*. En este trabajo se estudio el efecto de la interacción de diferentes proteínas en la reactivación de la lactato deshidrogenasa (LDH) a partir de monómeros desplegados en hidrocloreuro de guanidina. Se encontró que la interacción de diferentes proteínas con la LDH induce un incremento en la formación del estado oligomérico por medio de la estabilización de la estructura tetramérica. Este estudio también se realizó con la enzima citrato sintasa (CS). Además, se estudió el efecto de la interacción de diferentes proteínas en la desamidación de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (*TbTIM*); en presencia de proteínas la desamidación de la *TbTIM* se previene parcialmente.

Se ha reportado que la triosafosfato isomerasa se une a diferentes estructuras celulares; con base en estos antecedentes se exploró si la *TbTIM* tiene la capacidad de unión a membranas biológicas y si ésta unión afecta la estabilidad de su estado dímérico. Se encontró que la TIM se une a vesículas invertidas de eritrocitos y que la interacción estabiliza al dímero. Además, la unión es dependiente de fuerza iónica, presenta una cinética saturable y se inhibe cuando la enzima realiza catálisis. Finalmente, con el objeto de estudiar si el sitio de unión ocurría a proteínas embebidas o a fosfolípidos de la bicapa, se prepararon liposomas de asolectina; se encontró que la *TbTIM* es capaz de unirse a los fosfolípidos de los liposomas y que la unión estabiliza al dímero.

Los datos sugieren que las interacciones proteína-proteína y proteína-membranas biológicas, que pueden ocurrir en el medio intracelular, afectan las propiedades de las enzimas, ayudando al plegamiento y a la estabilidad. En este estudio se da importancia al papel de las interacciones de tipo no específico, que han sido poco estudiadas y se ha ignorado el efecto de las mismas en las reacciones intracelulares.

INTRODUCCIÓN

INTERACCIONES MACROMOLECULARES

Antecedentes

A finales del siglo XIX, con el descubrimiento de Büchner sobre la fermentación y el aislamiento de enzimas, se iniciaron los estudios referentes a la organización de los elementos celulares. En los primeros veinte años del siglo XX, los científicos concebían a la célula como una “bolsa de enzimas”, posteriormente algunos científicos manifestaron la necesidad de involucrar ideas de organización celular con el fin de explicar las diferencias entre los eventos *in vivo* e *in vitro*. Uno de ellos fue David Green, quien reportó la existencia de un complejo multi-enzimático, constituido por todas las enzimas del ciclo de Krebs; explicó que las enzimas en este complejo, se encontraban localizadas de manera única y que por medio de interacciones macromoleculares se favorecía el flujo de las reacciones en una secuencia dada. En realidad, lo que Green describía era el espacio intramitocondrial (Green, 1958); sin embargo tuvo la idea de que existía una organización enzimática con implicaciones en el metabolismo.

Hace 4 décadas, Keith Porter sugirió que la célula eucariótica está dividida en una fase rica en proteínas y en una fase acuosa (Porter, 1984). Porter sugirió que la fase rica en proteínas, además de los elementos usuales del citoesqueleto, está compuesta por una red de proteínas a la que llamó mosaico microtubular, que consistía de complejos multi-enzimáticos, que de manera reversible, se asocian a F-actina. La existencia del mosaico microtubular comprobó que la célula no es simplemente una “bolsa de enzimas”, sino que gracias a múltiples interacciones macromoleculares existe una organización celular.

Actualmente, se acepta que las interacciones macromoleculares son fundamentales en todos los procesos celulares, por ejemplo: el ciclo celular, la activación de receptores, la transducción de señales, la apoptosis y la acción de las chaperonas. Sin embargo, se ha dado poca atención a la elevada concentración de

proteína que existe en la célula y su implicación en las interacciones que puedan existir entre proteínas no directamente relacionadas en una vía metabólica. Rodríguez-Almazán *et al.*, (2007) reportaron que este tipo de interacción afecta la estabilidad y el plegamiento de las proteínas. Si estas interacciones se tomaran en consideración se entendería mejor los procesos *in vivo* (Srere, 2000), ya que en el espacio intracelular de todos los organismos existen concentraciones muy elevadas de macromoléculas.

Efecto de la Aglomeración Macromolecular en la Formación de Interacciones Macromoleculares.

Las reacciones bioquímicas de los sistemas vivos se llevan a cabo en el medio intracelular que contiene altas concentraciones de macromoléculas. La concentración tan sólo de proteína se encuentra en el rango de 200 a 400 mg/ml, (Zimmerman *et al.*, 1993) mientras que en la mitocondria hay una concentración de 560 mg/ml (Srere, 1967, 1981). En tales condiciones, las macromoléculas ocupan una gran fracción del volumen, alrededor del 20-50 %, lo que resulta en la llamada aglomeración macromolecular y en el efecto del volumen excluido (**figura 1**) (Zimmerman *et al.*, 1993; Minton, 2000; Minton, 2001). La aglomeración macromolecular en la actualidad se ha considerado como un factor relacionado con las velocidades de reacción y equilibrio de los eventos que ocurren en el medio intracelular (Minton, 2001; Ellis y Minton, 2003), es además determinante en la formación de complejos (Svedruzic *et al.*, 2006) y en la compartimentalización metabólica (Ovádi *et al.*, 2004).

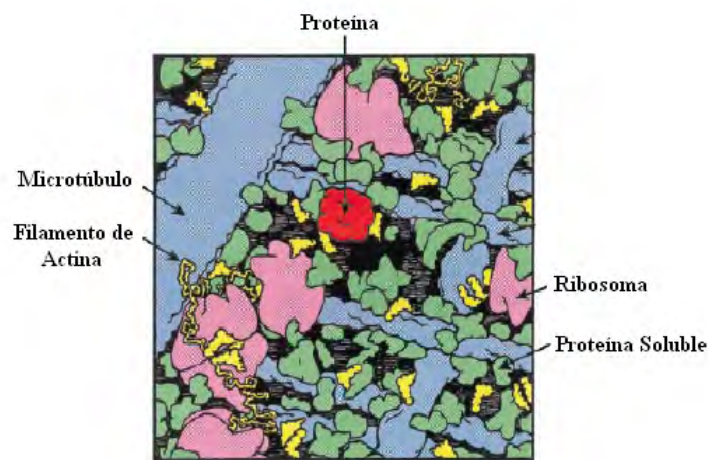


Figura 1. Caricatura del ambiente intracelular magnificado a 1,000,000x. Representación de una proteína en presencia de aglomeración macromolecular dada por proteínas solubles, ribosomas y filamentos del citoesqueleto (Minton, 2001).

Sin embargo, también se puede pensar que el medio aglomerado de la célula favorece la formación de interacciones no específicas entre moléculas. Éstas no dependen de la estructura primaria, secundaria o terciaria de las moléculas, sino de propiedades globales como lo son la carga neta, momento dipolo o multi-polo, la polaridad de residuos en la superficie o la forma de las macromoléculas. Si tales interacciones ocurren en el medio intracelular, se esperaría que éstas afecten algunas de las propiedades fundamentales de las proteínas.

INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

Tipos de Interacción Proteína-Proteína.

Se ha propuesto que hay dos tipos de interacciones proteína-proteína, las obligadas y las no obligadas (Nooren *et al.*, 2003). Cuando las interacciones proteína-proteína son *obligadas*, los protómeros no se encuentran como estructuras estables por sí solas, generalmente su función depende de interacción; un ejemplo es el homodímero HU en *Bacillus stearothermophilus*. Muchas interacciones hetero-oligoméricas son *no obligadas*, dado que los protómeros pueden existir independientemente, un ejemplo son algunos complejos de señalización, interacción antígeno-anticuerpo, receptor-ligando o enzima-inhibidor.

Las interacciones proteína-proteína también se pueden diferenciar dependiendo del tiempo que permanece el complejo. Una interacción *permanente* usualmente es estable y solamente existe en forma de complejo. A su vez, una interacción *temporal* implica la asociación y disociación del complejo; generalmente es relativamente débil y permite un equilibrio dinámico en solución, donde la interacción se rompe y se forma continuamente. Un ejemplo de interacciones temporales son las proteínas G, un complejo heterotrimérico estable al unirse a GDP, el cual se disocia en las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ en presencia de GTP. Es importante mencionar, que la formación y estabilidad de interacciones proteína-proteína dependen de las condiciones fisiológicas y del ambiente, es decir una interacción puede ser temporal, pero volverse permanente bajo ciertas condiciones celulares.

Formación de Interacciones Proteína-Proteína.

Se pueden identificar tres factores que ayudan al control de la formación de las interacciones proteína-proteína (Nooren *et al.*, 2003): (i) Localización. Los protómeros pueden asociarse, dependiendo de su co-localización en tiempo y espacio. En la célula, los protómeros pueden co-expresarse o encontrarse en el mismo compartimiento celular; cuando esto no es así, la difusión o transporte de los protómeros son esenciales. (ii) La concentración de los protómeros también es importante. Algunos mecanismos que alteran la concentración local de proteína incluyen: la expresión de genes, niveles de secreción, degradación de proteínas, difusión y viscosidad del medio. El anclaje de proteínas a membranas o a otro complejo estructural puede ayudar al incremento en la concentración local de proteína. (iii) En estos procesos, las condiciones fisiológicas del medio también juegan un papel primordial. La afinidad de un complejo se puede alterar por la presencia de iones o moléculas efectoras que existen en el medio como el Ca^{2+} o el ATP; además, podría verse afectada por cambios de pH, temperatura o modificaciones post-traduccionales como por ejemplo la fosforilación de proteínas.

INTERACCIONES PROTEÍNA-MEMBRANA BIOLÓGICAS

Membrana Lipídica y Proteínas Periféricas.

Los procesos celulares involucran un complejo arreglo de interacciones proteína-proteína y proteína-membrana biológica. Múltiples proteínas citoplásmicas se unen de manera reversible a la membrana celular, por ejemplo; en la transducción de señales y en el tráfico de membranas. A estas proteínas, se le conoce como proteínas periféricas y utilizan diferentes estrategias para interactuar reversiblemente con las membranas biológicas. Algunas pueden tener uno o más dominios especializados para la unión a membrana, como por ejemplo los dominios PH, FYVE o C1 (Cho W, *et al.*, 2005). Otras proteínas tienen lípidos unidos covalentemente que sirven de anclaje a la bicapa lipídica y otras utilizan una parte de su superficie molecular o estructuras de carácter anfipático.

Gracias a la cristalización líquida de la bicapa 1,2-dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfolina (Wiener M *et al.*, 1992) se sabe que la bicapa lipídica tiene una estructura polarizada que consiste en un núcleo central de hidrocarburos flanqueado por dos regiones interfaciales. La región interfacial representa el 50 % del ancho de cada capa y presenta heterogeneidad en términos de composición química y polaridad. Es la polaridad de la región interfacial la que permite a las diferentes proteínas interactuar con la membrana.

La localización de las proteínas periféricas en la membrana (**figura 2**), se puede clasificar en tres grupos: (i) Proteínas tipo-S: Que se localizan en la superficie de la membrana, en la región interfacial (fuera del nivel de los grupos fosfatos) que interactúan predominantemente con las cabezas polares. (ii) Proteínas tipo-I: Este tipo de proteínas se localiza en la zona de residencia de los fosfatos. (iii) Proteínas tipo-H: Estas penetran al núcleo de hidrocarburos en la bicapa lipídica (Cho W *et al.*, 2005).

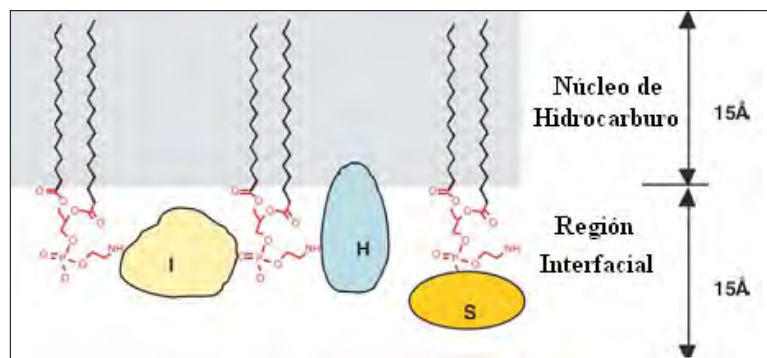


Figura 2. Estructura de la bicapa de fosfolípidos y localización de proteínas periféricas. (Cho W & Stahelin RV, 2005)

Las Interacciones Proteína-Membranas Biológicas.

Debido a que todas las membranas intracelulares contienen lípidos aniónicos y la mayoría de las proteínas periféricas, tienen superficies catiónicas, la unión a la membrana lipídica involucra interacciones electrostáticas. Se ha reportado que las interacciones no específicas, aunque muchas veces no sean suficientes para anclar una proteína a la membrana, son necesarias para el encuentro proteína-lípido y la función de proteínas periféricas (Murray D *et al.*, 2002). Las interacciones no específicas favorecen que residuos de superficie, tanto hidrofóbicos como aromáticos, penetren

en la interfase y en el núcleo de hidrocarburos, permitiendo posteriormente la formación de interacciones específicas. Por lo tanto, estos dos tipos de interacciones no son mutuamente excluyentes, sino que las interacciones electrostáticas no específicas preceden a las específicas e incrementan la energía de unión de las proteínas.

LAS INTERACCIONES ESPECÍFICAS ENTRE PROTEÍNAS RELACIONADAS TIENEN UNA FUNCIÓN METABÓLICA.

La fisiología celular depende de las interacciones macromoleculares (Srere, 2000), las cuales permiten la formación de complejos protéicos y el secuestro de intermediarios aumentando la eficiencia del sistema metabólico (**figura 3**). Las interacciones proteína-proteína que ocurren en la matriz mitocondrial se han estudiado extensamente (Srere, 1987). Uno de los primeros experimentos que demostraron la interacción secuencial de las enzimas del ciclo de Krebs, fue la interacción específica de la enzima citrato sintasa con la malato deshidrogenasa en presencia de PEG (Halper L *et al.*, 1977). Se conocen otras interacciones específicas que ocurren durante el ciclo: la interacción entre la piruvato deshidrogenasa-citrato sintasa (Sümegi B *et al.*, 1980), malato deshidrogenasa-fumarasa (Beeckmans T, 1981) y citrato sintasa-aconitasa (Tyiska *et al.*, 1986), entre otras.

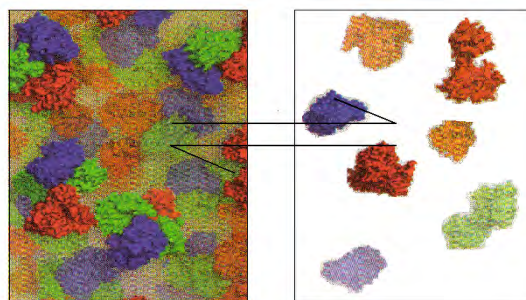


Figura 3. La dilución del contenido celular favorece la disociación de multicomplejos. En el ambiente concentrado del citosol se forman complejos multienzimáticos (no covalentes) que permiten el transporte eficiente de los productos. Al diluir el contenido celular se rompen los niveles de organización favoreciendo la disociación de interacciones entre proteína-proteína o proteína-estructura celular (Nelson y Cox, 2008).

Spivey y su grupo, demostraron que ocurre la canalización de oxaloacetato entre la malato deshidrogenasa y la citrato sintasa, por medio de un sistema de aspartato amino transferasa que secuestra el oxaloacetato libre. Cuando la citrato sintasa y la malato deshidrogenasa se encuentran libres en solución, la aspartato amino transferasa secuestra el oxaloacetato libre impidiendo la formación de citrato. Sin embargo, cuando la citrato sintasa y malato deshidrogenasa se encuentran en presencia de PEG, no se observa el secuestro de oxaloacetato por la aspartato amino transferasa y la síntesis de citrato se inhibe poco (Datta A *et al.*, 1985). Un modelo de la estructura de la malato deshidrogenasa y citrato sintasa fusionada, muestra que ambos sitios activos se encuentran a una distancia de aproximadamente 60 Å, sugiriendo la existencia de un túnel electrostático que facilita la difusión del oxaloacetato, cargado negativamente, de sitio activo a sitio activo (Elcock *et al.*, 1997).

Se ha reportado que la enzima glucolítica, triosafosfato isomerasa (TIM) interactúa con estructuras intracelulares (Walsh *et al.*, 1989; Knull H *et al.*, 1992; Orosz *et al.*, 2000; Orosz *et al.*, 2001) y proteínas. Particularmente, se reportó que la TIM junto con la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la piruvato cinasa forma un complejo con el canal de K_{ATP} , regulando la actividad del canal, alterando los niveles de ATP en el microambiente del mismo (Dhar-Chowdhury *et al.*, 2005).

LAS INTERACCIONES NO ESPECÍFICAS ENTRE PROTEÍNAS NO RELACIONADAS INCREMENTAN LA ESTABILIDAD Y FORMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Rodríguez-Almazán *et al.* (2007) encontraron que ocho proteínas, de diferente peso molecular y punto isoeléctrico, al interactuar con la enzima triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (*TbTIM*), desnaturalizada por Gdn HCl, aumentan la reactivación de la enzima, debido a que las ocho proteínas inducen la estabilidad de la *TbTIM* (**figura 4**). En el trabajo se discute que la interacción que ocurre entre la *TbTIM* y las ocho proteínas no relacionadas es relativamente inespecífica, es decir, esta interacción es distinta a la interacción proteína-ligando o proteína-proteína que ocurre en las reacciones de transducción de señales. Se hace notar que en la vía de reactivación de la *TbTIM*, las proteínas interactúan preferentemente con el dímero, ya que si no fuera así, no se formarían dímeros activos. La preferencia por un tipo de

conformación demuestra un cierto nivel de especificidad. Estos datos sugieren que las numerosas interacciones proteína-proteína que ocurren en el medio intracelular son fundamentales para la estabilización y formación de las enzimas.

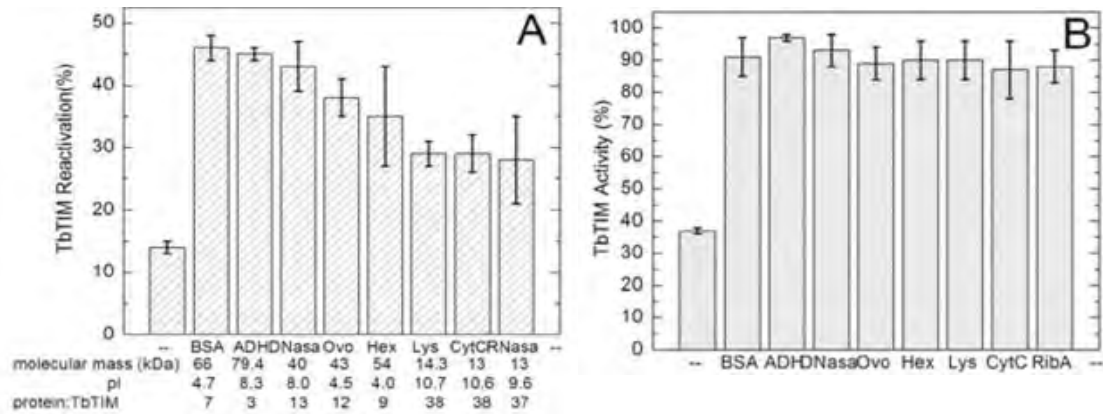
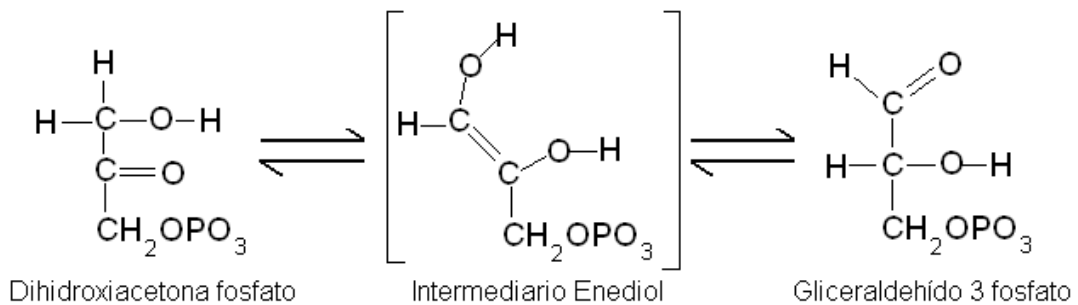


Figura 4. Efecto de diferentes proteínas en la formación y estabilización del dímero de *TbTIM*. **A.** Reactivación de *TbTIM* en ausencia y presencia de 19 $\mu\text{g/ml}$ de diferentes proteínas. Con las proteínas de mayor masa se obtiene mayor reactivación. **B.** La *TbTIM* nativa se incubó en presencia y ausencia de 19 $\mu\text{g/ml}$ de diferentes proteínas. Todas las proteínas estabilizan al dímero (Rodríguez-Almazán *et al.*, 2007). BSA: Albumina de suero de bovino; ADH: alcohol deshidrogenasa; DNasa: deoxiribonucleasa; Ovo: ovoalbúmina; Hex: hexocinasa; Lys: lisozima; CytC: citocromo; RNasa: ribonucleasa.

ENZIMAS MODELO

Triosafosfato Isomerasa (TIM).

La TIM es una enzima glucolítica, que cataliza la isomerización reversible de gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a través del intermediario cis-enediol (Knowles J, 1991).



El gliceraldehído 3-fosfato (G3P) es de las dos triosas (G3P y DHAP), la única que continúa la glucólisis para obtener piruvato y ATP. La TIM se encuentra en todas las especies y está presente en todos los tejidos. Su deficiencia en humanos es causa de anemia crónica y daño neuromuscular.

Características Estructurales y Mecanismo Catalítico de la TIM.

La TIM es un homodímero, conformado por dos subunidades de aproximadamente 27 a 28 kDa (**figura 5A**). Tiene una estructura de barril α/β , uno de los plegamientos más comunes en las proteínas. Consiste de 8 hebras β rodeadas de 8 hélices α unidas entre sí por asas. Las hebras β se componen de aminoácidos de carácter hidrofóbico que se localizan en el interior del barril y que a su vez están rodeadas por α hélices de carácter anfipático (Nagano N *et al.*, 2002).

Aún cuando cada monómero contiene los aminoácidos que forman el sitio activo, la TIM es catalíticamente activa únicamente en su conformación dimerica (Waley S, 1973; Casal *et al.*, 1987). No se ha reportado evidencia de cooperatividad o alosterismo entre subunidades. En los contactos entre las dos subunidades del dímero de TIM, participa de manera predominante el asa 3 o asa de interfase (residuos 71-78),

que se extiende de una subunidad a la hendidura cercana al sitio activo de la otra subunidad, ocasionando que los sitios activos e interfases se encuentren cercanos.

Los residuos catalíticos de la *TbTIM* son la Lys¹³, His⁹⁵ y Glu¹⁶⁵, estos residuos son los encargados de unir al sustrato (**figura 5B**). La Lys¹³ es el residuo responsable de la especificidad por los sustratos naturales (G3P y DHAP) y varios análogos del sustrato que existen en forma fosforilada (Belasco J *et al.*, 1978) ya que la carga positiva de la Lys permite la unión del sustrato al sitio activo (Lodi P *et al.*, 1994). El Glu¹⁶⁵ e His⁹⁵ actúan como ácidos y bases generales, el Glu¹⁶⁵ se localiza de manera ideal (Knowles J, 1991) permitiendo la abstracción de un protón del C1 de DHAP o del C2 del G3P, mientras el anillo imidazol de la His⁹⁵ es un catalizador electrofílico, que polariza al grupo carbonilo del sustrato.

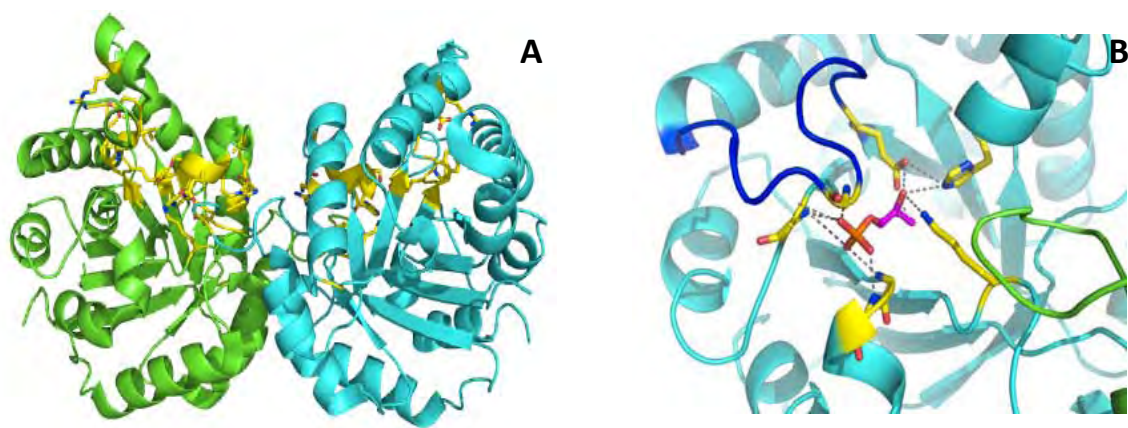


Figura 5. Estructura y sitio catalítico de la TIM. A. En amarillo se muestran los residuos conservados, que corresponden al sitio activo y otros residuos de importancia estructural. Cada monómero tiene un sitio activo. **B.** Residuos catalíticos, Glu¹⁶⁵ cercano al asa 6 (azul oscuro) en conformación cerrada debido a la entrada del sustrato (rojo y magenta), la Lys cercana a la otra subunidad del dímero (verde).

Durante la catálisis, el asa 6 (residuos 170-180) se mueve 7 Å de una posición abierta en ausencia de ligando a una posición cerrada en presencia de sustrato o análogo del sustrato en el sitio activo (Lolis, 1990). El asa 6 impide la entrada de agua al sitio activo y forma un puente de hidrógeno entre la Gly¹⁷⁴ del asa y el grupo fosfato del intermediario, impidiendo la liberación de éste y su descomposición a metilglicoxal y fosfato. Por lo tanto, el asa 6 es responsable de asegurar la conversión eficiente del sustrato al producto y estabilizar al intermediario de la reacción.

Desamidación de la TIM.

Una gran variedad de estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la TIM se desamida de manera espontánea y específica en la Asn⁷¹ y Asn¹⁵ a Asp. La desamidación de la Asn⁷¹ ocurre en la interfase del dímero, en el asa 3, la desamidación de éste residuo en una subunidad lleva a la subsecuente desamidación de la Asn¹⁵, localizada a 0.5 nm en la subunidad vecina. Cuando éstos residuos se desamidán, se introduce un par de cargas negativas en la interfase, afectando la estabilidad de la enzima, disociando y desplegando a las subunidades (Gracy W *et al.*, 1995). Estos cambios conformacionales incrementan la susceptibilidad de la enzima a ser proteolisada.

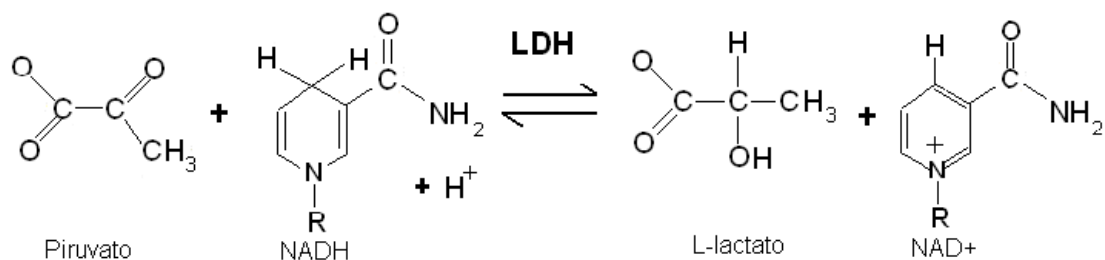
Estudios *in vivo* realizados en diferentes células y tejidos, revelan el incremento de isoformas desamidadas durante el envejecimiento (Turner B, 1975; Gracy *et al.*, 1985; Tollefsbol *et al.*, 1982). En células jóvenes, las isoformas son reconocidas y degradadas, mientras que en células viejas la isoforma desamidada no es fácilmente reconocida y degradada favoreciendo su acumulación (Gracy R., 1995).

Se ha reportado que los cambios conformacionales que sufre el asa 6, cuando se une un ligando al sitio activo, incrementa la desamidación de la Asn⁷¹ (Sun *et al.*, 1992). Es decir, entre mayor sea el número de eventos catalíticos, mayor será la desamidación y degradación.

Lactato Deshidrogenasa (LDH).

Un claro ejemplo de isoenzimas es la lactato deshidrogenasa (LDH); las isoenzimas se derivan de distintos genes que se traducen a proteínas con secuencias y actividades similares, pero cada una con propiedades cinéticas y de regulación.

La LDH pertenece a la familia de las oxidoreductasas que simultáneamente y estereoespecíficamente, interconvierte el piruvato en lactato y el NADH en NAD⁺.



Esta reacción, participa en la fermentación anaeróbica homoláctica, y forma parte importante en la regeneración de NAD^+ , permitiendo la continuación de la vía glucolítica.

La mayoría de los mamíferos expresan varias isoenzimas de LDH, las dos formas principales son la forma M (M_4 -LDH) que se localiza en músculo esquelético e hígado y la forma H (H_4 -LDH) que predomina en músculo cardíaco. Un tercer tipo conocido como la forma X, se presenta únicamente en testículo. La identidad entre los aminoácidos de la forma M y H es alta (aproximadamente 75%), sin embargo existen diferencias en sus propiedades cinéticas. Por ejemplo a pH de 6.0, la especie M_4 muestra una K_M para el piruvato alrededor de 3-10 veces mayor que la forma H_4 . Debido a que la estructura de las isoenzimas M y H se encuentran altamente conservadas es posible la formación de híbridos entre éstas (H_4 , MH_3 , M_2H_2 , M_3H Y M_4 (Clarke A *et al.*, 1998).

Se ha cristalizado la LDH de varios organismos incluyendo *Bacillus stearothermophilus* (Piontek *et al.*, 1990), *Bifidobacterium longum* (Iwata *et al.*, 1993), *Plasmodium falciparum* (Dunn *et al.*, 1996), cerdo (Grau *et al.*, 1981) y humano (Read *et al.*, 2000).

Características Estructurales y Mecanismo Catalítico de la LDH.

La enzima LDH es un tetrámero formado por cuatro subunidades de aproximadamente 35 kDa, donde cada subunidad es capaz de unir una molécula de coenzima. **(figura 6A)**. El monómero consta de: un dominio grande con plegamiento tipo "Rossmann", sitio de unión al cofactor y otro dominio con plegamiento α/β donde se localiza el sitio de unión al sustrato. Éste último dominio consiste en 4 hebras β y 3 hélices α , mientras que el dominio grande está formado por 6 hebras β paralelas entre sí y en posición central, flanqueadas por 3 hélices en cada lado. Al final de éstas 6 hebras β se une el cofactor por medio de los residuos His^{195} , Asp^{168} , Arg^{171} y Thr^{246} , residuos que contribuyen en la geometría catalítica del sitio activo **(figura 6B)**. La cavidad a la que se une el sustrato se localiza en la interfase de los dos dominios.

La unión del sustrato al sitio activo ocurre de manera ordenada, posterior a la formación del complejo binario LDH/NADH. La unión del sustrato ocurre dentro de una cavidad, que provee la His^{195} y la Arg^{171} ; esta última solvata la carga del carboxilo

cargado del sustrato (Deng *et al.*, 1994). Una vez que el sustrato se posiciona sobre el sitio activo, el “asa móvil”, se cierra sobre la entrada del sitio activo y la Arg¹⁰⁹ del “asa móvil” forma un puente de hidrógeno con el sustrato; el agua abandona la cavidad, seguido de un cambio conformacional, de tal forma que el piruvato y el NADH quedan en una geometría adecuada para la reacción catalítica (Deng *et al.*, 1994; McClendon *et al.*, 2005). Se considera que el cierre del “asa móvil” sobre la cavidad del sitio activo es el paso limitante de la catálisis, ocurriendo en un tiempo de ~1-10 ms (Dunn *et al.*, 1991).

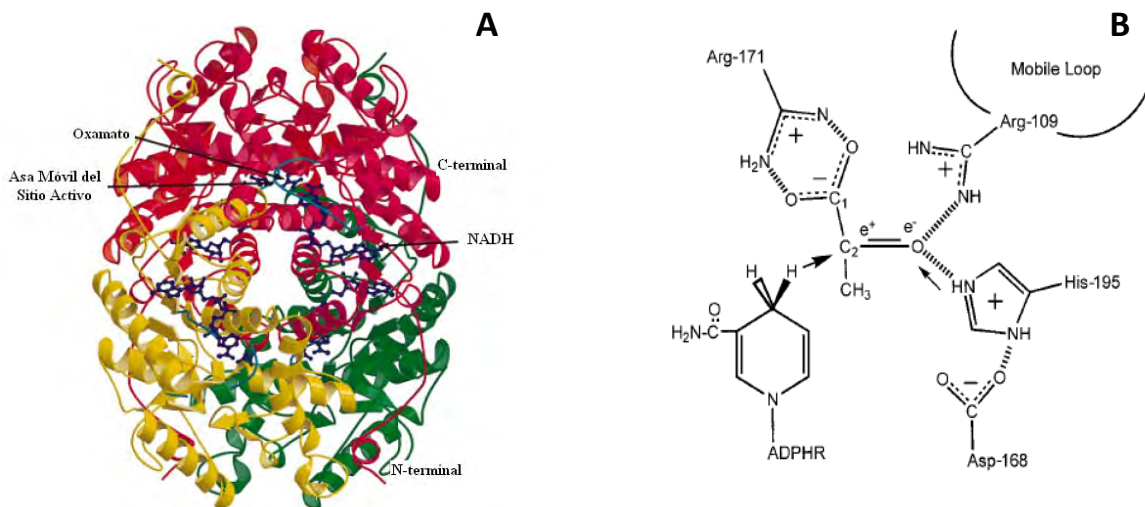


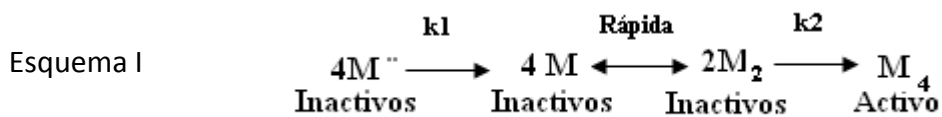
Figura 6. Estructura y sitio catalítico de la LDH. **A.** Estructura tetramérica de la LDH de humano, el cofactor y el análogo del sustrato (oxamato) se muestran en azul. El NH₂-terminal formado de 20 aminoácidos, se encarga de envolver a la subunidad adyacente. **B.** Arreglo de los grupos que reaccionan con el sustrato en el sitio activo. La catálisis se resume de la siguiente manera: 1) Se une el cofactor NADH y ocurre la formación de interacciones que permitan posicionar correctamente el hidrógeno del C₄ del NADH al C₂ del sustrato; 2) estabilización de cargas negativas del oxígeno de la cetona del sustrato que surgen en estado de transición, por cargas electrostáticas con la His¹⁹⁵ y Arg¹⁰⁹. Éste último residuo está en el asa móvil; 3) catálisis ácido/base, facilita la transferencia de un protón entre la His¹⁹⁵ y el oxígeno del sustrato. La His¹⁹⁵ protonada se estabiliza por el Asp¹⁶⁸ (Mc Clendon *et al.*, 2005).

Plegamiento de la LDH.

Todas las funciones y actividades biológicas requieren que sus proteínas se plieguen en estructuras apropiadas y ensamblen en complejos específicos para llevar a cabo sus actividades biológicas. El plegamiento de las proteínas es un proceso de múltiples pasos que resulta en la estructura de menor energía libre.

Anfinsen (1961) demostró que la ribonucleasa pancreática de bovino puede renaturalizarse espontáneamente a partir de una proteína desnaturalizada: es decir la estructura tridimensional de una proteína depende de la estructura primaria y de las interacciones con el medio fisiológico. La ruta de plegamiento para cada proteína es distinta, sin embargo la formación de estructuras nativas está gobernada por las mismas interacciones físicas.

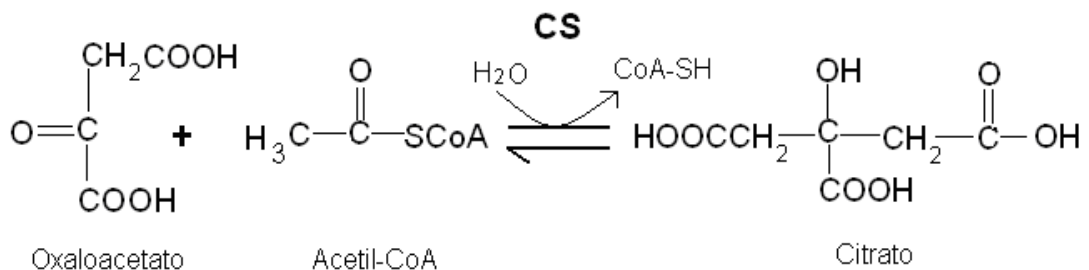
Utilizando experimentos de entrecruzamiento en LDH, se ha demostrado que la formación del dímero ($2M \leftrightarrow M_2$) es la reacción predominante en la vía de plegamiento de la LDH, indicando que los intermediarios representan la población predominante en condiciones de baja concentración de proteína o baja concentración de desnaturalizante (Jaenicke, 1987).



Se ha demostrado que en la vía de reconstitución, tanto el monómero como el intermediario dimérico son catalíticamente inactivos, la asociación del monómero estructurado (4M) al dímero (2M₂) es rápida y la dimerización del dímero (2M₂ → M₄) se acompaña de un incremento de actividad catalítica (Jaenicke, 2000).

Citrato Sintasa (CS)

La CS es una enzima que se encuentra en la mayoría de los seres vivos y juega un papel clave en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Cataliza la condensación de acetil-CoA con oxaloacetato, para formar citrato; es la única enzima del ciclo de Krebs que puede catalizar la formación de un enlace carbono-carbono.



El citrato, además de ser un sustrato para el ciclo de Krebs, es un donador del grupo acetilo para la formación de acetil-CoA, esta reacción se lleva a cabo gracias a la enzima ATP-citrato-liasa. En células eucarióticas animales, la enzima se localiza en la matriz mitocondrial, se codifica en el DNA nuclear, se traduce en el citoplasma como precursor y finalmente se transporta a la mitocondria (Alam *et al.*, 1982; Harmey *et al.*, 1979; Wiegand *et al.*, 1986). La CS de corazón de cerdo es un dímero, cada subunidad está formada por 437 aminoácidos (aa) y tiene un peso molecular de 48.9 kDa (Bloxham *et al.*, 1981). Cada subunidad tiene un sitio activo donde se une el oxaloacetato y la acetil-CoA, la cual es funcionalmente independiente del sitio activo de la subunidad vecina; no se ha observado cooperatividad (Johansson *et al.*, 1974). En presencia de oxaloacetato su resistencia a agentes desnaturizantes y a cortes proteolíticos aumenta.

Características Estructurales y Mecanismo Catalítico de la CS.

De los 437 aminoácidos que forman la subunidad de la CS el 75 % se encuentra en segmentos α -hélice, el resto de la estructura consiste en segmentos irregulares y pequeñas hebras β formadas de 13 aminoácidos. Cada subunidad consiste de dos dominios: un dominio grande formado por 15 α -hélices, donde las hélices F,G,M y L son las encargadas del contacto entre subunidades y un dominio pequeño formado de 5 α hélices (N,O,P,Q y R) (**figura 7A**).

Gracias a la cristalización por difracción de rayos-X en presencia de sustratos e inhibidores se ha observado que el oxaloacetato, el primer sustrato en unirse a la enzima, induce un gran cambio conformacional que favorece la unión del segundo sustrato, la acetil-CoA. La unión de sustratos provoca la rotación del dominio pequeño en relación al dominio grande. Posterior a la formación de citril-CoA en el sitio activo, ocurre el segundo cambio conformacional que induce la hidrólisis del tioester, liberando CoA-SH (**figura 7B**).

La catálisis se puede dividir en tres reacciones: (i) enolización del grupo tioester del acetil-CoA por la abstracción de un protón del grupo acetilo para formar enolato (Buckel *et al.*, 1969); (ii) condensación del anión enolato con el grupo carboxilo del oxaloacetato formando citril-tioester (Eggerer *et al.*, 1963); (iii) hidrólisis del citril-tioester para la formación de citrato y coenzima A (Eggerer *et al.*, 1964) (**figura 7C**).

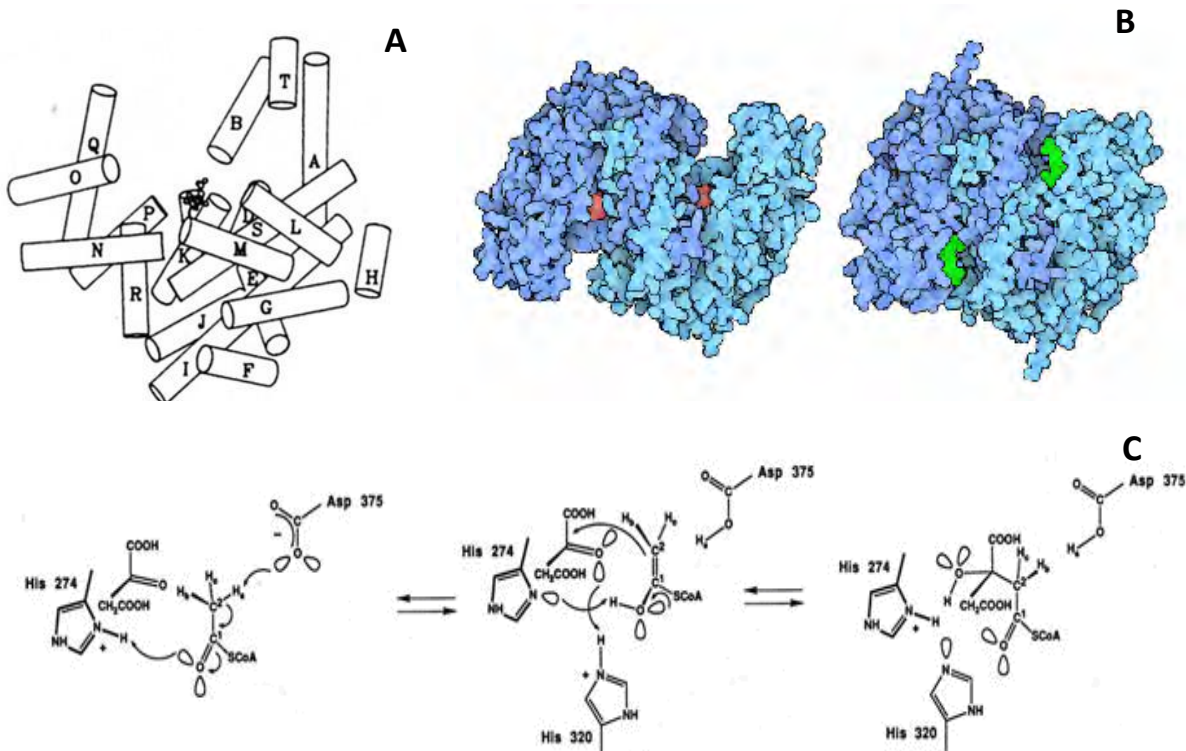


Figura 7. Estructura y sitio catalítico de la CS. **A.** Empaquetamiento de α -hélices (Wiegand & Remington, 1986) **B.** En la izquierda se muestra la CS de porcino en su conformación abierta en presencia de citrato (rojo), a la derecha la CS en conformación cerrada en presencia de ambos sustratos (verde) (Remington *et al.*, 1982); **C.** El Asp³⁷⁵ abstrae un protón del grupo metilo del acetil-CoA formando enolato, el enolato se estabiliza por medio de la protonación por la His²⁷⁴. El enolato se reorganiza para atacar al carbono del carbonilo del oxaloacetato y la His²⁷⁴ abstrae el protón que previamente había donado. La His³²⁰ actúa como un ácido general. El resultado es la formación de citril-CoA por medio de una reacción de condensación. Finalmente, se hidroliza el tioéster regenerando CoA-SH y produciendo citrato (Remington *et al.*, 1990).

OBJETIVOS

Este trabajo tiene tres objetivos principales:

- 1) Determinar el papel de las interacciones proteína-proteína en la reactivación y estabilidad de las estructuras nativas de la lactato deshidrogenasa (LDH) y citrato sintasa (CS).
 - a) Determinar el efecto de diferentes proteínas con distinto peso molecular y punto isoeléctrico en la estabilidad y reactivación de la LDH y CS.
 - b) Determinar si el efecto de estabilización de la LDH, por la interacción de diferentes proteínas, es aditivo.

- 2) Determinar si la interacción proteína-proteína de las enzimas LDH y CS con la *TbTIM* afecta la desamidación de esta última.

- 3) Determinar el papel de las interacciones proteína-membranas biológicas de tipo no específico en la estabilidad del dímero de la TIM de distintas especies. Las membranas biológicas que se utilizaron en este trabajo son: vesículas invertidas de eritrocito de humano; también se emplearon liposomas.
 - a) Determinar la unión de *TbTIM* a vesículas invertidas y a liposomas.
 - b) Caracterizar la interacción de *TbTIM* a las vesículas invertidas. Se estudiará si la unión de *TbTIM* a vesículas es saturable y si la unión es de naturaleza electrostática.
 - c) Determinar la unión de TIMs de diferentes especies a vesículas invertidas.
 - d) Determinar si la ocupación por sustrato o inhibidor competitivo del sitio activo de la *TbTIM* altera su capacidad de unión a las membranas biológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Proteínas:

TIMs. Las TIMs de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM) y de músculo de conejo (*Oryctolagus cuniculus*, OcTIM) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La sobre-expresión y purificación de las TIMs de *Trypanosoma brucei* (TbTIM), *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), *Leishmania mexicana* (LmTIM), *Giardia lamblia* (GtTIM), *Homo sapiens* (HsTIM) se realizó según la literatura (Borchet *et al.*, 1993; Ostoa-Saloma *et al.*, 1997; Kohl *et al.*, 1994; López-Velázquez *et al.*, 2003, Rodríguez-Almazán *et al.*, 2008, respectivamente.) Después de su purificación todas las enzimas se mantuvieron a 4°C como precipitado en 70% de saturación de sulfato de amonio diluido en amortiguador que contenía 100 mM de trietanolamina (TEA), 10 mM de EDTA y 1 mM de ditioneitol (DTT) a pH de 7.4; este amortiguador se llamará TED. Para los experimentos, la suspensión se centrifugó a 8 000 rpm durante 10 minutos y la pastilla se disolvió en amortiguador TED y se dializó contra el mismo amortiguador a 4°C.

LDH. La LDH de músculo de porcino se obtuvo de Roche Diagnostics, esta enzima se encuentra en una suspensión 3.2 M de sulfato de amonio a un pH aproximado de 6.5. Para los experimentos, se centrifugó la suspensión a 5 000 rpm durante 15 minutos, se recuperó la pastilla y se diluyó en amortiguador que contenía: 0.1 M de fosfato de sodio monobásico, 10 mM de EDTA y 1 mM de DTT, se referirá para fines prácticos como amortiguador estándar. Se dializó contra el mismo amortiguador a 4°C.

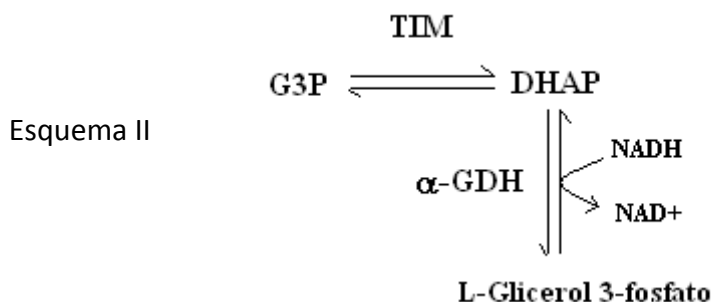
CS. La CS de corazón de porcino se obtuvo de Sigma Aldrich, la enzima se encuentra en una suspensión 2.2 M de sulfato de amonio a un pH de 7. Para los experimentos, se centrifugó la suspensión a 5 000 rpm durante 15 minutos, se recuperó la pastilla y se diluyó en amortiguador que contenía 0.1 M de Tris-HCl a un pH de 7.4. Se dializó contra el mismo amortiguador a 4°C.

La albúmina de suero de bovino fracción V, se compró de la compañía Sigma.

Actividad enzimática. Los ensayos de actividad se midieron en un espectrofotómetro UV-Visible (Varian) a 25 °C. La actividad enzimática específica se expresó en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

TIMs. La reacción se inició con la adición de TIM, generalmente 5 ng, en 1 ml de mezcla de reacción que contenía: amortiguador TED, 1 mM de gliceraldehído-3-fosfato

(G3P), 0.2 mM de NADH (Roche Diagnostics) y 0.9 unidades de glicerolfosfato deshidrogenasa (α -GDH) a un pH de 7.4. La actividad se determinó en la dirección de G3P a DHAP, este último se acopló a la enzima α -GDH, seguido por la oxidación del NADH a NAD^+ (Rozacky *et al.*, 1971) (Esquema II). La velocidad de producción de DHAP es equivalente a la velocidad de oxidación del NADH que se produce por una disminución en la absorbencia a 340 nm ($\epsilon_{340}=6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).



LDH. La reacción se inició con la adición de 50 ng de LDH a 1 ml de mezcla que contenía: amortiguador estándar, 0.74 mM de ácido pirúvico (Sigma-Aldrich) y 0.2 mM de NADH (Roche Diagnostics) a un pH de 7.4 (Jaenicke *et al.*, 1979). Al igual que en la reacción enzimática de la TIM, se mide la velocidad de oxidación del NADH a NAD^+ .

CS. La reacción se inició con la adición de 75 ng de CS a 1 ml de mezcla que contenía: amortiguador 0.1 M Tris-HCl, 0.2 mM de acetil-CoA (Sigma-Aldrich), 0.5 mM de oxaloacetato (Sigma Aldrich) y 0.1 mM de 5,5-ditiobis (2-nitro-ácido benzóico, DTNB) de Sigma Aldrich. La citrato sintasa cataliza la conversión de oxaloacetato + acetil-CoA \rightarrow citrato + CoA-SH, este último producto se acopló a la reducción de DTNB a TNB^{2-} ; el cual absorbe a 412 nm. (Margunov *et al.*, 1998). El progreso de la reacción se siguió midiendo el incremento en la absorbencia.

Determinación de la concentración de proteína. La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 nm. En todas las determinaciones de proteína se consideró el coeficiente de extinción molar de cada enzima ($\text{Abs}_{280}^{0.1\%}=\text{g/L}$), siendo para *Tb*TIM 1.3 g/L, *Tc*TIM 1.34 g/L, *Lm*TIM 1.35g/L, *Sc*TIM 0.954 g/L, *Qc*TIM 1.26 g/L, *G*TIM 0.954 g/L, LDH de músculo de cerdo 1.4 g/L y CS de corazón de porcino 1.76 g/L. Para la determinación de proteína de vesículas invertidas se utilizó el método de Bradford a una longitud de onda de 595 nm.

Desnaturalización y reactivación de LDH. La LDH se desnaturalizó incubando 500 µg/ml de proteína en 6 M de hidrocloreuro de guanidina (Gdn HCl)/amortiguador estándar a 25°C durante 15 minutos. Para la reactivación se tomaron alícuotas de la mezcla anterior y se diluyeron hasta 1 µg/ml en la mezcla de reactivación que contenía: amortiguador estándar (sin desnaturalizante), con y sin las proteínas por estudiar. Después de la dilución se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se determinó actividad.

Estabilidad de la LDH y CS. Se incubaron diferentes concentraciones de LDH y CS (0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2.5 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml) en amortiguador estándar y Tris 0.1M, respectivamente, a 25°C durante 24 horas. Cada una de las concentraciones se incubó en ausencia y presencia de otra proteína, generalmente 50 µg/ml. La LDH se incubó con las siguientes proteínas: CS, *TbTIM*, *HsTIM*, *ScTIM* y BSA, mientras que la CS se incubó en presencia de la LDH y *TbTIM*. Al término de la incubación se midió actividad.

Desamidación de *TbTIM*. Se incubaron 200 µg/ml de *TbTIM* en presencia y ausencia de 1 mg/ml de LDH y CS en un amortiguador que contenía: TEA 50 mM y 5 mM de EDTA a un pH de 9, al que llamaremos TE 50 mM. Este ensayo se realizó en ausencia y en presencia de 0.2 mM de G3P y la incubación tuvo una duración de 12 horas a una temperatura de 36.5°C. Con el objeto de no afectar el pH final de la mezcla, la LDH y la CS se dializaron en amortiguador TE 50 mM. Al término de la incubación se cargaron 10 µg de *TbTIM* en un gel nativo.

Identificación de la desamidación de la *TbTIM*. La desamidación de la *TbTIM*, se identificó por medio de una electroforesis, con los polos invertidos, en geles nativos de acrilamida al 10 %, utilizando un sistema continuo de amortiguadores. El amortiguador que se utilizó fue: imidazol 153 mM y Hepes 400 mM a pH de 7; el pH neutro del amortiguador permite que la *TbTIM* (pI de 9.08) adquiera carga positiva y migre hacia el polo negativo o cátodo (-) (Zomosa-Signoret *et al.*, 2003). Las proteínas en el gel se tiñeron con azul de Coomassie.

Preparación de membranas biológicas.

a) Vesículas invertidas de eritrocito de humano. Las vesículas invertidas se prepararon según Steck *et al.*, (1974); esta técnica permite la obtención de vesículas impermeables y libres de citoplasma (**figura 8**). Se obtuvieron a partir de un

hemolisado de eritrocitos de humano que se incubaron durante 18 horas en amortiguador alcalino frío, que contenía 0.5 mM de fosfato de sodio, pH 8.0-8.2. Las vesículas invertidas se separan de las vesículas con la membrana externa expuesta por medio de un gradiente de Dextran (T 500) que se centrifuga durante 2 horas en un rotor SW40 a 40, 000 rpm. Al término de la preparación, se mantuvieron a 4°C durante un máximo de 7 días.

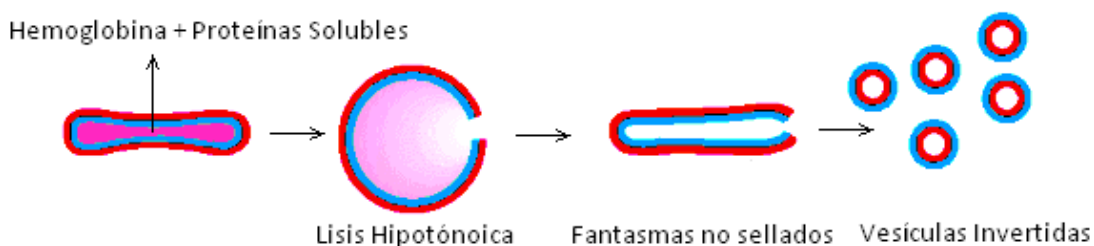


Figura 8. Preparación de vesículas invertidas. Los eritrocitos tienden a romperse en un solo sitio, al romperse se libera el contenido celular dando lugar a la formación de fantasmas no sellados. Las vesículas más pequeñas se forman por medio de la disrupción mecánica de los fantasmas no sellados; la orientación dependerá de la fuerza iónica usada durante la disrupción y el sellado de los mismos (Alberts *et al.*, 2001).

b) Liposomas. Los liposomas se prepararon con asolectina (Fluka, Biochemika) según Hackenbrock *et al.*, (1986). La asolectina contiene proporciones equivalentes de lecitina, cefalina y fosfatidilinositol y, en menor proporción, otros fosfolípidos. Los liposomas se suspendieron en un amortiguador que contenía 20 mM de TEA, 1 mM de EDTA y 1 mM de DTT, para fines prácticos se referirá como amortiguador TED 20 mM, a pH de 7.4. La mezcla se sonicó hasta obtener una mezcla translúcida, posteriormente el pH se ajustó a 7.4. Se mantuvieron a 4°C.

Estabilidad de *Tb*TIM en presencia de vesículas invertidas. Se incubaron diferentes concentraciones de *Tb*TIM nativa (0.1 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.75 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml) en ausencia y presencia de 80 µg/ml de proteína de vesículas invertidas en amortiguador TED 20 mM durante 2 horas a 25 °C. Al término de la incubación se midió la actividad.

Unión de *Tb*TIM a membranas biológicas.

a) Vesículas invertidas. La *Tb*TIM (0.25 y 5 µg/ml) se incubó durante 30 minutos con las vesículas invertidas en amortiguador TED 20 mM. Posteriormente la mezcla se centrifugó por 40 minutos a 28, 000 rpm y se determinó actividad en la

pastilla y sobrenadante. La actividad se expresó en porcentaje, el 100 % de actividad se consideró como la suma de la actividad en la pastilla y en el sobrenadante.

b) Liposomas. La *TbTIM* (5 $\mu\text{g/ml}$) se incubó con 20 μl de liposomas en amortiguador TED 20 mM a un pH de 7.4, durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 40,000 rpm durante 60 minutos y se midió actividad en el sobrenadante y en la pastilla.

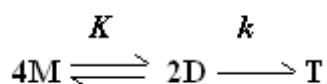
RESULTADOS

Efecto de la *Tb*TIM en la reactivación de la LDH. Rodríguez-Almazán *et al.* (2007) estudiaron el efecto de las interacciones proteína-proteína en la reactivación de la *Tb*TIM en presencia de ocho proteínas diferentes (**figura 4**). Se observó que las ocho proteínas aumentan la reactivación de la *Tb*TIM, posterior a la desnaturalización en 6 M de Gdn HCl. Esto dio la pauta a pensar que en el ambiente celular ocurren numerosas interacciones proteína-proteína y que éstas pueden afectar el plegamiento de las proteínas, desviando el equilibrio de la reacción hacia la conformación activa.

Partiendo de este antecedente, surgió la pregunta sobre si este incremento en la reactivación observado en la *Tb*TIM también ocurría con otra enzima que presentaran diferente grado de oligomerización y características. A continuación se reportarán los resultados obtenidos al reactivar a la enzima LDH en ausencia y presencia de *Tb*TIM y otras proteínas.

Según el esquema III, la reacción de asociación de la LDH es dependiente de la concentración de proteína; a mayor concentración de proteína, mayor será la asociación de los monómeros a dímeros y a tetrámero.

Esquema III

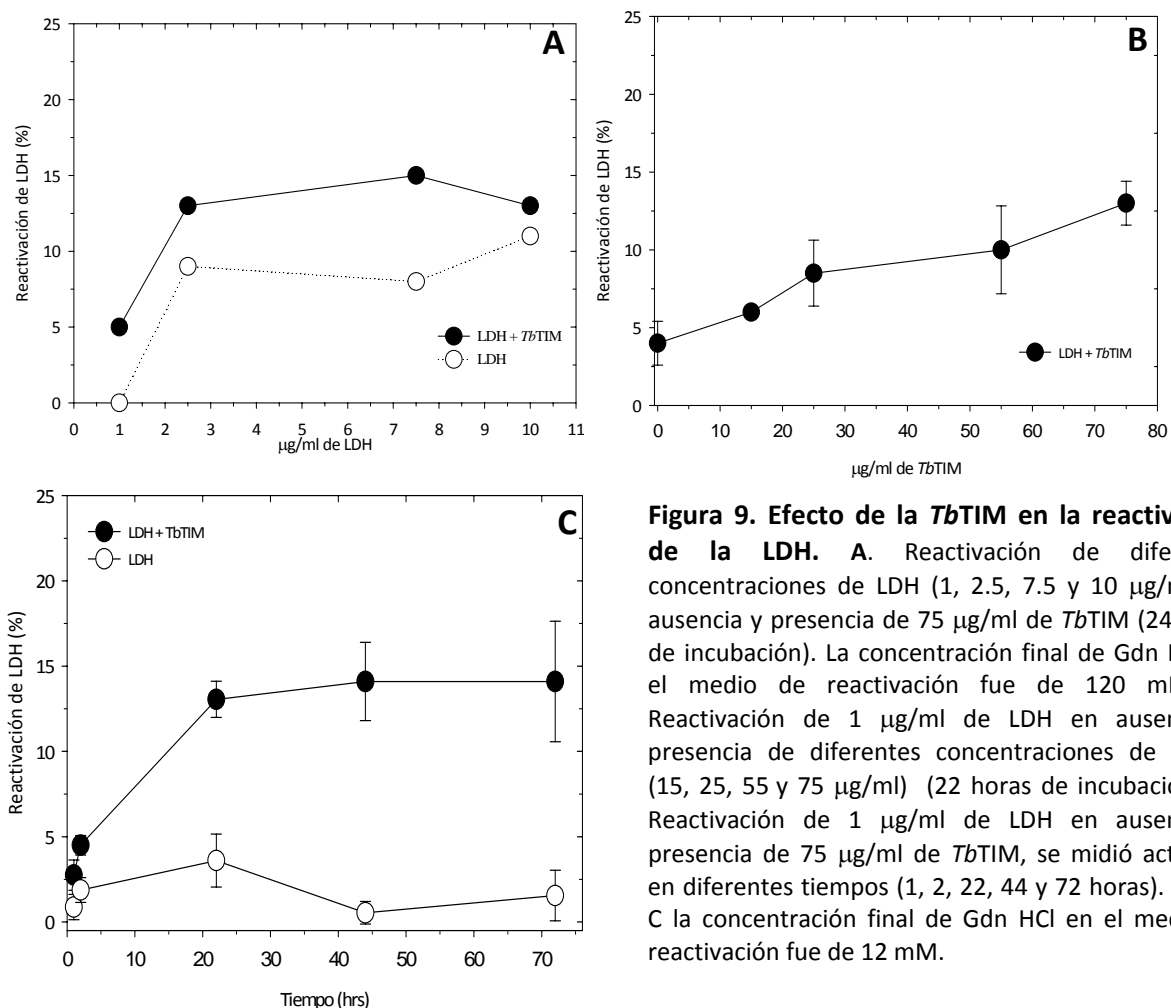


donde M: monómero, D: dímero y T: tetrámero.

Se desnaturalizó a la LDH en 6M de Gdn HCl, posteriormente la concentración de Gdn HCl se diluyó 100 veces, lo que permite la reactivación de la enzima. La reactivación se llevó a cabo a diferentes concentraciones de LDH en el medio de reactivación por 22 horas, al final de las cuales, se determinó la actividad (**figura 9A**). Se observó que a una concentración de 1 µg/ml no hay reactivación de la LDH, sin embargo, al aumentar la concentración de LDH a 2.5 µg/ml y 10 µg/ml aumentó la reactivación un 7 % y 10 % respectivamente. Cuando la reactivación de la LDH se midió en presencia de 75 µg/ml de *Tb*TIM se observó un incremento en la formación de tetrámeros activos: a 1 µg/ml de LDH se observó una reactivación del 5 % mientras que a 2.5 µg/ml y 10 µg/ml se alcanzó una reactivación del 15 %. Se eligió la

concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$ de *TbTIM*, con base en que a esta concentración se obtuvo el valor máximo de reactivación de 1 $\mu\text{g/ml}$ de LDH (**figura 9B**). Posteriormente, se decidió reactivar 1 $\mu\text{g/ml}$ de LDH en presencia y ausencia de 75 $\mu\text{g/ml}$ de *TbTIM* y se determinó la actividad a diferentes tiempos (1, 2, 22, 44 y 72 horas). En ausencia de *TbTIM*, la enzima se reactivó el $\sim 3\%$; en presencia de *TbTIM* la enzima presentó una máxima reactivación a las 22 horas del 13% (**figura 9C**).

Es importante mencionar que la concentración final de Gdn HCl en el medio de reactivación afecta considerablemente la reactivación de la LDH (Zettlmeissl G, *et al.*, 1979). En el caso de la figura 9A, se incubó 1 $\mu\text{g/ml}$ de LDH en presencia de 75 $\mu\text{g/ml}$ de *TbTIM* y 120 mM de Gdn HCl y se observó una reactivación del 5%, mientras que en la figura 9 B y C se incubó 1 $\mu\text{g/ml}$ de LDH en presencia de 75 $\mu\text{g/ml}$ de *TbTIM* y 12 mM de Gdn HCl y se observó una reactivación del 13%. Para confirmar el efecto de la concentración de Gdn HCl en la reactivación de 1 $\mu\text{g/ml}$ LDH, se incubaron diferentes concentraciones Gdn HCl y se encontró que conforme aumenta la concentración del agente caotrópico disminuye la reactivación de la LDH (No se muestra este dato) (Gerd *et al.*, 1979).



Estabilidad de la LDH y CS en ausencia y presencia de otras proteínas. De acuerdo a los resultados anteriores, la presencia de *TbTIM* en el medio de reactivación, favorece la formación del estado nativo de la LDH. Rodríguez-Almazán *et al.*, (2007) reportaron que la reactivación del dímero de *TbTIM* se ve favorecida en presencia de BSA, debido a que la BSA interactúa preferentemente con el dímero y provoca la estabilidad del mismo, favoreciendo el equilibrio de la reacción hacia los dímeros activos. Para estudiar si la reactivación de la LDH en presencia de *TbTIM* se ve favorecida por un mecanismo similar, se incubaron diferentes concentraciones de LDH durante 24 horas, en presencia y ausencia de 75 µg/ml de *TbTIM*; también se ensayó el efecto de la CS a una concentración de 50 µg/ml (**figura 10A**). El tetrámero de LDH se disocia a concentraciones por debajo de su constante de asociación favoreciendo la población de dímeros y monómeros que se encuentran en constante equilibrio. Por lo tanto en estos experimentos se estudió si la presencia de *TbTIM* y CS desvían el equilibrio hacia la formación del tetrámero activo al interactuar con este.

Los resultados indicaron que, en ausencia de *TbTIM* o CS, la actividad específica de la LDH disminuye conforme se reduce la concentración de enzima, mientras que en presencia de *TbTIM* o CS la actividad específica de la LDH se mantuvo al nivel máximo. Esto sugiere que la *TbTIM* y CS estabilizan al tetrámero, favoreciendo el desplazamiento de la reacción hacia la conformación activa (**figura 10A**).

Resultó de interés estudiar si la LDH además de interactuar con la *TbTIM* y CS, tiene la capacidad de interactuar con otras proteínas que poseen distintos puntos isoeléctricos y masas moleculares (**figura 10B**). Para esto se evaluó si la interacción de la LDH con diferentes proteínas afecta la estabilidad del tetrámero. Se incubaron durante 24 horas 0.5 µg/ml de LDH en presencia de 50 µg/ml de cada proteína, al término de la incubación se determinó la actividad. Las proteínas que se estudiaron fueron: TIMs de diferentes especies (*TbTIM*, *HsTIM* y *ScTIM*), CS de corazón de porcino y albumina de suero de bovino (BSA).

A 0.5 µg/ml de LDH en ausencia de proteínas, se observó que la enzima perdía su actividad. Sin embargo, en presencia de las otras proteínas se observó una pérdida de actividad máxima del 10 %, indicando que la LDH tiene la capacidad de interactuar con varias proteínas y que estas incrementan la estabilidad del tetrámero (**figura 10B**).

Un tercer experimento se realizó, incubando diferentes concentraciones de CS en presencia y ausencia de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *TbTIM* y LDH (**figura 10C**). Al igual que la LDH, a bajas concentraciones de CS se observó pérdida de actividad. Sin embargo, en presencia de *TbTIM* y LDH la actividad de la CS se mantuvo en el nivel máximo, lo que indica que la interacción de las proteínas con la CS desvía el equilibrio hacia la formación de dímeros activos.

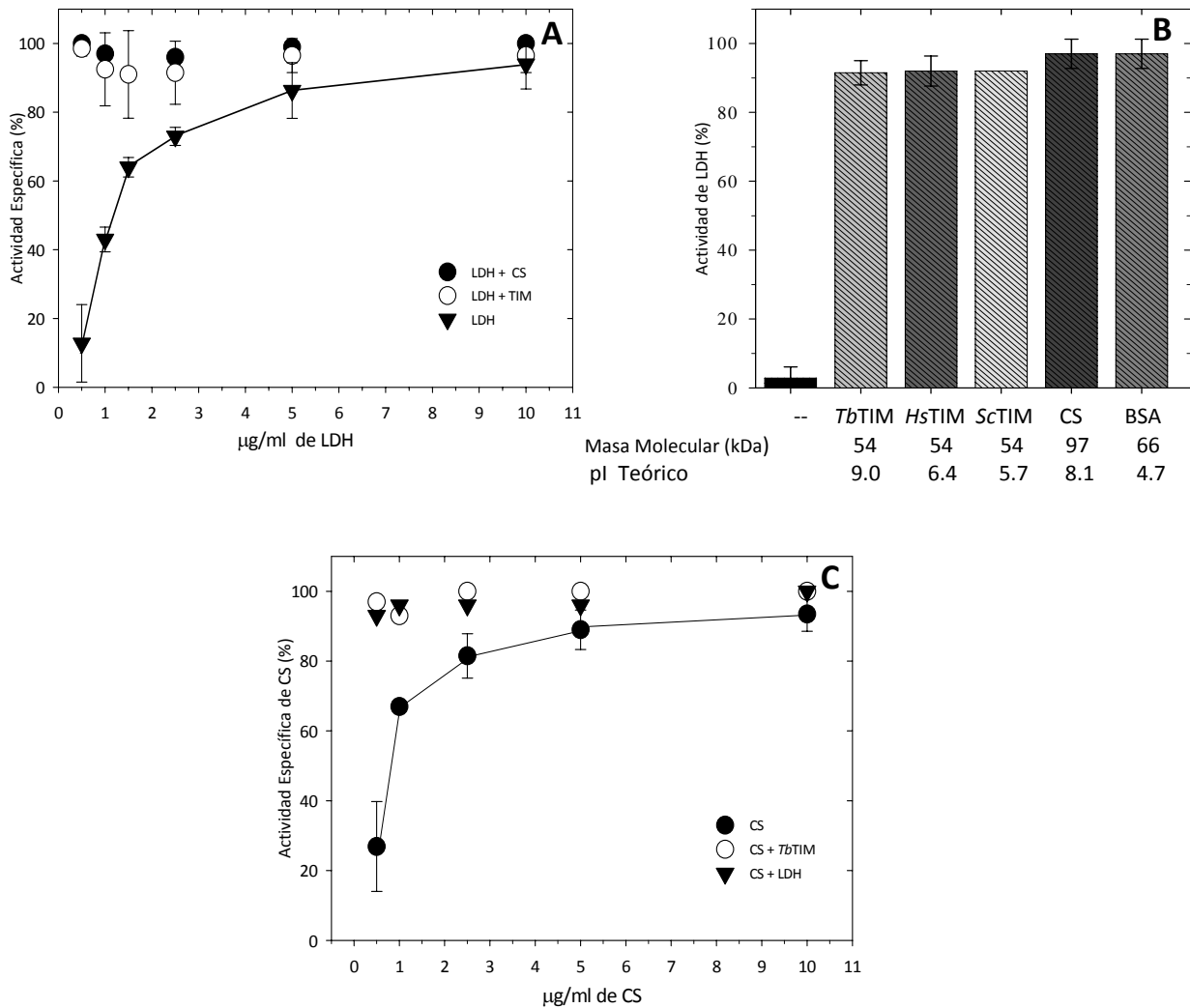


Figura 10. Estabilidad de la LDH y CS en presencia y ausencia de distintas proteínas.

A. Se incubaron diferentes concentraciones de LDH en presencia y ausencia de 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *TbTIM* y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CS. Se consideró como 100 % a la actividad inicial que fue de 416 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. **B.** Estabilidad de 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LDH en ausencia y presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diferentes proteínas: (▨) *TbTIM*, (▩) *HsTIM*, (▧) *ScTIM*, (■) CS y (▦) BSA. Se consideró como 100 % a la actividad inicial que fue de 370 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. **C.** Se incubaron diferentes concentraciones de CS en presencia y ausencia de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LDH y *TbTIM*. Se consideró como 100 % a la actividad inicial que fue de 108 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

Características de la estabilización de la LDH en presencia de varias proteínas.

De acuerdo a los resultados anteriores, y ya que en el ambiente intracelular existe gran heterogeneidad de proteínas, surgió la pregunta sobre si la estabilidad que inducen las diferentes proteínas al tetrámero de LDH es aditiva. Se incubaron 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de LDH en ausencia y presencia de diferentes proteínas durante 24 horas. Las proteínas que se eligieron fueron la ScTIM, albumina de suero de bovino (BSA) y CS de corazón de porcino. Se observó que, en ausencia de proteínas, la LDH (0.5 $\mu\text{g/ml}$) mantuvo el 14 % de la actividad con respecto a la actividad inicial. En presencia de ScTIM, BSA y CS, se observó un incremento en la estabilidad de la LDH, manteniendo el 41 %, 53 % y 50 % de actividad respectivamente. Al incubar las tres proteínas con la LDH en la misma mezcla, se conservó el 89 % de la actividad, indicando que la suma de las interacciones de diferentes proteínas incrementan e inducen la estabilidad del tetrámero en relación a la interacción de las proteínas por separado (**figura 11**).

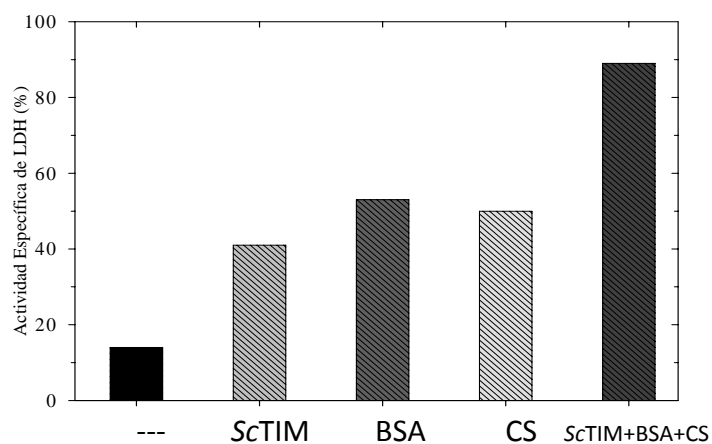


Figura 11. El efecto de distintas proteínas en la estabilidad de la LDH es aditivo. Se incubaron 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de LDH en ausencia (■) y presencia de 0.4 $\mu\text{g/ml}$ de ScTIM (▨), BSA (▩) y CS (▧). Por último se incubó a la LDH con las tres proteínas en la misma mezcla (■). La actividad se expresó como porcentaje de la actividad, tomando como el 100 % de la actividad inicial de la LDH que fue de 327 $\mu\text{mol/min/mg}$. $n=1$

La desamidación de la TbTIM en ausencia y presencia de LDH y CS. El ambiente aglomerado y heterogéneo del medio intracelular puede ocasionar la interacción de múltiples proteínas y que dichas interacciones afecten sus propiedades. Se ha reportado que a 37°C, pH alcalino y en presencia de sustrato, la TIM puede sufrir desamidaciones en las Asn¹⁵ y Asn⁷¹. Partiendo de este hecho, se exploró el efecto de las interacciones proteína-proteína en la desamidación de la TbTIM, con el

objeto de estudiar si la interacción entre la TIM y proteínas no relacionadas previenen la desamidación de las Asn. La interacción podría ocasionar la disminución de accesibilidad al solvente, previniendo la modificación de los residuos.

Se incubaron 200 µg/ml de *Tb*TIM en presencia de 1 mg/ml de LDH y CS durante 12 horas (la técnica se describe en la sección de materiales y métodos). Al término de la incubación se identificó a las proteínas y sus isoformas utilizando técnicas de electroforesis en geles nativos y tinción con azul de Coomassie. La LDH y CS no interfieren con la migración e identificación de la *Tb*TIM, debido a que su migración es claramente diferente.

Al incubar a la *Tb*TIM en condiciones donde se favorece la desamidación, se observó la formación de isoformas y en consecuencia la disminución de la movilidad electroforética, debido al aumento de cargas negativas en la interfase de la enzima (**figura 12**). Sin embargo, al incubar a la enzima en un medio en el que se favorece la desamidación de la enzima, pero esta vez, en presencia de LDH y CS, se observó un aumento de la movilidad electroforética, posiblemente debido a que la LDH y CS ejercen un efecto protector sobre la *Tb*TIM, disminuyendo la desamidación.

<i>Tb</i> TIM	+	+	+	+	+	+
LDH	-	-	+	-	-	-
CS	-	-	-	-	-	+
G3P	-	+	+	-	+	+

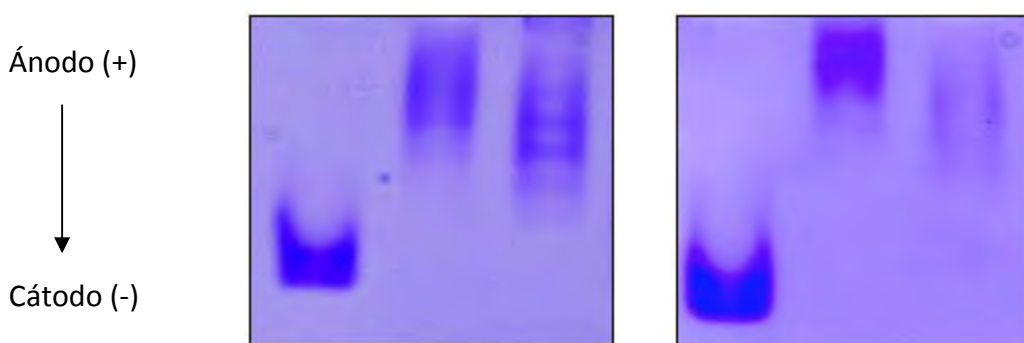


Figura 12. La desamidación de la *Tb*TIM en ausencia y presencia de proteínas. La *Tb*TIM (200 µg/ml) se incubó en ausencia y presencia de LDH y CS, amortiguador TE 50 mM a un pH de 9, durante 12 horas a 36.5 °C. Cuando la mezcla se incubó en ausencia de G3P, la *Tb*TIM migra como una sola banda y muestra tener una mayor movilidad electroforética hacia el cátodo. En presencia de G3P, se observó la aparición de isoformas y la disminución en la movilidad electroforética; sin embargo cuando a la mezcla se añadió 1 mg/ml de LDH y CS, se observó un aumento en la movilidad electroforética sugiriendo la disminución de isoformas desamidadas.

Estabilidad de los dímeros de *TbTIM* al interactuar con vesículas invertidas. Se ha reportado que la TIM tiene la capacidad de interactuar con varias proteínas y estructuras celulares como microtúbulos, actina y membranas de eritrocito, (Walsh JL *et al.*, 1989; Knull H *et al.*, 1992; Orosz *et al.*, 2000). También se ha reportado que la TIM de enfermos que padecen “deficiencia de la TIM” tiene mayor capacidad de unión a membranas de eritrocito que una TIM normal (Orosz *et al.*, 2001). En nuestro laboratorio Rodríguez-Almazán *et al.*, (2007) reportaron que la interacción de la *TbTIM* con varias proteínas induce la estabilidad de la estructura nativa de la *TbTIM*. Fue entonces que surgió la interrogante sobre si la TIM tiene la capacidad de interactuar con membranas biológicas y así aumentar su estabilidad.

La *TbTIM* es una enzima dimérica, debido a esto cuando la enzima se expone a concentraciones por debajo de su constante de asociación, el dímero se disocia a monómeros y pierde actividad. La actividad observada al final de la incubación refleja la cantidad de dímeros activos que quedan en la mezcla. A concentraciones menores de 5 $\mu\text{g/ml}$ se observó una pérdida en la actividad del 60 %, sin embargo, al incubar diferentes concentraciones de *TbTIM* en presencia de 80 $\mu\text{g/ml}$ de proteína de vesículas invertidas, no se observaron cambios en la actividad específica de la enzima, **(figura 13)**. Por lo tanto, los datos indican que las vesículas invertidas estabilizan al dímero de *TbTIM*, favoreciendo el equilibrio entre monómeros y dímeros hacia los dímeros activos.

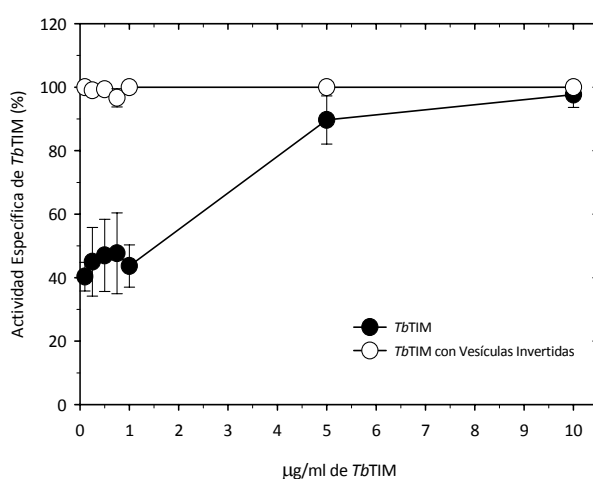


Figura 13. Efecto de las vesículas invertidas en la estabilización del dímero de *TbTIM*. Se incubaron diferentes concentraciones de *TbTIM* (0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.75 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$) en ausencia y presencia de 80 $\mu\text{g/ml}$ de proteína de vesículas invertidas. Después de 2 horas se midió actividad. Los resultados se expresaron como porcentaje de la actividad específica, en donde el 100 % fue de 3223 $\mu\text{mol/min/mg}$. n=3.

Unión de *TbTIM* a vesículas invertidas. Los resultados anteriores mostraron que la *TbTIM* interactúa con las vesículas invertidas. Con el propósito de explorar las características de la interacción, se estudió si la enzima puede unirse a las vesículas invertidas. Se incubaron 0.25 µg/ml de *TbTIM* en ausencia y presencia de 80 µg/ml de proteína de vesículas invertidas durante 30 minutos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 28, 000 rpm y se midió la actividad en el sobrenadante y en la pastilla. En ausencia de vesículas invertidas se midió actividad y se observó una pérdida en la actividad del 91 % tomando como 100 % a la actividad inicial, sin embargo en presencia de vesículas invertidas se encontró muy poca actividad en el sobrenadante, la mayor parte de la actividad se encontró en la pastilla, indicando que la *TbTIM* es capaz de unirse a las vesículas invertidas; además hubo poca pérdida en la actividad con respecto a la actividad inicial. Por tanto se puede concluir que la *TbTIM* se une a las membranas y adquiere una mayor estabilidad (**Tabla I**).

Tabla 1. Unión de *TbTIM* a Vesículas Invertidas (VI).

Actividad inicial: 0.343 µmol/min ± 0.024

Concentración de <i>TbTIM</i> (µg/ml)	VI (µg/ml)	Actividad de <i>TbTIM</i> en:	
		Sobrenadante (µmol/min)	Pastilla (µmol/min)
0.25	-	0.03 ± 0.01	-
0.25	80	0.04 ± 0.07	0.322 ± 0.04

Tabla 1. Se incubaron 0.25 µg/ml de *TbTIM* en ausencia y presencia de 80 µg/ml de proteína de vesículas invertidas. Al incubarse la enzima en ausencia de vesículas invertidas, se encontró la pérdida en la actividad con respecto a la actividad inicial. Sin embargo en presencia de vesículas invertidas, la mayor parte de la actividad se encontró en la pastilla y poca pérdida en la actividad con respecto a la actividad inicial. Esto indica que la *TbTIM* tiene la capacidad de unión a vesículas invertidas y por medio de esta se estabiliza el dímero y la conservación de la actividad. n=3

Características de la unión de *TbTIM* a vesículas invertidas. Se realizaron tres experimentos con el fin de estudiar las características de la unión de la *TbTIM* a las vesículas invertidas. En el primero, se incubaron 0.25 µg/ml de *TbTIM* en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de vesículas invertidas (**figura 14A**). En ausencia de éstas, la *TbTIM* perdió el 60 % de su actividad, sin embargo en presencia

de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína de vesículas invertidas, la pérdida de actividad disminuyó drásticamente y, con 48 $\mu\text{g}/\text{ml}$, más del 90 % de la actividad se preservó. El 95 % de esta actividad sedimentó unida a las membranas.

En un segundo experimento, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína de vesículas invertidas se incubaron con diferentes concentraciones de *TbTIM* y la actividad se determinó en el sobrenadante y en la pastilla (**figura 14B**). Se encontró que la unión de la *TbTIM* a las vesículas invertidas es saturable. Por debajo de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ la mayor parte de la actividad sedimentó en la pastilla, sin embargo por arriba de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, las vesículas invertidas se saturaron, por lo que la actividad se distribuyó tanto en el sobrenadante como en la pastilla.

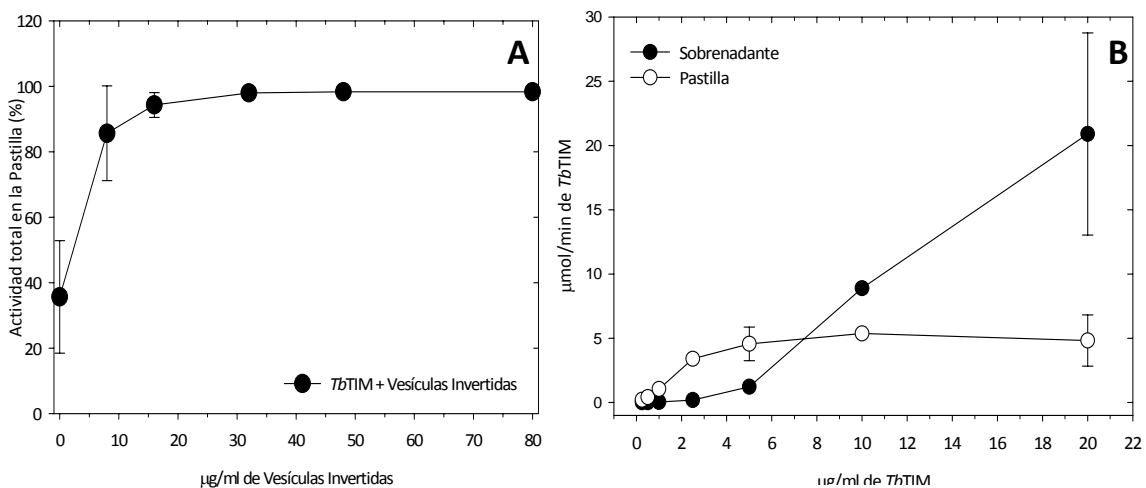


Figura 14. Características de la unión de *TbTIM* a vesículas invertidas. A. Se incubaron 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *TbTIM* con diferentes concentraciones de vesículas invertidas. Al término de 30 minutos se centrifugó y se midió actividad en el sobrenadante y pastilla. La actividad inicial fue de 0.38 ± 0.05 . El porcentaje de actividad en la pastilla se calculó tomando como 100% a la suma de la actividad en el sobrenadante y pastilla. $n=3$ **B.** Se incubaron diferentes concentraciones de *TbTIM* en presencia de 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína de vesículas invertidas, la unión de la *TbTIM* a las vesículas invertidas muestra una cinética de saturación. La actividad se expresó en $\mu\text{mol}/\text{min}$. $n=3$

Se ha calculado que el punto isoeléctrico de la *TbTIM* es de 9.08. A pH de 7.4 la *TbTIM* está cargada positivamente, sugiriendo que la unión a las vesículas invertidas en las que hay abundancia de cargas negativas se podría deber a interacciones electrostáticas. Para examinar esta posibilidad, se estudió el efecto de varias sales a una concentración de 100 mM y se determinó la unión de *TbTIM* a las vesículas

invertidas. Los resultados demostraron que las sales KCl, NaCl, CH₃COONa y CH₃COOK inducen un efecto inhibitorio en la unión de *Tb*TIM a vesículas invertidas, indicando que las interacciones electrostáticas son fundamentales en la unión de la enzima a las vesículas internas (**tabla 2**).

Tabla 2. Unión de *Tb*TIM a Vesículas Invertidas (VI) en Presencia de Sales.

Actividad inicial: 10.7 $\mu\text{mol}/\text{min} \pm 1.06$.

Concentración de <i>Tb</i> TIM ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	VI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Sal (100 mM)	Actividad total en sobrenadante ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Actividad total en pastilla ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
5	80	–	0.78 \pm 0.87	9.3 \pm 0.854
5	80	KCl	10.2 \pm 1.57	0.27 \pm 0.03
5	80	NaCl	10.2 \pm 0.49	0.23 \pm 0.05
5	80	CH ₃ COONa	9.9 \pm 1.22	0.5 \pm 0.41
5	80	CH ₃ COOK	9.9 \pm 0.80	0.32 \pm 0.06

Tabla 2. Se incubaron 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *Tb*TIM con vesículas invertidas en presencia de cada una de las diferentes sales. La actividad se midió en el sobrenadante y en la pastilla y se expresó en $\mu\text{mol}/\text{min}$. En presencia de sal se inhibe la unión de la enzima a vesículas invertidas, encontrando la mayor parte de la actividad en el sobrenadante. n=3

Unión de TIM de diferentes especies a vesículas invertidas. Las propiedades catalíticas y estructurales de la TIM de distintas especies son muy similares; sin embargo la secuencia de aminoácidos presenta variaciones entre las especies y causan diferencias en su punto isoeléctrico. De acuerdo a esto, se determinó la unión de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de TIM de diferentes especies a 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína de vesículas invertidas y se encontró que la unión es dependiente del punto isoeléctrico de cada enzima. La *Tb*TIM que tiene un pI teórico de 9.08, fue la que presentó mayor unión a las vesículas invertidas y conforme el pI de cada enzima disminuye, la unión a las vesículas también disminuye. La *Tc*TIM tiene un pI teórico de 8.7 y presenta una unión intermedia entre *Tb*TIM y *Lm*TIM, esta última con un pI teórico de 8.3 (**figura 15**). Este estudio, junto con el antes mencionado (**tabla 2**), demuestran que la unión de *Tb*TIM a las vesículas invertidas ocurre gracias a interacciones electrostáticas.

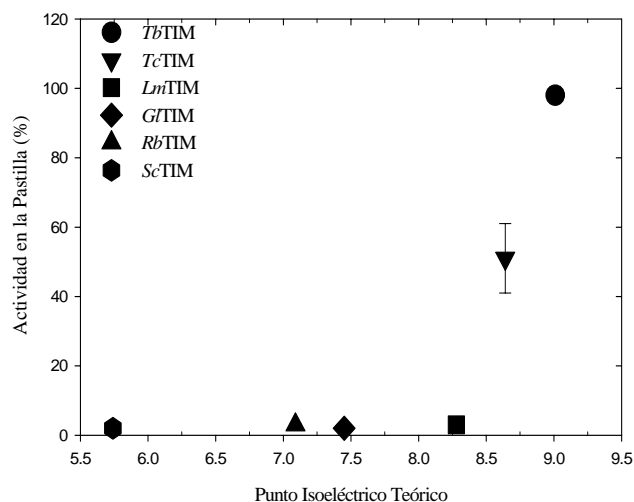


Figura 15. Unión de TIMs de diferentes especies a vesículas invertidas. Se incubaron 5 $\mu\text{g/ml}$ de TIMs de las especies indicadas con vesículas invertidas, se midió actividad en el sobrenadante y la pastilla. Se graficó la actividad encontrada en la pastilla expresada en porcentaje; tomando como 100 % la suma de la actividad que se encontró en el sobrenadante y en la pastilla. La unión de las TIMs es dependiente del punto isoelectrico. $n=3$

Unión de TbTIM a liposomas. Se ha reportado que algunas enzimas glucolíticas interactúan de manera específica con el NH_2 -terminal de la banda 3 de eritrocito en condiciones de baja fuerza iónica, (Orosz *et al.*, 2000; Campanella *et al.*, 2005). Con el propósito de explorar si las bicapas lipídicas por sí solas tienen la capacidad de unir TbTIM, se incubaron liposomas preparados de asolectina con 0.25 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$ de TbTIM durante 30 minutos, posteriormente se centrifugó la mezcla a 40,000 rpm por 1 hora, y finalmente se midieron las actividades del sobrenadante y la pastilla.

Se encontró que la mayor parte de la actividad sedimentó con los liposomas, sugiriendo que los fosfolípidos de las vesículas invertidas cargados negativamente (**Tabla 3**), podrían ser el sitio de unión de la TbTIM. Sin embargo no puede descartarse una posible interacción entre la TbTIM y alguna proteína embebida en la membrana lipídica de las vesículas invertidas. También se observó que los liposomas incrementaron la estabilidad del dímero, manteniendo el 75 % de la actividad para 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de TbTIM y el 95 % de la actividad para 5 $\mu\text{g/ml}$ de TbTIM, con respecto al 100 %. En ausencia de liposomas la actividad de la enzima disminuyó obteniendo un 15 % y 27 % de actividad para 0.25 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Tabla 3. Unión de *TbTIM* a Liposomas

Liposomas (μ l)	Concentración de Enzima (μ g/ml)	Actividad total en sobrenadante (μ mol/min)	Actividad total en pastilla (μ mol/min)	Act. Total (%)
-	0.25	0.02	-	5.2
-	5	1.23 \pm 0.44	-	14
20	0.25	0.04 \pm 0.32	0.24 \pm 0.085	75
20	5	0.85 \pm 0.14	7.24 \pm 0.791	95

Tabla 3. Se incubaron 0.25 μ g/ml y 5 μ g/ml de *TbTIM* en presencia de liposomas, la suma de la actividad en el sobrenadante y pastilla, expresado en porcentaje fue del 75 % y 95 %, respectivamente, tomando como el 100 % a la actividad inicial. En ausencia de liposomas, se observó tan sólo el 5.2 % y 14 % de actividad total respectivamente. n=3

Importancia de la catálisis en la unión de *TbTIM* a vesículas invertidas. Se estudió la unión de *TbTIM* a las vesículas invertidas en condiciones en que la enzima lleva a cabo catálisis. Los experimentos de unión se realizaron de manera convencional, excepto que en la mezcla se añadió gliceraldehído 3-fosfato (G3P). En condiciones de catálisis, la unión de 5 μ g/ml de *TbTIM* a las vesículas invertidas se ve drásticamente disminuida en comparación a la unión de la enzima en condiciones en que no hay catálisis. En vista de estos resultados, se examinó el efecto de un inhibidor competitivo de la TIM, conocido como fosfoglicolato. Al igual que el gliceraldehído-3 fosfato, el fosfoglicolato inhibe la unión de *TbTIM* a las vesículas invertidas (**tabla 4**). Este efecto es distinto al observado al aumentar fuerza iónica debido a que la incubación con sustrato e inhibidor se realizó a bajas concentraciones, mientras que las sales ejercen su efecto a concentraciones milimolares. Estos resultados sugieren que la ocupación del sitio catalítico por sustrato o inhibidor, impiden la unión de la enzima a las vesículas invertidas.

Posterior a la prueba de unión, se tomaron aquellas mezclas que contenían únicamente vesículas invertidas (**tabla 4**). A la mezcla 2, se agregó 3 mM de G3P, mientras que a la mezcla 3, se agregó únicamente agua (**tabla 5**). Ambas mezclas se centrifugaron por segunda vez y se midió actividad en el sobrenadante y en la pastilla. En la mezcla 2, en presencia de G3P, se encontró mayoritariamente la actividad en el sobrenadante, indicando que la enzima que se encontraba unida a las vesículas

invertidas se desprende de éstas al catalizar. En ausencia de G3P, la actividad se encontró en la pastilla.

Tabla 4. Importancia de la Catálisis en la Unión de *Tb*TIM a Vesículas Invertidas.
Actividad inicial: 11.1 $\mu\text{mol}/\text{min} \pm 1.03$

Mezcla	G3P	VI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Fosfoglicolato (μM)	Actividad total en sobrenadante ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Actividad total en pastilla ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
1	–	–	–	3.4 \pm 1.60	-
2	–	80	–	0.1 \pm 0.02	10.2 \pm 1.42
3	–	80	–	0.1 \pm 0.06	10.3 \pm 1.42
4	3 mM	80	–	6.9 \pm 1.90	1.6 \pm 0.90
5	3 mM	–	–	6.3 \pm 1.99	-
6	–	80	100	6.6 \pm 1.50	0.1 \pm 2.20
7	–	–	100	4.4 \pm 1.62	-

Tabla 4. Se exploró el efecto del G3P y fosfoglicolato en la unión de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *Tb*TIM a vesículas invertidas. Cuando el sitio activo está ocupado por sustrato o inhibidor, la enzima no se une a las vesículas. n=3

Tabla 5. Importancia de la Catálisis en la Unión de *Tb*TIM a Vesículas Invertidas.

Mezcla	G3P	VI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Agua (μl)	Actividad total en sobrenadante ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Actividad total en pastilla ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
2	3 mM	80	–	5.29 \pm 0.55	1.69 \pm 0.01
3	–	80	75	0.22 \pm 0.12	8.02 \pm 0.25

Tabla 5. Se tomaron las pastillas de las mezclas 2 y 3 (tabla 4) y se incubó con G3P (mezcla 2) y agua (mezcla 3), se centrifugó y se midió actividad en el sobrenadante y pastilla. En presencia de sustrato la enzima se encontró en el sobrenadante indicando que el sustrato ocasiona que la enzima se desprenda de las membranas al realizar catálisis activa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La concentración de proteína intracelular se encuentra en el rango de 200 a 400 mg/ml. A tan altas concentraciones, las macromoléculas ocupan una gran parte del volumen celular que resulta en el fenómeno de aglomeración macromolecular. Este ambiente aglomerado permite la formación de complejos multienzimáticos, donde las enzimas se organizan de manera específica, alterando recíprocamente sus propiedades funcionales y estructurales. Además, permite la canalización de sustratos y el aumento en la eficiencia catalítica.

Debido a su importancia metabólica, las interacciones proteína-proteína de tipo específico han sido las más estudiadas y mejor entendidas. Sin embargo, se ha dado poca atención a las interacciones proteína-proteína de tipo no específico que inevitablemente ocurren en el ambiente aglomerado de la célula y el efecto de estas en las propiedades de las proteínas. Rodríguez-Almazán *et al.*, (2007) reportaron la importancia de dichas interacciones entre la enzima dimérica *TbTIM* y ocho proteínas no relacionadas en la reactivación del dímero. Se encontró que la TIM es capaz de interactuar con diferentes proteínas y que dicha interacción favorece la formación de dímeros activos a partir de monómeros desplegados por medio de la unión de las proteínas a la conformación dimérica.

Partiendo de este antecedente, en el presente trabajo se realizaron ensayos de reactivación y estabilidad con las enzimas LDH y CS, con el objeto de entender si el efecto de estabilización y reactivación a causa de las interacciones de tipo no específico, ocurre con otras enzimas, y si es posible globalizar el efecto. Se encontró que la interacción de la LDH con la *TbTIM* incrementa la reactivación del tetrámero y se propone que ocurre debido a que la interacción de la *TbTIM* desvía el equilibrio entre monómeros, dímeros y tetrámeros plegados hacia ésta última conformación, estabilizando al tetrámero; la CS también es capaz de interactuar con la LDH y estabilizar al tetrámero, y viceversa. Este estudio en conjunto con el de Rodríguez Almazán *et al.*, 2007, demuestran que las interacciones de tipo no específicas que ocurren en el medio intracelular incrementa la reactivación y la estabilidad de no sólo las TIMs, sino de otras proteínas que presentan oligomerización.

Es importante notar que los experimentos se hicieron a concentraciones de $\mu\text{g/ml}$, indicando que la reactivación y estabilidad de las enzimas, no ocurre a

consecuencia de aglomeración macromolecular, para la cual se necesitan cientos de mg/ml de proteínas. De cualquier forma, se puede concluir que el ambiente celular donde coexisten altas concentraciones de diferentes especies proteicas, es propicio para favorecer las interacciones proteína-proteína y dar lugar al incremento en las propiedades antes mencionadas.

Las interacciones estudiadas en el presente trabajo se pueden considerar inespecíficas, debido a que ocurren con proteínas no relacionadas y distintas características fisicoquímicas. Sin embargo, se hace notar que la interacción ocurre predominantemente con la conformación activa de las enzimas, ya sea tetrámero para la LDH o dímero para la CS, demostrando preferencia por la estructura nativa, lo que implica cierta especificidad.

Debido a que el ambiente intracelular está conformado por una gran diversidad de especies proteicas, resultaba necesario realizar ensayos donde diferentes proteínas coexistieran en la misma mezcla. Al realizar el ensayo, se encontró que el efecto de estabilización no es particular de que una única especie interactúe con la LDH, sino también que la suma de diferentes especies estabilizan al tetrámero, simulando el ambiente heterogéneo de la célula.

Además de ayudar a la reactivación y la estabilidad de la estructura funcional de las enzimas, se estudió si la interacción proteína-proteína de tipo no específico podría tener efecto en modificaciones que ocurren a proteínas, como es el caso de la desamidación. La TIM es una enzima modelo para el estudio de la desamidación, la cual en presencia de sustrato, induce el cambio de conformación del asa 6 y transmite el cambio al asa de interfase incrementando la probabilidad de desamidación en condiciones de baja fuerza iónica, pH alcalino y altas temperaturas (37° C), debido al incremento de la exposición de la Asn⁷¹ al solvente. Aunque el aumento en la movilidad electroforética hacia el cátodo no es dramático con respecto al control, si se observa que en presencia de proteínas, la forma desamidada disminuye, probablemente debido a que la interacción de las proteínas modifica el medio al cual la Asn se encuentra expuesta, impidiendo y disminuyendo la exposición al ambiente.

Posterior al estudio del efecto de las interacciones proteína-proteína en la reactivación y estabilidad de la LDH y CS, se estudió el efecto de la interacción con otras estructuras celulares, por ejemplo con membranas biológicas. Se encontró, que

la *TbTIM* tiene la capacidad de unión a vesículas invertidas y liposomas. Se ha reportado que la unión de la enzima glicolítica, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa a la banda 3, proteína membranal de eritrocito, inhibe su actividad en un 70 % (Campanella *et al.*, 2008), mientras que la LDH presenta un 20 % menos de actividad específica al interactuar con la membrana mitocondrial (Sanz *et al.*, 1988). En este trabajo, la interacción de la *TbTIM* a membranas estabiliza la estructura dimérica de la enzima, manteniendo su actividad en el nivel máximo, aún a concentraciones por debajo de su constante de asociación.

En éste estudio se encontró que la *TbTIM* tiene la capacidad de unirse a membranas biológicas y que esta unión es sensible a fuerza iónica, debido a que únicamente en amortiguador TED <20 mM se unen ambas especies. Posteriormente se demostró que la unión se produce debido a interacciones iónicas entre los grupos ionizados de la enzima y la membrana biológica. Experimentos adicionales confirmaron la sensibilidad de la unión a alta fuerza iónica: (1) la incubación con 100 mM de diferentes sales inhibe la unión de la *TbTIM* a vesículas invertidas y (2) la unión resultó ser dependiente del punto isoeléctrico de la enzima, esto debido a que la enzima tiene un punto isoeléctrico de 9.08 que al estar a pH de 7.4, adquiere carga positiva que permite la interacción con los fosfolípidos aniónicos de la bicapa.

Se ha reportado que las enzimas glucolíticas: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, aldolasa, fosfofructocinasa, piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa son capaces de interactuar con la banda 3 de eritrocito de humano (Campanella *et al.*, 2005). Es importante mencionar que aunque la enzima es capaz de unirse a liposomas, es decir: interactúa con los fosfolípidos, es posible que la interacción a vesículas invertidas se deba a proteínas embebidas en la membrana de las vesículas como es el caso de la banda 3.

Otra característica importante de la unión de la *TbTIM* a las vesículas invertidas es que se inhibe cuando el sitio activo de la enzima se encuentra ocupado por sustrato o por un análogo del sustrato, el fosfoglicolato. Esta inhibición de la unión de la *TbTIM* a las vesículas es diferente a la observada por alta fuerza iónica debido a que la concentración utilizada de inhibidor fue de 100 μ M, mientras que el efecto de sal ocurre a concentraciones milimolares. Es importante notar que cuando la enzima se

encuentra unida a las vesículas invertidas y se agrega sustrato, la enzima es liberada, es decir cuando la enzima realiza catálisis no ocurre unión a las vesículas invertidas.

Previamente, se estudió que la proteína disulfuro isomerasa (PDI) es más efectiva como chaperona en el plegamiento de la lisozima bajo condiciones de aglomeración (Van der Berg *et al.*, 1999), confirmando que el efecto de la aglomeración macromolecular provoca el incremento en las constantes de asociación entre macromoléculas y como consecuencia el incremento en el plegamiento (Zimmerman y Minton, 1993). En éste trabajo se encontró que el incremento en la reactivación de la LDH no se debe al efecto de un ambiente aglomerado, ya que el efecto de las proteínas se observó a concentraciones por debajo de mg/ml, lo cual indica que las interacciones de tipo no específico incrementan la estabilidad de enzimas oligoméricas, por tanto este estudio abre un nuevo panorama sobre el posible papel que juegan las interacciones de tipo no específico, en particular sobre la estabilidad de los oligómeros. En el ambiente intracelular las proteínas están a concentraciones en que parece que el contacto entre proteínas no relacionadas es inevitable.

BIBLIOGRAFÍA

- Alam T, Finkelstein D, Srere PA. (1982) *In vitro* translation of mRNA for yeast citrate synthase. *J Biol Chem.*; 257(18):11181-5.
- Anfinsen CB, Haber E, Sela M y White FH Jr. (1961) The kinetics of formation of native ribonucleasa during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U SA*; 47:1309-14.
- Beeckmans S, Kanarek L. (1981) Demonstration of physical interactions between consecutive enzymes of the citric acid cycle and of the aspartate-malate shuttle. A study involving fumarase, malate dehydrogenase, citrate synthesis and aspartate aminotransferase. *Eur J Biochem.*; 117(3):527-35.
- Belasco JG, Herlihy JM, Knowles JR. (1978) Critical ionization states in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase. *Biochemistry*; 17(15):2971-8
- Bloxham DP, Parmelee DC, Kumar S, Wade RD, Ericsson LH, Neurath H, Walsh KA, Titani K. (1981) Primary structure of porcine heart citrate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 78(9):5381-5.
- Borchert TV, Pratt K, Zeelen J, Callens M, Noble ME, Opperdoes FR, Michels PA, Wierenga RK. (1993) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterization of a dimer-interface mutant. *Eur J Biochem.*; 211(3):703-10.
- Buckel W, Eggerer H. (1969) Intramolecular nucleophilic catalysis on the hydrolysis of citryl-CoA. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*; 350(11):1367-76.
- Casal J, Ahern T, Davenport R, Petsko G, Kibanov A. (1987) Subunit interface of triosephosphate isomerase: site-directed mutagenesis and characterization of the altered enzyme. *Biochemistry*; 26(5):1258-64
- Cho W, Stahelin R. (2005) Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*; 34:119-51
- Clarke A, Daffron T. (1998) Nicotinamide Cofactor-Dependent Enzymes. (San Diego: Academic Press).
- Datta A, Merz J, Spivey H. (1985) Substrate channeling of oxalacetate in solid-state complexes of malate dehydrogenase and citrate synthase. *J Biol Chem.*; 260(28):15008-12
- Deng H, Zheng J, Clarke A, Holbrook J, Callender R, Burgner J 2nd. (1994) Source of catalysis in the lactate dehydrogenase system. Ground-state interactions in the enzyme-substrate complex. *Biochemistry*; 33(8):2297-305.

- Dhar- Chowdhury P, Harrell MD, Han SY, Jankowska D, Parachuru L, Morrissey A, Srivastava S, Liu W, Malester B, Yoshida H, Coetzee WA. (2005) The glycolytic enzymes, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, triose-phosphate isomerase, and pyruvate kinase are components of the K_{ATP} channel macromolecular complex and regulate its function. *J Biol Chem.*; 280 (46) :38464–70
- Dunn C, Wilks H, Halsall D, Atkinson T, Clarke A, Muirhead H, and Holbrook J. (1991) Design and synthesis of new enzymes based upon the lactate dehydrogenase framework. *Phil Trans Roy Soc (London) B.* 332:177–185.
- Dunn C, Banfield M, Barker J, Higham C, Moreton K, Turgut-Balik D, Brady R, Holbrook J. (1996) The structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* reveals a new target for anti-malarial design. *Nat Struct Biol.*; 3(11):912-5.
- Eggerer H, Remberger U. (1963) On the mechanism of the biological transformation of citronic acid. III The role of citryl-Coenzyme A in the citrate splitting reaction. *Biochem. Z.*; 339:62-76.
- Eggerer H, Remberger U, Gruenewaelder C. (1964) On the Mechanism of Biological Transformation of citric acid. V. Citrate Synthase, a hydrolase for malyl coenzyme A. *Biochem Z.*; 339: 436-53.
- Elcock A, Huber G, McCammon J. (1997) Electrostatic channeling of substrates between enzyme active sites: Comparison of simulation and experiment. *Biochemistry*; 36(51):16049-58.
- Ellis R, Minton A. (2003) Cell Biology: join the crowd. *Nature*; 425(6953):27-8
- Gerd Z, Rainer R, and Rainer J. (1979) Effects of Low Concentrations of Guanidine – HCl on the Reconstitution of Lactic Dehydrogenase from Pig Muscle *in vitro*. Evidence for Guanidine Binding to the Native Enzyme. *Eur. J. Biochem.*; 100, 593-8
- Gracy R, Yüksel Ü, Gómez-Puyou A. (1995) Deamidation of triosephosphate isomerase *in vitro* and *in vivo*, CRC Press; 133-52
- Gracy R, Yüksel K, Chapman M, Cini J, Jahani M, Lu H, Oray B, and Taleni J. (1985) Impaired protein degradation may account for the accumulation of “abnormal” proteins in aging cells. In: Adelman, R. C.; Decker, E. E., eds. *Modification of protein during aging*. New York: Alan R. Liss Publishers: 1–18.
- Grau U, Trommer W, Rossmann M. (1981) Structure of the active ternary complex of pig heart lactate dehydrogenase with S-lac-NAD at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol.*; 151(2):289-307.
- Green D. (1958) Studies in organized enzyme systems. *The Harvey Lectures*, Series 52, 177-227, Academic Press.

- Hackenbrock C, Chazotte B. (1986) Lipid enrichment and fusion of mitochondrial inner membranes. *Methods Enzymol.*; 125:35-45.
- Halper L, Srere P. (1977) Interaction between citrate synthase and mitochondrial malate dehydrogenase in the presence of polyethylene glycol. *Arch Biochem Biophys.*; 184(2):529-34.
- Harmey M, Neupert W. (1979) Biosynthesis of mitochondrial citrate synthase in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.*; 108(2):385-9.
- Iwata S, Ohta T. (1993) Molecular basis of allosteric activation of bacterial L-lactate dehydrogenase. *J Mol Biol.*; 230(1):21-7
- Jaenicke R. (1987) Folding and association of proteins. *Prog Biophys Mol Biol.*; 49(2-3):117-237. Review.
- Jaenicke R, Lilie H. (2000) Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv Protein Chem.*; 53:329-401. Review.
- Johansson C, Pettersson G. (1974) Kinetics of the inhibition of citrate synthase from pig heart by substrate analogues. *Eur J Biochem.*; 46(1):5-11.
- Knowles J. (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*; 350:121-4.
- Knull H, Walsh J. (1992) Association of glycolytic enzymes with cytoskeleton. *Curr Top Cell Regul*, 33: 15–30.
- Lodi P, Chang L, Knowles J, Komives E. (1994) Triosephosphate isomerase requires a positively charged active site: the role of lysine-12. *Biochemistry*; 33(10):2809-14.
- Lolis E, Petsko G. (1990) Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5 Å resolution: implications for catalysis. *Biochemistry*; 29(28):6619-25.
- Lolis E. (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*; 29(28):6609-18.
- McClendon S, Zhadin N, Callender R. (2005) The approach to the Michaelis complex in lactate dehydrogenase: the substrate binding pathway. *Biophys J.*; 89(3):2024-32.
- Minton A. (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr Opin Struct Biol*; 10: 34-39.

- Minton A. (2001) The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *The Journal of Biological Chemistry*; 276(14):10577-80.
- Morgunov I, Srere P. (1998) Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase. Substrate channeling of oxaloacetate. *J Biol Chem.*; 273(45):29540-4
- Murray D, Ahrbuzova A, Honig B, McLaughlin S. (2002). The role of electrostatic and nonpolar interactions in the association of peripheral proteins with membranes. *Curr. Top Membr*; 52:277–98.
- Nagano N, Orengo C, Thornton J. (2002) One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J Mol Biol.*; 321(5):741-65
- Nelson D, Cox M. (2008) Lehninger. Principles of Biochemistry. Fifth edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Nooren I, Thornton J. (2003) Diversity in protein-protein interactions. *EMBO J.*; 22 (14):3486-92.
- Opitz U, Rudolph R, Jaenicke R, Ericsson L, Neurath H. (1987) Proteolytic dimers of porcine muscle lactate dehydrogenase: characterization, folding, and reconstitution of the truncated and nicked polypeptide chain. *Biochemistry*; 26(5):1399-406.
- Orosz F, Oláh J, Alvarez M, Keseru GM, Szabó B, Wágner G, Kovári Z, Horányi M, Baróti K, Martial J, Hollán S, Ovádi J. (2001) Distinct behavior of mutant triosephosphate isomerase in hemolysate and in isolated form: molecular basis of enzyme deficiency. *Blood*; 98(10):3106–12.
- Orosz F, Wágner G, Liliom K, Kovács J, Baróti K, Horányi M, Farkas T, Hollán S, Ovádi J. (2000) Enhanced association of mutant triosephosphate isomerase to red cell membranes and to brain microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:1026–31.
- Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramírez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou M, Pérez-Montfort R. (1997) Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem.*; 244(3):700-5
- Ovádi J., Saks V. (2004) On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Molecular and cellular biochemistry*; 256/257:5-12.
- Piontek K, Chakrabarti P, Schär H, Rossmann M, Zuber H, (1990) Structure determination and refinement of *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase. *Proteins*;7(1):74-92
- Porter KR. (1984) The cytomatrix: a short history of its study. *J Cell Biol.*; 99, 3s-12s

- Read J , Winter V, Eszes C, Sessions R, Brady R. (2001) Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins*; 43(2):175-85.
- Remington S, Wiegand G, Huber R. (1982) Crystallographic refinement and atomic models of two different forms of citrate synthase at 2.7 and 1.7 Å resolution. *J Mol Biol.*; 158(1):111-52
- Remington J, Branchaud B, Karpusas M. (1990). Proposed mechanism for the condensation reaction of citrate synthase: 1.9 Å structure of the ternary complex with oxaloacetate and carboxymethyl coenzyme A. *Biochemistry*; 29:2213-19.
- Rodríguez-Almazán C, Torner F, Costas M, Perez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. (2007) The Stability and Formation of Native Proteins from Unfolded Monomers Is Increased through Interactions with Unrelated Proteins. *Plos One*; 2(6):1-7
- Rodríguez-Almazán C, Arreola R, Rodríguez-Larrea D, Aguirre-López B, de Gómez-Puyou MT, Pérez-Montfort R, Costas M, Gómez-Puyou A, Torres-Larios A. (2008) Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *J Biol Chem.*; 283(34):23254-63.
- Rozacky E, Sawyer T, Barton R, Grazy R. (1971) Studies on human triosephosphate isomerase. I. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*; 146(1):312-320.
- Rudolph R, Heider I, Jaenicke R. (1977) Effect of coenzymes and temperature on the process of in vitro refolding and reassociation of lactic dehydrogenase isoenzymes. *Biochemistry*; 16(25):5527-31.
- Steck T, Kant J (1974) Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.*; 31(Pt A):172-80.
- Sreere P. (1967) Enzyme concentrations in tissues. *Science*; 158(803):936-7.
- Sreere P. (1981) Crystals as a model for mitochondrial matrix proteins. *Trends Biochem Sci*; 6:4-6.
- Sreere P. (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu Rev Biochem*; 56:89-124.
- Sreere P. (2000) Macromolecular interactions: Tracing the roots. *Trends Biochem Sci.*; 25(3):150-3.
- Sümegi B, Gyócsi L, Alkonyi I. (1980) Interaction between the pyruvate dehydrogenase complex and citrate synthase. *Biochim Biophys Acta*; 616(2):158-66.

- Sun A, Yüksel K, Gracy R. (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(2):382-390.
- Svedružić Z, Spivey H. (2006) Interaction between mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and L-lactate dehydrogenase from heart and muscle. *Proteins*; 63(3):501-11
- Tollefsbol T, Zaun M, Gracy R. (1982) Increased lability of triosephosphate isomerase in progeria and Werner's Syndrome fibroblasts. *Mech Ageing Dev.*; 20(2): 93-101.
- Turner B. (1975) Post-translational alterations of human erythrocyte enzymes. *Molecular Structure*. Academic Press, New York; 780-95.
- Tyiska, Williams R, Brent J, Hudson L, Clark A, *et al.*, (1986) NATO Workshop: Organization of Cell Metabolism. In press.
- Van den Berg B, Ellis J, Dobson M. (1999) Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *The EMBO Journal*; 18(24):6927-33
- Walsh J, Keith T, Knull H. (1989) Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochim Biophys Acta*; 999(1):64-70.
- Waley S. (1973) Refolding of Triosefosfate isomerase. *Biochem J*; 135, 165-72
- Wiegand G, Remington S. (1986) Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.*; 15:97-117.
- Wiener M, White S. (1992) Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of X-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure. *Biophys J.*; 61:437-47.
- Zettlmeissl G, Rudolph R, Jaenicke R. (1979) Effects of low concentrations of guanidine-HCl on the reconstitution of lactic dehydrogenase from pig muscle in vitro. Evidence for guanidine binding to the native enzyme. *Eur J Biochem.*; 100(2):593-8.
- Zimmerman S, Minton A. (1993) Macromolecular crowding: biochemical, biophysical and physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys Biomol Struc.*; 22:27-65.
- Zomosa-Signoret V, Hernández-Alcántara G, Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Garza-Ramos G, Pérez-Montfort R, Tuena De Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. (2003) Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry*; 42(11):3311-8.