

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

“La estabilidad y la formación de proteínas se incrementan por interacciones débiles entre proteínas no relacionadas ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A :
M. en C. CLAUDIA RODRÍGUEZ ALMAZÁN

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARMANDO GÓMEZ PUYOU



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.

*A la memoria de mi papá
Aurelio Rodríguez Rodríguez*

AGRADECIMIENTOS

A mi papá y mamá: Aurelio y Otilia, a mis hermanos: Leticia, Mónica, Aurelio y Verónica, y a mis sobrinos: Leticia, Lilia, Mónica, Emilio y Daniela, por su constante apoyo, amor y grandes momentos. Sin duda, sin ustedes no hubiera llegado hasta este momento. Los amo. ¡Muchas gracias!

A la Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarme mi formación académica desde el bachillerato hasta el doctorado.

Al Dr. Armando Gómez Puyou por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por todo el apoyo y enseñanzas que me brindó para desarrollar mi proyecto de doctorado y, principalmente, por su paciencia, sencillez y exigencias. Doc, mil gracias.

A los investigadores que formaron parte de mi comité tutorial: Dra. Adela Rodríguez Romero y Dr. Ruy Pérez Montfort, por sus comentarios, sugerencias y exigencias en cada examen tutorial. Muchas gracias.

A los investigadores que formaron parte del jurado de mi examen de grado: Dra. Alicia González Manjarrez, Dra. Laura Camarena, Dra. Rosario Muñoz Clares, Dr. Diego Halphen González, Dr. Miguel Costas Basín y Dr. Alejandro Fernández, por sus comentarios y sugerencias en la revisión del presente escrito.

Al Dr. Miguel Costas Basín y al M. en C. Francisco Torner, por su tiempo y asesoría que me brindaron durante los experimentos correspondientes al análisis calorimétrico.

A la Dra. Marietta Tuena Sangri por todos sus comentarios y sugerencias durante la realización de mi proyecto. Dra. Tuena, gracias por su apoyo en todo momento.

A la Q.F.B. Beatriz Aguirre López y a la Bióloga Nallely Cabrera por su asesoría técnica que fue indispensable en el desarrollo del presente trabajo.

A mis compañeros de los laboratorios 104 y 105 oriente del IFC, por todos los momentos. Bety, Cony, Rodrigo, Viviana, Mariel y Paulette. Muchas gracias.

A los ingenieros Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas, por su constante apoyo y asesoría en el área de cómputo.

A la Srita. Sara Noguera por su atención y apoyo para la realización de todos los trámites escolares que llevé a cabo durante el doctorado.

A todo el personal de la Biblioteca del Instituto de Fisiología Celular por todas sus atenciones que me brindaron, en especial, para la adquisición de material bibliográfico difícil de conseguir. Muchas gracias.

A todos los asistentes de los seminarios de los jueves del grupo del Dr. Gómez y la Dra. Tuena, por sus sugerencias y comentarios durante la realización de mi proyecto. Muchas gracias.

A mis queridos amiguitos que siempre tuvieron un tiempo para escucharme y apoyarme en todo momento: Juan, Marissa, Roxana, Alfredo y Nallely. Muchas gracias por formar parte de mi vida.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
ANTECEDENTES.....	3
EL PAPEL DE LAS CHAPERONAS EN EL PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS.....	4
PROTEÍNAS (NO CHAPERONAS) EN EL PLEGAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE PROTEÍNAS.....	5
EFECTO DE LA AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR EN EL PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS	7
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS PARTICULARES.....	10
LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA	
MODELO DE ESTUDIO.....	11
ESTRUCTURA GENERAL DE LAS TIMs.....	12
MECANISMO CATALITICO EN LA INTERCONVERSION DE GAP \longleftrightarrow DHAP	14
PLEGAMIENTO DE LA TIM.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	36
APÉNDICES.....	41
REFERENCIAS	44

RESUMEN

La concentración intracelular de proteína puede ser de hasta 400 mg/ml, lo que sugiere que dentro de la célula pueden existir numerosos contactos proteína-proteína. El principio básico de Le Chatelier indica que si el equilibrio de una reacción se modifica al cambiar las condiciones (presión, temperatura o concentración), la reacción tenderá a adquirir un nuevo equilibrio para contrarrestar el cambio. Esto indica que si dentro de la célula se llevan a cabo interacciones proteína-proteína, algunas características fundamentales de las proteínas podrían ser diferentes a los que se han observado *in vitro*. Esta hipótesis se examinó determinando el efecto de ocho proteínas diferentes en la formación del homodímero de la trifosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) a partir de monómeros desplegados en cloruro de guanidinio. Las ocho proteínas a concentraciones del orden de microgramos por mililitro indujeron un incremento importante en la formación del dímero activo. Estudios sobre el mecanismo de este fenómeno indicaron que las proteínas estabilizan la estructura dimérica de TbTIM y que promueven la formación de dímeros activos. Se obtuvieron datos similares con TIM de otras tres especies. El cambio de entalpía que ocurre cuando la TbTIM se mezcla con lisozima se determinó por calorimetría de titulación isotérmica. Los resultados calorimétricos aportaron evidencia directa de interacciones débiles entre proteínas con características bioquímicas diferentes. En su conjunto, los datos sugieren que las interacciones proteína-proteína que ocurren en el espacio intracelular son un factor adicional en el control de la formación y estabilidad de las proteínas.

ABSTRACT

The intracellular concentration of protein may be as high as 400 mg per ml; thus it seems inevitable that within the cell, numerous protein-protein contacts are constantly occurring. A basic principle states that if the equilibrium of an association reaction is shifted when the equilibrium is disturbed by changing the conditions, the position of equilibrium moves to counteract the change. This indicates that if within the cell many protein-protein interactions are indeed taking place, some fundamental characteristics of proteins would necessarily differ from those observed in biochemical systems. Accordingly, we measured the effect of eight different proteins on the formation of homodimeric triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* (TbTIM) from guanidinium chloride unfolded monomers. The eight proteins at concentrations of micrograms per ml induced an important increase on active dimer formation. Studies on the mechanism of this phenomenon showed that the proteins stabilize the dimeric structure of TbTIM, and that this is the driving force that promotes the formation of active dimers. Similar data were obtained with TIM from three other species. The heat changes that occur when TbTIM is mixed with lysozyme were determined by isothermal titration calorimetry; the results provided direct evidence of the weak interaction between apparently unrelated proteins. The data therefore, are strongly suggestive that the numerous protein-protein interactions that occur in the intracellular space are an additional control factor in the formation and stability of proteins.

ANTECEDENTES

La increíble variedad de estructuras altamente específicas que resultan del plegamiento de las proteínas es fundamental en todos los seres vivos. El plegamiento correcto de las proteínas implica adquirir una conformación específica dentro de una inmensa variedad de estructuras. Además de generar funciones específicas, ahora se sabe que el plegamiento se acopla a otros procesos biológicos tales como el paso de moléculas a sitios celulares específicos, la regulación del crecimiento y la diferenciación celular (Dobson, 2004; Kincaid y Cooper, 2006). La falla en el plegamiento puede dar origen a una gran variedad de condiciones patológicas como por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (Taylor *et al.*, 2002).

La mayor parte del conocimiento obtenido sobre el plegamiento de proteínas se basa en estudios *in vitro*. En el proceso de replegamiento *in vitro*, los polipéptidos adquieren su estructura nativa en ausencia de otras proteínas, demostrando que la información se encuentra dentro de la secuencia lineal de aminoácidos, o sea en su estructura primaria (Anfinsen, 1961). También se ha observado que en muchas ocasiones, la formación de estructuras nativas se acompaña de la formación de agregados. Estos provienen de las interacciones intramoleculares incorrectas entre cadenas polipeptídicas. En este sentido es importante señalar que en la ruta de plegamiento de una proteína participan estados intermediarios. En muchas ocasiones éstos tienen una estructura secundaria similar a la conformación nativa y presentan regiones hidrofóbicas expuestas al solvente que funcionan como sitios de contacto entre intermediarios dando lugar a la formación de agregados (Jaenicke y Lilie, 2000). También se sabe que para que muchas proteínas se plieguen y ensamblen adecuadamente *in vivo* se requiere la participación de una maquinaria de

proteínas celulares llamadas chaperonas moleculares. La función de las chaperonas moleculares es prevenir la agregación y el mal plegamiento.

EL PAPEL DE LAS CHAPERONAS EN EL PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS.

En la célula las chaperonas actúan como catalizadores del plegamiento. El término chaperona se usó por primera vez por Laskey *et al.* (1978) para describir las propiedades de la nucleoplasmina, una proteína nuclear que es indispensable para el correcto ensamblaje de nucleosomas e histonas en extractos de ovocitos de *Xenopus*. Más tarde se empleó el término chaperonina al referirse a una proteína abundante del cloroplasto de *Pisum sativum*, proteína con la propiedad implicada en el ensamblaje de la enzima rubisco (Musgrove y Ellis 1986; Hemmingsen *et al.*, 1988). Las chaperonas se han definido como una clase de proteínas que participan en el plegamiento y ensamble correcto de otras proteínas. Abundan en los dominios Eucaria, Archaea y Eubacteria, y algunas se descubrieron y definieron como proteínas que responden a un choque térmico (heat-shock proteins, HSPs) o estrés (Hemmingsen *et al.*, 1988; Ellis, 1992; Hartl, 1996).

Las chaperonas se consideran como proteínas de unión cuyos ligandos son confórmeros no estables de otras proteínas. El confórmero después de unirse a una chaperona adquiere una estructura nativa, previniendo de esta manera las interacciones inter- e intramoleculares erróneas responsables de la agregación; por tanto las chaperonas participan de manera importante en la producción de proteínas nativas. En otras palabras, las chaperonas al unirse temporalmente a regiones hidrofóbicas expuestas en la superficie del polipéptido disminuyen la posibilidad de que estas proteínas se unan entre sí y formen agregados (Ellis, 1992; Hartl y Hayer-Hartl, 2002; Bukau *et al.*, 2006).

Las chaperonas comprenden algunas familias de proteínas altamente conservadas (Hemmingsen *et al.*, 1988; Ellis, 1990; Gupta, 1990). Su clasificación se basa en su tamaño, distribución celular y función. Las chaperonas se han dividido en tres grupos: el grupo I comprende el sistema GroE presente en Eubacterias, cloroplastos y mitocondrias (Georgopoulos *et al.*, 1973, Cheng *et al.*, 1989; Ellis y van der Vies, 1988; Hemmingsen *et al.*, 1988); el grupo II está en organismos del dominio Archaea y en el citosol de células eucarióticas (Yaffe *et al.*, 1992; Horwich y Willison, 1993); el grupo III se encuentra en algunas bacterias patógenas Gram-negativas (Wattiau y Cornelis, 1993; Menard *et al.*, 1994).

La mayoría de las proteínas que requieren de una chaperona para su plegamiento se unen principalmente a chaperonas del grupo I, y varias de estas chaperonas a su vez se unen a chaperonas del grupo II (Figura 1). Ambos grupos han evolucionado para combatir el problema de agregación que puede ocurrir tanto en cadenas polipeptídicas recién sintetizadas, como en proteínas nativas que han llegado a desplegarse debido a condiciones de estrés, como por ejemplo un choque térmico.

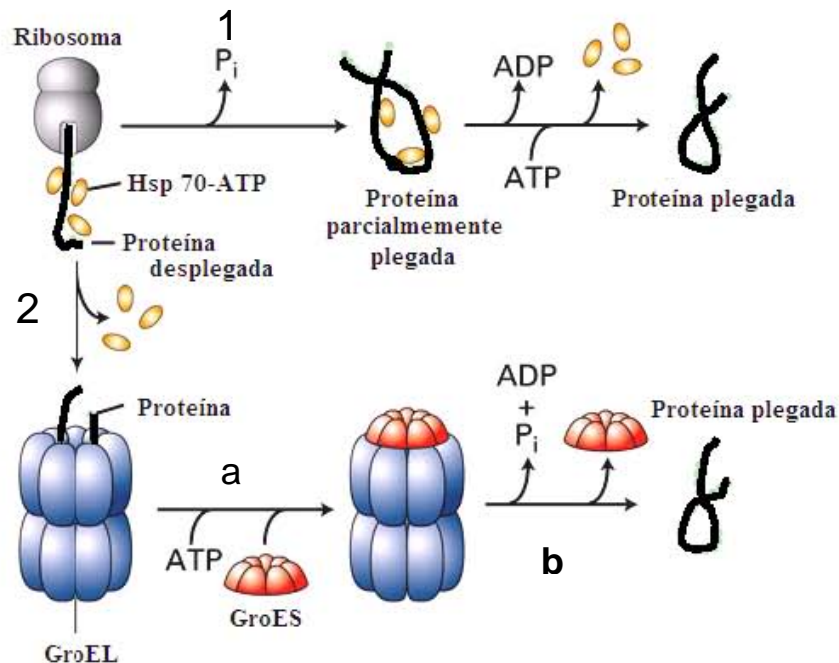


Figura 1. Esquema simplificado de la función del sistema GroE. La proteína no nativa se une a la chaperona HSP 70-ATP (chaperona del grupo II) y puede seguir dos vías: 1: La chaperona HSP 70-ATP

favorece el plegamiento de la proteína. 2: HSP 70-ATP acarrea la proteína desplegada hasta el anillo del complejo GroE. a) En uno de los extremos del anillo de GroEL se une GroES para encapsular la proteína no nativa en la cavidad. En presencia de ATP se lleva a cabo el plegamiento de la proteína en el interior de la cavidad. b) Liberación de GroES y la proteína plegada. GroEL queda lista para plegar a otra proteína.

PROTEINAS (NO CHAPERONAS) EN EL PLEGAMIENTO *IN VITRO* DE PROTEÍNAS

En experimentos *in vitro* con soluciones diluidas se ha demostrado que algunas proteínas que no son chaperonas favorecen el plegamiento de otras proteínas. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual estas proteínas favorecen el proceso. Por lo general, cuando en ensayos *in vitro* se analiza el papel de una chaperona, se emplean otras proteínas para demostrar la especificidad de la primera, es decir, se usan para aclarar si el replegamiento obtenido se debe a la chaperona, o si es un efecto inespecífico (Zhi *et al.*, 1992; Matsuzaki *et al.*, 1998). De estos estudios han surgido algunas observaciones que son de interés para nuestro trabajo. Por ejemplo, se ha estudiado el papel de proteínas (no chaperonas) en ambientes diluidos en el plegamiento de varias proteínas; en algunos casos se ha observado que producen un incremento importante del proceso. Por ejemplo, Zhi *et al.* (1992) estudiaron la participación de proteínas y otras moléculas orgánicas en la renaturalización de la enzima citrato sintasa. La enzima se desnaturizó con hidrocloreuro de guanidinio y urea y el replegamiento se llevó a cabo diluyendo los agentes caotrópicos en ausencia y presencia de albúmina de bovino (BSA), oxaloacetato y glicerol. Observaron que con 0.3 mg/ml de BSA se incrementó la reactivación en un 23%.

Sarkar y colaboradores (2004) analizaron la participación de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP2) en la agregación y reactivación de enzimas desplegadas con 6 M de cloruro de guanidinio. Observaron que la tubulina y un complejo llamado MTP (tubulina y MAP2) inhiben la agregación de la alcohol deshidrogenasa y la insulina. También vieron que a concentraciones menores de 1 μ M de MAP2 se incrementó la reactivación de la lactato deshidrogenasa, α -glucosidasa y málico deshidrogenasa. Horwitz (1992) analizó el papel de la

proteína α -cristalina en la agregación térmica de la alcohol deshidrogenasa, β - y γ -cristalinas. El autor observó que la α -cristalina a una concentración de 0.13 mg/ml es muy eficiente en suprimir la agregación inducida por temperatura, principalmente de β - y γ -cristalinas. Lilie y colaboradores (1993) analizaron *in vitro* el efecto de la prolil isomerasa (PPI) en la reacción de plegamiento del fragmento Fab del anticuerpo MAK 33. Observaron que los miembros de las subclases de PPIs, ciclofilina y proteínas unidas a FK 506 (FKBP), aceleran el proceso de replegamiento e incrementan la producción de moléculas plegadas correctamente. La albúmina de bovino (BSA) (6 μ M) incrementó la producción de estructuras nativas, sin influir en la velocidad de reactivación. Sus resultados demostraron que la producción de formas de Fab plegadas correctamente se acompaña de una disminución en la formación de agregados.

Trivedi y colaboradores (1997) estudiaron el replegamiento de lisozima reducida y el efecto de co-replegamiento en presencia de otras proteínas, tales como RNasa A, BSA, histonas, proteínas básicas de mielina, ADH y DNasa I, a una concentración de 0.15 μ g/ml. Todas aumentaron la reactivación. Sus resultados demostraron que las proteínas básicas incrementan la renaturalización de la lisozima en un 70%, y que las proteínas ácidas favorecen la agregación y disminuyen la renaturalización. Matsuzaki *et al.* (1998) aislaron una proteína de 58 kDa del periplasma de *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. cuya capacidad es inhibir la agregación de las enzimas dimetil sulfóxido reductasa (DMSOR) y rodanasa (una proteína de la matriz mitocondrial). El experimento se hizo en soluciones diluidas, empleando 10 μ g/ml tanto de la proteína de 58 kDa.

Aunque el mecanismo por el cual ejercen los efectos no se determinó, todos los datos anteriores indican que las interacciones entre proteínas, que aparentemente no tienen ninguna relación metabólica o funcional, afectan el plegamiento de otras proteínas. Esto sugiere que las

interacciones entre distintas proteínas son importantes en algunas de sus características fundamentales.

EFFECTO DE LA AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR EN EL PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS.

Las macromoléculas biológicas evolucionaron para funcionar en condiciones de “aglomeración” características del ambiente intracelular. Aglomeración (“crowding”) es un término con el que se trata de describir las condiciones que existen en el espacio intracelular en cuanto a la concentración de macromoléculas. Ésta es impresionante, ya que se ha calculado que aproximadamente el 40 % del volumen intracelular está dado por proteínas y ARN (Minton, 2001) (Figura 2). Específicamente se ha calculado que la concentración total de proteína dentro de la célula procariótica es de 200 a 300 g/l, mientras que la concentración de ARN es de 75 a 150 g/l. De esta forma y dependiendo de la fase de crecimiento, el total de la concentración de proteína y ARN en la célula de *Escherichia coli* es de 300 a 400 g/l (Zimmerman, 1991). En una célula eucariótica, como por ejemplo los eritrocitos, se calculó la concentración de la hemoglobina que fue de 350 g/l (Colclasure y Parker, 1991). Por lo tanto, éstas son las concentraciones que se emplean cuando se trata de simular *in vitro* las condiciones *in vivo*.

La información anterior ilustra de manera importante que en un ambiente heterogéneo y complejo tal como el citoplasma, la aglomeración macromolecular es seguramente un factor que está relacionado con las velocidades de reacción y equilibrio de los eventos que ocurren en el espacio intracelular (Minton, 1983, 2001; Ellis y Minton, 2003). Además es muy posible que la aglomeración macromolecular favorezca una asociación no específica entre las moléculas que se encuentran en el citoplasma. Si tales interacciones ocurren en el espacio intracelular, se esperaría que éstas afecten alguna de las propiedades fundamentales de las proteínas.

Todos los cambios que afectan el estado de equilibrio de una reacción son predecibles. De acuerdo con el principio de Le Chatelier, el cual menciona que si en un sistema en equilibrio se altera cualquiera de los factores que influyen en una reacción química, dicho sistema se modificará hasta que alcance un nuevo equilibrio. En principio, esto implica que las interacciones entre distintas proteínas pueden alterar el equilibrio entre el estado desplegado y plegado de una proteína.

Con base en este principio, en el presente trabajo se propuso que si en la ruta de repliegamiento de una proteína se altera el equilibrio entre su estado plegado y desplegado por interacción con alguno de los componentes o intermediarios de la reacción, se debe alterar el equilibrio de la reacción. Para examinar esta hipótesis se estudió el efecto de ocho proteínas diferentes en la reactivación de la enzima homodimérica triosafosfato isomerasa.

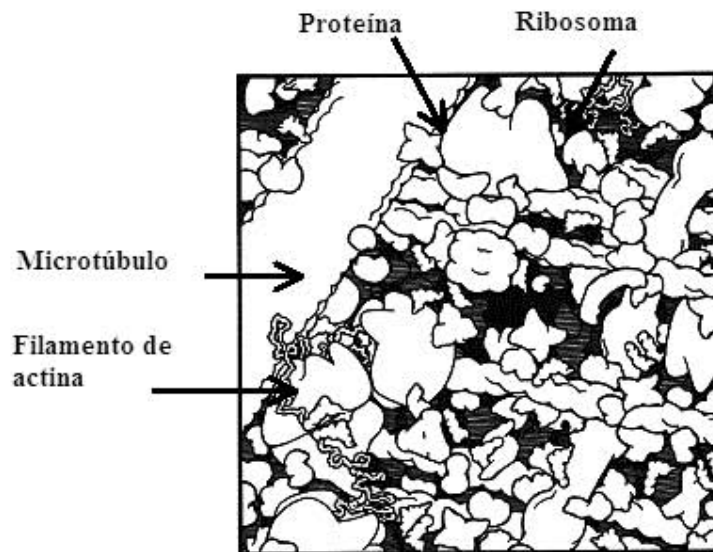
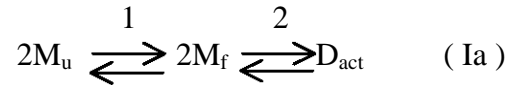


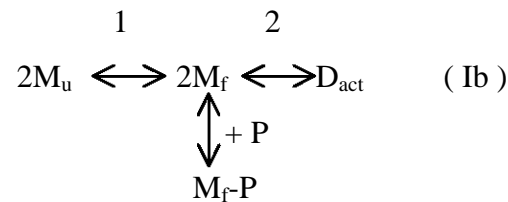
Figura 2. Representación del ambiente intracelular de una célula eucarionte. El 40 % del citoplasma está ocupado por proteínas y ARN (Ellis, 2001).

HIPÓTESIS

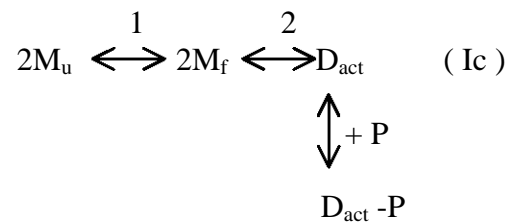
Si se considera la ruta de plegamiento (Esquema Ia) de una proteína dimérica partiendo de monómeros desplegados (M_u), cuando éstos se plieguen y asocien para formar dímeros activos (D_{act}) se llegará a un equilibrio,



De esta manera cuando se añada al sistema una molécula (P) que se pueda unir a los monómeros plegados, se esperaría que para ajustarse al nuevo equilibrio la cantidad de dímeros activos disminuya (Esquema Ib),



De la misma forma, si la molécula añadida se une a dímeros activos, entonces el equilibrio se desplazará hacia la derecha para contrarrestar el cambio, dando como resultado un incremento en la formación de dímeros activos (Esquema Ic).



En resumen, si en la ruta de plegamiento de una proteína dimérica se introduce una proteína que se una al estado nativo, el equilibrio se desplazará hacia la derecha incrementando su concentración. Por el contrario, si la proteína se une a un intermediario, entonces el nuevo equilibrio ocasionaría una disminución en la formación del estado nativo.

Para estudiar esta hipótesis se analizó la ruta de replegamiento de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) en presencia de ocho proteínas que difieren drásticamente en sus características físico-químicas. Los estudios se hicieron a concentraciones de proteína inferiores a las que se encuentran en condiciones de aglomeración macromolecular.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de las interacciones proteína-proteína en la formación y estabilidad de la estructura nativa de la triosafosfato isomerasa (TIM).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de proteínas con distintos pesos moleculares y puntos isoeléctricos en la reactivación de la TbTIM.
2. Determinar el mecanismo de acción de las diferentes proteínas en la ruta de replegamiento de la TbTIM.
3. Determinar la especificidad de la acción de las distintas proteínas en la TIM de diferentes especies.
4. Determinar la energética de la interacción proteína-proteína.

A continuación se describen algunas características de la TIM, así como los trabajos en que se ha estudiado su plegamiento a partir de monómeros desnaturalizados.

LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

A. MODELO DE ESTUDIO

Se eligió como modelo de estudio a la enzima homodimérica triosafosfato isomerasa debido a que:

- Están descritas las secuencias de aminoácidos de más de 150 TIMs y la estructura cristalográfica de 18 TIMs de distintas especies. La TIM es una enzima homodimérica.

- Para detectar asociación o disociación de las subunidades de la enzima existe una característica de la enzima que es de utilidad para nuestros estudios: la enzima sólo es activa en la conformación dimérica.
- La ruta de reactivación de distintas TIMs a partir de monómeros desplegados se han estudiado con mucho detalle (McVittie *et al.*, 1977; Rietveld y Ferreira, 1998; Gao *et al.*, 1998; Gokhale *et al.*, 1999; Chánez-Cárdenas *et al.*, 2002; Zomosa-Signoret *et al.*, 2003; Chánez-Cárdenas *et al.*, 2005). Las condiciones de desnaturalización y reactivación están definidas, así como el valor de la reactivación máxima. Además, se conocen las velocidades de los distintos pasos de la ruta de reactivación.
- El ensayo para medir la actividad está muy bien definido y es relativamente fácil de realizar.
- Los sistemas de clonación, sobreexpresión y purificación están reportados.

La reactivación de la TIM a partir de monómeros desplegados y la estabilidad del dímero activo se estudiaron bajo la influencia de ocho proteínas. Estas se eligieron debido a que tienen diferente punto isoeléctrico y tamaño (Tabla 1). Arbitrariamente se consideraron como representativas de las proteínas intracelulares.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico (teórico)
ribonucleasa A tipo VI de páncreas de bovino	13	9.6
citocromo <i>c</i> de corazón de caballo	13	10.6
lisozima de huevo de gallina, grado I	16	10.7
deoxirribonucleasa II de bazo de bovino	40	8.0
ovoalbúmina tipo VII	43	4.5

hexocinasa tipo IV de levadura de pan, libre de proteasa	54	4.0
albúmina de bovino fracción V libre de ácidos grasos	66	4.7
alcohol deshidrogenasa de hígado de equino	141	8.7

Tabla 1. Proteínas que se eligieron para estudiar su efecto en la reactivación de la TIM.

B. ESTRUCTURA GENERAL DE LAS TIMs.

La enzima triosafosfato isomerasa (TIM) es un homodímero formado por dos subunidades de aproximadamente 27 kDa. Corresponde a la clase de enzimas con estructura tipo barril α/β . En el caso de organismos hipertermófilos (*Methanothermus fervidus*, *Thermotoga maritima*), la TIM es un homotetrámero (Kohlhoff *et al.*, 1996; Schurig *et al.*, 1995; Beaucamp *et al.*, 1997). Las hojas beta y las hélices alfa se encuentran unidas por medio de asas o giros, que juegan un papel importante en el funcionamiento de la enzima. Cada monómero está compuesto de ocho hélices alfa que rodean a ocho hebras beta, y cada uno contiene un sitio activo completo que se localiza cerca de la interfaz entre las dos subunidades (Wierenga y Noble, 1992a) (Figura 3A).

La enzima sólo es activa cuando se encuentra como dímero (Waley, 1973; Zabori *et al.* 1980; Zomosa-Signoret *et al.*, 2003). En el dímero, los monómeros funcionan independientemente y no se ha observado cooperatividad entre las dos subunidades. Se ha descrito que la presencia de la otra subunidad es necesaria en la orientación de los residuos del sitio activo (Wierenga y Noble, 1992a). El asa 3 juega un papel importante en la formación de la estructura dimerica de la enzima; rodea al residuo Cys 14 (posición de la Cys en la TbTIM) de la otra subunidad y forma la mayor parte de los contactos inter-subunidad (Wierenga *et al.*, 1991; Hernández-Alcántara *et al.*, 2002). Cabe mencionar que la secuencia de aminoácidos del asa 3 es relativamente conservada en todas las especies estudiadas (Swinkels *et al.*, 1986) (Figura 3B).

El asa 6 es muy flexible y juega un papel importante en el proceso catalítico. Cuando el

substrato se une, este asa se pliega sobre el sitio activo, lo cual evita la eliminación del grupo fosfato durante la catálisis (Wierenga y Noble, 1992a; Wierenga y Noble, 1992b).

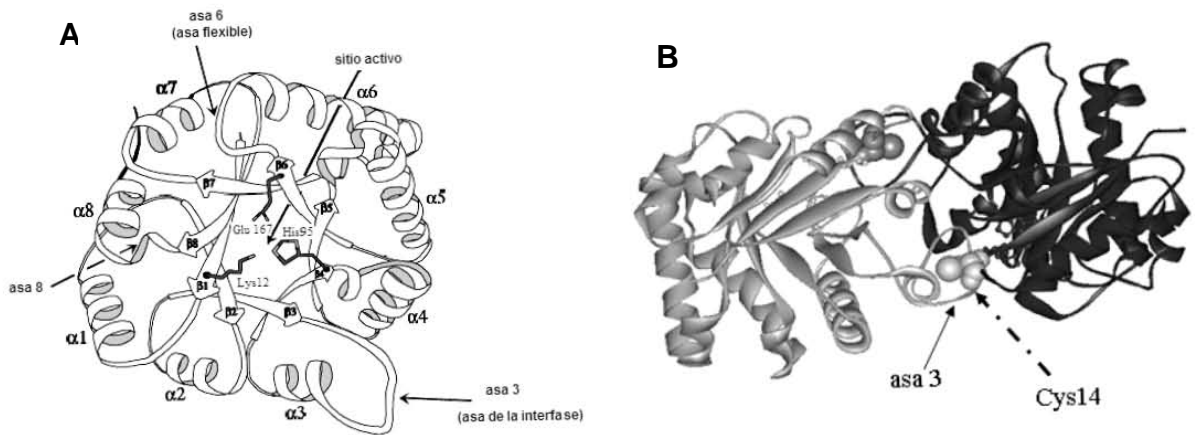


Figura 3. Estructura de la enzima triosafosfato isomerasa. A: Esquema de un monómero en el cual se muestra la estructura del barril α/β . En el centro del barril se localizan los residuos que conforman el sitio catalítico de la enzima. Los residuos catalíticos de la TIM de *Trypanosoma brucei* son: Lys13, His95, Glu167. B, Dímero de la TIM; cada subunidad está representada en diferente intensidad; el asa 3 y el residuo Cys14 son los componentes principales de la zona de contacto entre los monómeros (interfaz). La Figura A se tomó del trabajo de Wierenga y colaboradores (1992c).

C. MECANISMO CATALITICO EN LA INTERCONVERSION DE GAP \leftrightarrow DHAP.

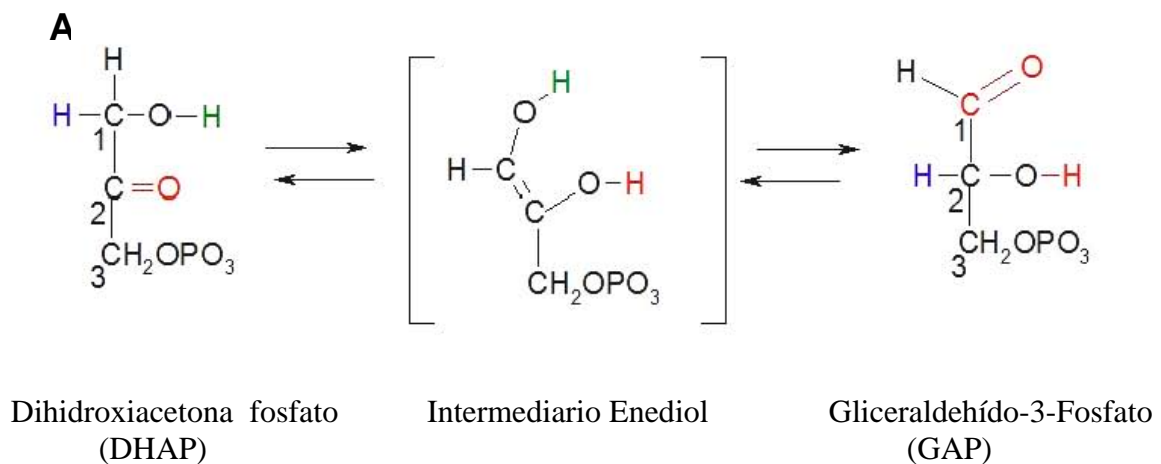
La TIM cataliza la protonación y desprotonación en la interconversión entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído 3-fosfato (GAP) (Albery y Knowles, 1976; Knowles, 1991). Knowles (1991) demostró que la TIM es una enzima perfecta, debido a que la velocidad de la reacción bimolecular entre la enzima y el substrato está limitada solamente por la difusión de los substratos, y no se debe a rearrreglos químicos entre los substratos y la enzima (Blacklow *et al.*, 1988).

La isomerización reversible entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído 3-fosfato (GAP) depende en parte de la flexibilidad del asa 6. El asa 6 en la TIM consiste de 11 residuos (166-176) que son altamente conservados en numerosos organismos. La flexibilidad del asa 6 conduce a dos conformaciones, llamadas abierta y cerrada. Cuando se encuentra en la

conformación abierta, el sitio activo se expone al solvente permitiendo la unión del sustrato o la liberación del producto. En la conformación cerrada, el asa 6 provee un ambiente apropiado al sitio activo para que ocurra la catálisis (Lodi y Knowles, 1993; Williams y McDermott, 1995) estabilizando el estado de transición.

Los residuos que participan en la catálisis son totalmente conservados. La numeración en la secuencia de aminoácidos del sitio activo varía dependiendo de la especie. Los residuos del sitio activo de la TbTIM son Lys13, His 95 y Glu 167. El mecanismo catalítico de la TIM se puede resumir de la siguiente manera: 1) unión del sustrato DHAP. 2) La extracción de un protón del sustrato por el Glu167, lo cual da lugar a la formación del intermediario cis-enediol. 3) La protonación de las especies de enediolato por un ácido general para la formación del producto GAP (Knowles, 1991) (Figura 4A y 4B).

La isomerización de DHAP y GAP se lleva a cabo a través del enediol. Este intermedio es muy inestable y puede sufrir la eliminación de un grupo fosfato para producir fosfato inorgánico y metilglioxal. La TIM evita esta reacción lateral por el plegamiento del asa 6 sobre el sitio activo cuando el sustrato se une (Richard, 1984).



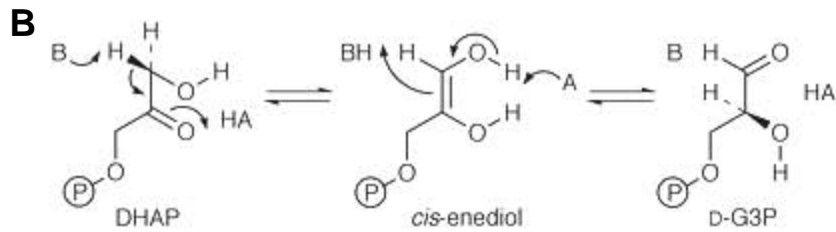
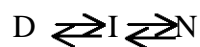


Figura 4. Reacción catalizada por la enzima triosafosfato isomerasa. A, la interconversión de DHAP y GAP mediante la actividad catalítica de la TIM involucra un intermediario enediol. B, un grupo catalítico B atrae el protón pro-R en C-1 de DHAP, asistido por un grupo catalítico ácido HA para producir un enediol como intermediario. Este intermediario se colapsa para originar el producto GAP y regenerar la enzima.

D. PLEGAMIENTO DE LA TIM.

El plegamiento es el proceso por el cual una proteína no estructurada alcanza su estructura nativa. La mayoría de las proteínas pueden llevar a cabo sus funciones únicamente si al plegarse adquieren dicha estructura. La estructura tridimensional de las proteínas depende de su estructura primaria. Este hecho se demostró por el gran número de proteínas que pueden renaturalizarse espontáneamente a partir de la proteína desnaturalizada, fenómeno que fue descrito inicialmente por Anfinsen (1961). Las rutas de plegamiento de distintas proteínas son diferentes; sin embargo, la formación de las estructuras nativas está gobernada por las mismas interacciones físicas dando lugar a estructuras nativas que tienen características comunes (Jaenicke, 1999). Supuestamente la formación de estructuras nativas *in vivo* debe de ser de un 100%. Sin embargo, varias observaciones indican que en muchas proteínas tanto *in vitro* como *in vivo* existen plegamiento y ensamblaje incorrectos (Hurtley y Helenius, 1989; Pelham, 1989). Cuando el plegamiento *in vivo* se acompaña de un incremento de conformeros mal plegados, la producción de estructuras nativas se reduce (Jaenicke, 1991).

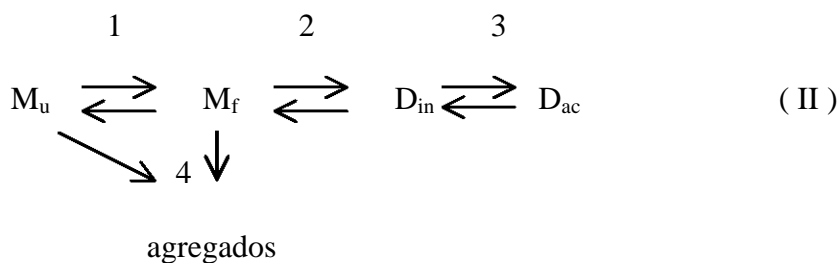
Un gran número de proteínas desempeñan su actividad biológica cuando adquieren una estructura dimerica. Algunos de los dímeros se pliegan en un mecanismo de tres estados:



donde D indica las cadenas desnaturalizadas por acción de un agente caotrópico, por temperatura, o bien cuando salen del ribosoma. I representa un intermediario que puede detectarse en la ruta de plegamiento, que puede ser el monómero plegado o un oligómero inactivo. N corresponde a la estructura nativa en la cual las subunidades o monómeros se encuentran asociadas, como por ejemplo en la enzima homodimérica triosafosfato isomerasa.

Existen diversos trabajos que describen la ruta de plegamiento de la TIM de diferentes especies. En la ruta de replegamiento de la TIM se ha observado que existe una reacción unimolecular y otra bimolecular (Zabori *et al.*, 1980; Zomosa-Signoret *et al.*, 2003). Waley (1973) demostró por medio de experimentos de desnaturalización y reactivación de la TIM que a bajas concentraciones de la proteína, la dimerización llega a ser el paso limitante de la velocidad en la formación de la proteína nativa. En la TIM de levadura (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000; Nájera *et al.*, 2003) y de tripanosomátidos (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002; Zomosa-Signoret *et al.*, 2003; Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005) se han detectado intermediarios en el proceso de reactivación.

La ruta de replegamiento de la TIM puede esquematizarse de la siguiente manera:



donde M_u indica monómero desplegado, M_f significa monómero plegado, D_{in} se refiere a dímero inactivo y D_{ac} es dímero activo.

Los estudios sobre la renaturalización de la TIM desde sus monómeros desplegados en hidrocloreuro de guanidinio muestran que en la formación del dímero activo, el plegamiento de

monómeros precede el paso de asociación. La cinética de reactivación a diferentes concentraciones de proteína muestra que el proceso incluye tres reacciones: plegamiento de monómeros, asociación de monómeros plegados y transición de dímeros inactivos a dímeros activos. En la secuencia de reacción de la reactivación de la TIM existen dos reacciones unimoleculares, el plegamiento del monómero y la transformación de dímero inactivo a activo. A concentraciones de proteínas relativamente bajas, el paso limitante de la reactivación es la reacción de asociación; mientras que a altas concentraciones de proteína, la transición de dímeros inactivos a dímeros activos es el paso limitante (Waley, 1973; Zabori, 1980; Gao *et al.*, 1998; Zomosa-Signoret, *et al.*, 2003). La reacción 4 del Esquema trata de ilustrar que el proceso de reactivación se puede acompañar de la formación de agregados o estructuras incorrectas. Los monómeros presentan zonas hidrofóbicas expuestas al solvente que pueden ser regiones de contacto con otros monómeros mal plegados originando agregados (Jaenicke, 1995; Jaenicke y Lilie, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas. La sobreexpresión y purificación de la enzima triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM), *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), *Leishmania mexicana* (LmTIM) y *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM), se realizó como se indica la literatura (Borchet *et al.*, 1993; Ostoa-Saloma *et al.*, 1997; Kohl *et al.*, 1994; Vázquez-Contreras *et al.*, 2000; respectivamente). Las TIMs se clonaron en el plásmido pET3a y se sobreexpresaron en células de *Escherichia coli* (BL21(DE3)pLysS) diferenciándose sólo en los sitios de corte para las enzimas de restricción (Tabla 2):

Especie (TIM)	Sitios de corte para enzimas de restricción
<i>Leishmania mexicana</i> (LmTIM)	NdeI-BamHI
<i>Trypanosoma cruzi</i> (TcTIM)	NdeI-BamHI
<i>Trypanosoma brucei</i> (TbTIM)	NdeI-NdeI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ScTIM)	NdeI-NdeI

Tabla 2. Sitios de corte para enzimas de restricción localizados en el plásmido pET3a para la clonación de la TIM.

El plásmido contiene un gene que le confiere resistencia a la ampicilina, lo que permite la identificación de las células que portan el vector (apéndice I). Por esta razón, antes de inocular el medio de cultivo se adicionó ampicilina a una concentración final de 10 µg/ml. Un precultivo de medio Luria-Bertani (50 ml) crecido a 37°C (para un litro de medio, bacto-triptona 10 g, extracto bacto-yeast 5 g, NaCl 10 g, pH 7.5) se usó para inocular un litro del mismo medio a una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.06, aproximadamente. Las células crecieron a 37°C y cuando se obtuvo una densidad óptica de 0.9, se indujo la sobreexpresión con isopropil-tio-β-D-galactósido (IPTG) (0.4 mM). El crecimiento celular se continuó por 12 horas a 30°C. Se realizó una centrifugación a 4260 x g, por 15 minutos a 4° C. Las células se resuspendieron en 40 ml del amortiguador de lisis (ácido 2-N-morfolino-etanosulfonato, 25 mM, EDTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM, fenilmetanosulfonil fluoruro 0.2 mM (en dimetil sulfóxido), pH 8.0 y se lisaron por sonicación. El lisado se centrifugó a 17 000 x g por 1 hora a 4° C. El sobrenadante se precipitó con 45 % de sulfato de amonio durante tres horas a 4° C. En el caso de la TbTIM, como la enzima se encuentra unida a las membranas, el precipitado obtenido de la centrifugación a 17 000 x g se resuspendió en el amortiguador de lisis con NaCl (200 mM) manteniendo agitación constante durante 30 minutos a 4° C; después se centrifugó a 17 000 x g por 20 minutos a 4° C. El sobrenadante se precipitó con 45 % de sulfato de amonio durante tres horas a 4° C. Las

soluciones precipitadas con 45 % de sulfato de amonio se centrifugaron a 17 000 x g a 4° C por 20 minutos, y el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 75 % a 4°C. Después de 12 horas, las muestras se centrifugaron nuevamente a 17 000 x g durante 15 minutos a 4° C y el precipitado se resuspendió en 2 ml de (trietanolamina 25 mM, azida de sodio 1 mM, EDTA 2 mM, ditiotreitól 1 mM, pH 8.0) y se aplicó a la columna. La columna que se empleó para cada TIM se indica en la Tabla 3.

En la cromatografía de exclusión molecular, las fracciones que contenían a la TIM se concentraron hasta 3 ml, y se aplicaron a la columna de intercambio iónico. En la cromatografía de intercambio iónico se empleó un gradiente de NaCl de 0 a 150 mM. Las enzimas eluyeron con 150 mM de NaCl. Para identificar las fracciones que contienen la enzima, se monitorearon por absorbancia a 280 nm y posteriormente por medidas de actividad.

Para verificar la pureza de la proteína, las fracciones se analizaron en geles de SDS-PAGE (12%) (Apéndice III). Las fracciones con proteína pura se mezclaron. Para corroborar que la enzima no presentaba alteración en su conformación nativa, se analizó la actividad específica (Tabla 4) de la enzima con el método que se describe en el ensayo de actividad. Las enzimas purificadas se mantuvieron en suspensión a 4° C con 75 % de sulfato de amonio. Para los experimentos, la suspensión se centrifugó y el precipitado se disolvió en trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4 (amortiguador TEA-EDTA) y dializó contra el mismo amortiguador (250 ml). Se realizaron tres cambios de amortiguador, los dos primeros cada tres horas y el tercer cambio se mantuvo toda la noche.

Especie (TIM)	Columna	Fracciones	Flujo (ml/min)
<i>Leishmania mexicana</i> (LmTIM)	Dietilaminoetil celulosa (DEAE) Sepharose	Antes de iniciar el gradiente: 4 ml En el momento de iniciar el gradiente: 1 ml	0.5
<i>Trypanosoma cruzi</i> (TcTIM)	Sephadex G-100 Carboximetil – Sepharose (CM)	4 ml Antes de iniciar el gradiente: 4 ml En el momento de iniciar el gradiente: 1 ml	0.5 0.5

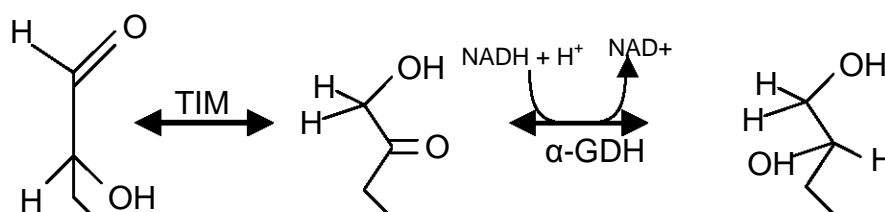
<i>Trypanosoma brucei</i> (TbTIM)	Carboximetil – Sepharose (CM)	Antes de iniciar el gradiente: 4 ml En el momento de iniciar el gradiente: 1 ml	0.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ScTIM)	Sephacryl S-300	1 ml	0.5
	MonoQ	Antes de iniciar el gradiente: 4 ml En el momento de iniciar el gradiente: 1 ml	0.5

Tabla 3. Columnas para cromatografía que se emplearon en la purificación de la TIM de diferentes especies.

Especie (TIM)	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	pI
<i>Leishmania mexicana</i> (LmTIM)	3762	8.34
<i>Trypanosoma cruzi</i> (TcTIM)	3638	8.19
<i>Trypanosoma brucei</i> (TbTIM)	3422	9.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ScTIM)	7572	5.74

Tabla 4. Actividades específicas y punto isoeléctrico de la TIM de diferentes especies. Las actividades específicas de las TIMs se calcularon empleando el ensayo de actividad que abajo se describe. El punto isoeléctrico se calculó empleando el servidor Expert Protein Analysis System Proteomics (www.expasy.org).

Ensayo de actividad. La actividad se determinó en la dirección de gliceraldehído 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato, a 25° C en 1 ml de mezcla de reacción que contenía amortiguador TEA-EDTA pH 7.4, gliceraldehído 3-fosfato (1 mM), NADH (0.2 mM) y α -glicerol fosfato deshidrogenasa (0.9 unidades) (Apéndice III). La reacción se inició por la adición de la TIM, generalmente 5 ng de proteína. La actividad se determinó al medir la velocidad de transformación de GAP a DHAP, el último se convierte a α -glicerolfosfato por acoplamiento con la enzima α -glicerolfosfato deshidrogenasa (α -GDH) en presencia de NADH. La reacción acoplada consume un mol de NADH por un mol de DHAP que se forma. Con un exceso de α -GDH, la velocidad de producción de DHAP es equivalente a la velocidad de oxidación del NADH, la cual se midió por el cambio de absorbancia a 340 nm en función del tiempo en un espectrofotómetro Hewlett Packard HP8452 (Rozacky *et al.*, 1971) (Esquema III).



(III)

GAP

DHAP

G3P

De acuerdo con la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon cl$), los cambios de absorbancia (A) tienen una relación linear con los cambios de concentración (c), y por lo tanto, las velocidades de reacción pueden calcularse directamente a partir de los datos de absorbancia cuando el coeficiente de extinción molar es conocido (ϵ : $M^{-1} cm^{-1}$).

La forma reducida de NADH tiene un máximo de absorbancia cercano a los 340 nm ($\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$), el cual disminuye al oxidarse para producir NAD^+ (Rozacky *et al.*, 1971). Para convertir el cambio de absorbancia en un minuto ($\Delta D.O./min$) a concentración molar por minuto ($\mu mol/min$), se usó la siguiente ecuación:

$$NADH \text{ oxidado}/min = (\Delta D.O./min) / \epsilon NADH$$

A partir del valor de NADH oxidado/min se obtuvieron las unidades de la enzima y la actividad enzimática. Una unidad de actividad de la reacción acoplada se define como la conversión de 1 μmol de gliceraldehído 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato por minuto y se representó por una disminución en la absorbancia a 340 nm producida por la formación de NAD^+ . La actividad específica se define como unidades por miligramo de proteína (Beisenherz, 1955).

La actividad enzimática se expresó en $\mu mol/min/mg$ y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Actividad específica} = [(\Delta D.O. / min) / 6.22] / mg \text{ de proteína}$$

Proteínas. Las siguientes proteínas se consiguieron en la compañía de Sigma: albúmina de bovino fracción V libre de ácidos grasos, lisozima de huevo de gallina, grado I, alcohol

deshidrogenasa de hígado de equino, deoxirribonucleasa II de bazo de bovino, ribonucleasa A tipo VI de páncreas de bovino, hexocinasa tipo IV libre de proteasa de levadura de pan, ovoalbúmina tipo VII y citocromo *c* de corazón de caballo.

Reactivación de la TIM. La TIM se desnaturalizó al incubarla a una concentración de 500 µg/ml en amortiguador TEA-EDTA y cloruro de guanidinio (6 M) a 25° C durante 1 hora. La reactivación de la TIM desnaturalizada (1µg/ml) se inició al diluir el agente caotrópico (por lo menos 100 veces) en amortiguador TEA-EDTA y cloruro de guanidinio (200 mM como concentración final) a 25° C. Al medio de reactivación se adicionó la proteína por estudiar. Las proteínas que se usaron y su concentración se especifican en el apartado anterior. A los tiempos que se indica en la sección de resultados, se registró la actividad de la TIM.

Estabilidad de la TIM. Se incubaron diferentes concentraciones de TIM nativa (0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2.5 µg/ml y 5 µg/ml) en amortiguador TEA-EDTA a 25° C por 24 horas. Al mencionar TIM nativa, se indica que la TIM nunca estuvo en presencia de cloruro de guanidinio. Cada concentración de TIM se incubó en presencia de cada una de las proteínas que se estudiaron (19 µg/ml) en amortiguador TEA-EDTA a 25° C. A las 24 horas se midió la actividad.

Determinación de la concentración de proteína. La concentración de la proteína se determinó por el método descrito por Pace *et al.* (1995). La absorbancia de una proteína a 280 nm depende del contenido de Trp, Tyr y Cys (puentes disulfuro). Considerando el coeficiente de extinción molecular (ϵ) de cada cromóforo, se calcula el ϵ a 280 nm de la proteína con la siguiente ecuación:

$$\epsilon (280) (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) = (\#\text{Trp}) (5500) + (\#\text{Tyr}) (1490) + (\#\text{Cys}) (125)$$

Para cuantificar la concentración de proteína, se consideró la absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción molecular (ϵ_{280}) de cada TIM, siendo de 34950 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para TbTIM,

33460 M⁻¹ cm⁻¹ para TcTIM, 36440 M⁻¹ cm⁻¹ para LmTIM, 26664 M⁻¹ cm⁻¹ para ScTIM, and 42925 M⁻¹ cm⁻¹ para BSA. La concentración de las otras proteínas se determinó por peso.

Calorimetría de titulación isotérmica (ITC). La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es la técnica usada para medir directamente el calor liberado o absorbido en una reacción de unión intermolecular, por ejemplo, la asociación de proteínas con algún ligando de bajo peso molecular (como iones) o de alto peso molecular (como otras proteínas o ácidos nucleicos) (Velásquez-Campoy *et al.*, 2004; Perozzo *et al.*, 2004; Houbaviy y Burley, 2001). Si el efecto térmico neto de la interacción es suficientemente grande, la estequiometría, la entalpía y la constante de unión de estos complejos pueden determinarse sin ambigüedad. Mediante esta técnica se pueden determinar la constante de unión, $K = [ML] / [M][L]$, el cambio de entalpía, ΔH° , y conociendo estos valores, se puede conocer el cambio de energía de Gibbs, $\Delta G = -RT \ln K$, y la entropía del proceso ΔS , $\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T$. R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta en grados Kelvin.

En principio cualquier interacción libera o absorbe calor. Este flujo de calor se mide directamente a presión constante, es decir, se cuantifica el valor real de la entalpía de la reacción. Esta es una ventaja con respecto a las medidas de entalpía aparente deducidas de la dependencia de la constante de asociación con la temperatura (ecuación de van't Hoff). Mediante ITC es posible realizar una caracterización completa de una interacción intermolecular, siendo la única técnica que proporciona simultáneamente la estequiometría y los parámetros termodinámicos (Fisher y Singh, 1995; Indyk y Fisher, 1998).

El calorímetro de titulación (Figura 5) contiene dos celdas compuestas de un material que conduce el calor con alta eficiencia (Hasteloy u oro). En una celda se coloca la muestra y la otra celda es de referencia. Una solución del ligando se coloca en la jeringa y se inyecta a la celda que contiene la muestra. Al unirse el ligando se genera o absorbe calor, entonces incrementa o

disminuye la temperatura en la celda. La diferencia de temperatura entre las dos celdas se disipa rápidamente debido a que las celdas están en contacto con un bloque mediante un termosensor. Este cambio de temperatura resulta en una diferencia de voltaje. La temperatura del sistema se mantiene constante por medio del bloque de metal y una cubierta interna adiabática, que rodea las celdas. Esto es de gran importancia, debido a que la diferencia de temperatura medida entre las dos celdas puede tener un valor tan pequeño como 10^{-6} °C (Fisher y Singh, 1995; Indyk y Fisher, 1998).

La celda de la muestra tiene una capacidad de 1.5 ml y la jeringa de 0.3 ml. Generalmente se aplican sucesivamente de 10 a 25 inyecciones de 10 a 15 μ l. El calor absorbido o producido durante una titulación calorimétrica es proporcional a la cantidad de ligando que se une. Para las inyecciones iniciales si la afinidad de la proteína por el ligando es alta, todas o la mayor cantidad de moléculas del ligando se unen produciendo una señal endotérmica o exotérmica dependiendo de la naturaleza de la asociación. Al incrementar la concentración del ligando, las macromoléculas se saturan y subsecuentemente el calor disminuye. Después de que regresa la señal al valor de la línea base y se mantiene constante, se realiza otra inyección de la solución del ligando. Las inyecciones se hacen hasta que no se detectan cambios térmicos, indicando que todos los sitios de unión están ocupados por el ligando (Fisher y Singh, 1995; Indyk y Fisher, 1998).

Para corroborar la interacción entre TbTIM con otra proteína, por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se determinó el cambio de entalpía que ocurre cuando la TbTIM contacta a otra proteína. Para realizar este tipo de experimentos, se debe determinar la concentración de las proteínas con la cual se obtiene una señal calorimétrica detectable y reproducible. Este análisis se realizó con BSA y lisozima. Desde los primeros experimentos se observó que la interacción entre TbTIM con BSA es débil. Se llevaron a cabo algunos experimentos para encontrar las condiciones en las cuales los datos obtenidos podrían ser

confiables. Por esto fue necesario usar concentraciones altas de proteína, de lo contrario los cambios de entalpía eran imperceptibles. Sin embargo, de acuerdo con algunos reportes la BSA y la lisozima se asocian consigo mismas a concentraciones altas de proteína (Maruyama *et al.*, 2001; Banerjee *et al.*, 1975). Por lo que fue necesario encontrar una concentración de proteína en la cual el calor de dilución no enmascarara el cambio de calor que resulta de la interacción de dos proteínas. Ya que los datos con lisozima fueron mejores que con BSA, los experimentos se realizaron con esta enzima. Con las otras proteínas, el costo de los experimentos resultaba muy elevado.

Para calcular el calor neto de la interacción de la TbTIM con la lisozima fue necesario conocer el calor producido por la dilución de TbTIM (jeringa) en el amortiguador TEA-EDTA (celda), y el calor de dilución producido por la adición del amortiguador en una solución de lisozima (0.7 mM) (celda). Este último es absolutamente necesario debido a que la lisozima puede asociarse consigo misma (Banerjee *et al.*, 1975) y una pequeña dilución puede ir acompañada de cambios térmicos importantes.

Para nuestros propósitos, las mejores condiciones fueron: colocar en la celda una solución de lisozima a 10 mg/ml (0.7 mM) en amortiguador TEA-EDTA. A esta solución se aplicaron cinco inyecciones de 15 µl de TbTIM a una concentración de 17 mg/ml (0.354 mM de dímeros). El calor de dilución se registró al inyectar volúmenes idénticos de la enzima al amortiguador sin lisozima. Los experimentos del presente trabajo se hicieron a 25° C en un calorímetro de titulación isotérmica de alta precisión VP-ITC (Microcal Inc.).

A

B

sensor

tornillo

sensor

inyector

émbolo

agitador

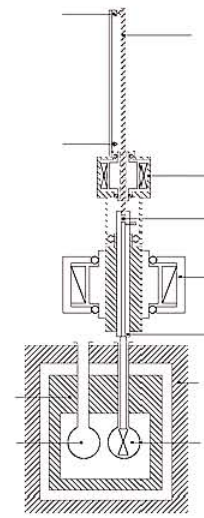
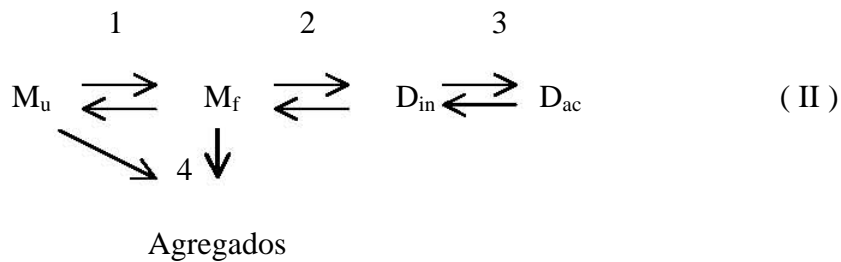


Figura 5. Sistema de Calorimetría de Titulación Isotérmica. A: Equipo de para realizar ITC. B: Diagrama del instrumento para ITC. Antes de incorporar la jeringa a la celda se introdujo el ligando y se purgó para eliminar la presencia de burbujas que pueden interferir en el experimento. Para obtener una línea base, la jeringa se mantuvo en agitación constante durante la calibración así como en el experimento.

RESULTADOS

Efecto de la BSA en la reactivación de la TbTIM. De acuerdo con el Esquema II, la reacción 2 es dependiente de la concentración de proteína; es decir, a mayor concentración de proteína se incrementa la velocidad de asociación de monómeros, y por lo tanto la formación de dímeros.



M_u es monómero desplegado, M_f monómero plegado, D_{in} dímero inactivo y D_{ac} dímero activo.

Esto se demostró en el trabajo de Zomosa-Signoret *et al.* (2003), quienes observaron que la velocidad y el valor máximo de reactivación de la TbTIM aumentó con la concentración de proteína, alcanzándose un valor de reactivación del 50 % cuando se reactivaron 5 $\mu\text{g/ml}$ de TbTIM; se supone que el otro 50 % de la proteína forma agregados y/u otras estructuras incorrectas. Los resultados de la Figura 6A muestran que a concentraciones de TbTIM

relativamente bajas (1 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$) sólo un 20% de la enzima adquiere su estructura nativa, lo que está de acuerdo con lo observado por Zomosa-Signoret *et al.* (2003). A concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, la reactivación fue aun menor. Sin embargo, cuando la reactivación de la TbTIM se midió en presencia de BSA se observó un incremento en la formación de dímeros activos. A concentraciones de 0.5, 1 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de TbTIM, el efecto de la BSA incrementó hasta 2.5 veces la reactivación alcanzando un valor entre 40 y 55%. El valor máximo de reactivación se obtuvo con 19 $\mu\text{g/ml}$ de BSA (Figura 6B).

En la mayoría de los trabajos en los que se ha visto que la BSA incrementa la reactivación se han utilizado concentraciones del orden de mg/ml para simular la aglomeración macromolecular que existe en la célula (Rivas *et al.*, 1999; van den Berg *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2004) (ver Antecedentes).

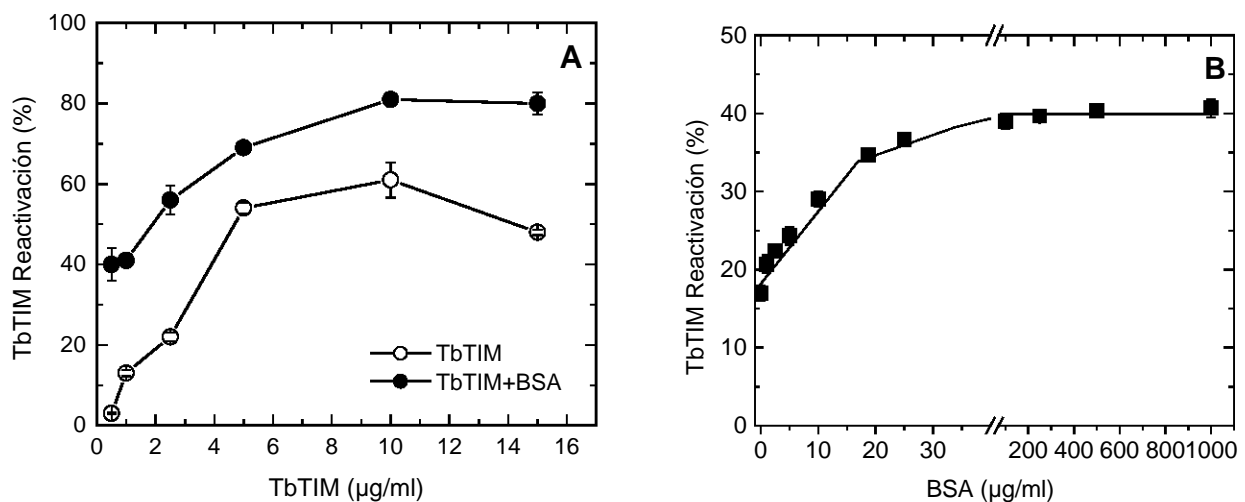


Figura 6. Efecto de la BSA en la reactivación de TbTIM. A: reactivación de diferentes concentraciones de TbTIM con 19 $\mu\text{g/ml}$ de BSA. El 100% de actividad fue: 3353 $\mu\text{g/min/mg}$. B: Reactivación de 1 $\mu\text{g/ml}$ de TbTIM con diferentes concentraciones de BSA. El 100% de actividad fue: 3488 $\mu\text{g/min/mg}$. Cada punto es el promedio de tres experimentos con una desviación estándar que va del 0.8 al 4 %, y corresponde a una medición de la actividad que se observó después de 24 horas de reactivación.

Reactivación de TbTIM a lo largo del tiempo en presencia y ausencia de BSA. Para conocer en cuál etapa de la ruta de replegamiento la BSA actúa para beneficiar la formación de dímeros activos, se midió la reactivación de la TbTIM a lo largo del tiempo. Con base en los resultados que se presentan en la Figura 6A, se decidió reactivar 1 $\mu\text{g/ml}$ de TbTIM, debido a que la diferencia de reactivación es aproximadamente de tres veces en ausencia y presencia de BSA (19 $\mu\text{g/ml}$). En ausencia de BSA, la enzima alcanzó su reactivación máxima a los 20 minutos, a partir de este momento la cantidad de dímeros activos que se formaron se mantuvo constante en un valor de alrededor de 13 %.

En presencia de BSA la magnitud de la reactivación fue similar al control en los primeros minutos, pero a partir de los 20 minutos se observó que el número de dímeros continuó aumentando hasta alcanzar un valor de aproximadamente 49 % (Figura 7A).

A partir de estos datos, se calcularon las velocidades de reactivación. Tomando como 100% el valor de reactivación máximo obtenido a las 24 horas con y sin BSA, se calculó la constante de velocidad de pseudoprimer orden al graficar el logaritmo natural de aparición de la actividad contra el tiempo. En ambas condiciones se obtuvo una recta, la constante de velocidad de pseudoprimer orden fue de 0.128 min^{-1} en presencia de BSA y 0.017 min^{-1} para el control (Figura 7B). En relación a estos datos, vale la pena señalar que hay pocos reportes sobre la velocidad de reactivación. Lilie *et al.* (1993) reportaron que en condiciones de no aglomeración, la BSA no altera la velocidad de reactivación, sólo incrementa la formación del fragmento Fab del anticuerpo MAK33. También se ha observado que el sistema GroE incrementa la producción de estructuras nativas, y que altera la velocidad del proceso (Coyle *et al.*, 1999; Goloubinoff *et al.*, 1989).

Para conocer si la BSA incrementa la formación de dímeros activos en los tiempos en que la reactivación llegó al máximo en ausencia de BSA, se decidió investigar si la BSA incrementa

la formación de dímeros activos después de que la TbTIM se reactivó. En estos experimentos 1 $\mu\text{g/ml}$ de la enzima se reactivó y a diferentes tiempos se adicionaron 19 $\mu\text{g/ml}$ de BSA. En la Figura 8 se observa que agregar BSA al tiempo cero y después de una hora, el incremento producido es similar. Sin embargo, conforme aumenta el tiempo de reactivación, el efecto de la BSA disminuyó. Esto indica que existen dos tipos de estructuras incorrectas: las que se pueden transformar a dímeros activos por BSA y los que no. Esto también indicó que la BSA actúa después de que los monómeros se han plegado. Es importante mencionar que los monómeros se pliegan durante el primer minuto de la reactivación.

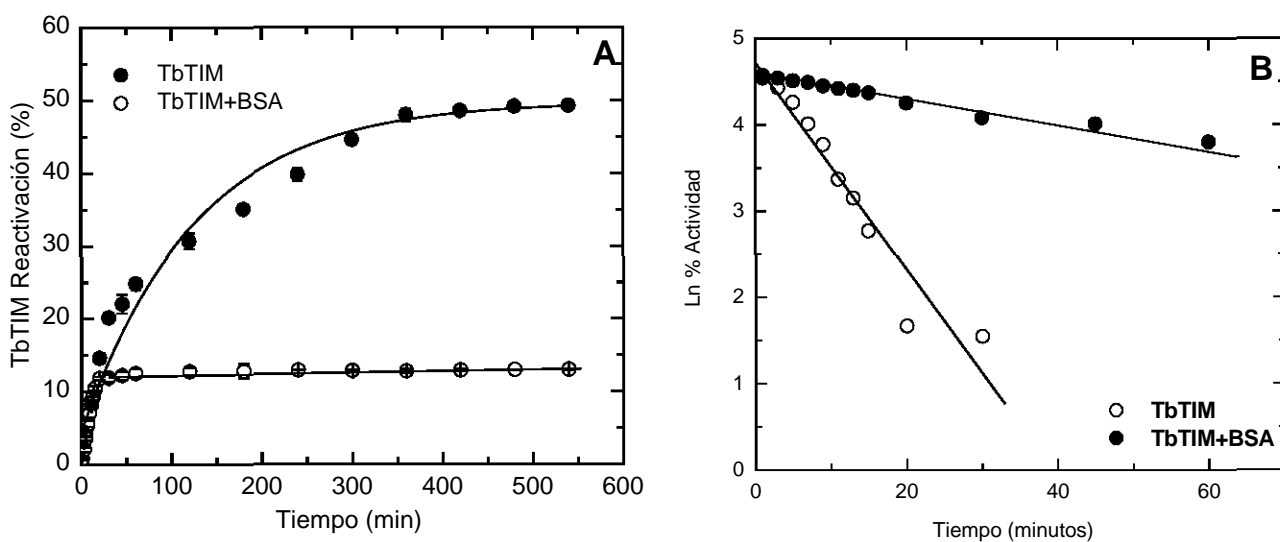


Figura 7. Reactivación de la TbTIM en función del tiempo. A: reactivación de 1 $\mu\text{g/ml}$ TbTIM en ausencia y presencia de 19 $\mu\text{g/ml}$ de BSA. La reactivación de TbTIM en ausencia de BSA alcanza su valor máximo a los 20 minutos, mientras que con BSA tarda aproximadamente 8 horas para alcanzar dicho valor. El 100% corresponde a la actividad de la TbTIM nativa, 3391 $\mu\text{mol/min/mg}$. B: Para obtener la constante de velocidad de pseudoprimer orden se graficó el \ln de la actividad versus el tiempo, donde $\ln = (\text{Actividad máxima alcanzada} - \text{actividad al tiempo } x / \text{actividad máxima}) \times 100$.

Los resultados de las Figuras 7A y 8 dieron la pauta para pensar que la BSA puede ayudar a la reactivación de especies mal plegadas que no alcanzan una conformación activa en ausencia de BSA, o que puede rescatar especies monoméricas de los agregados, y que éstos podrían seguir la ruta de reactivación hasta formar un dímero activo. Para saber si la BSA rescata monómeros de los agregados, se reactivó 1 mg/ml de TbTIM por diálisis contra el amortiguador TEA-EDTA

a 4° C. Por este método se obtuvieron cantidades considerables de agregados, los cuales se recuperaron por centrifugación. Posteriormente se resuspendieron en amortiguador TEA-EDTA y BSA 19 µg/ml y se incubaron por 24 horas a 25° C. Después de la incubación se midió la actividad. Los resultados fueron negativos indicando que la BSA no rescata monómeros de los agregados.

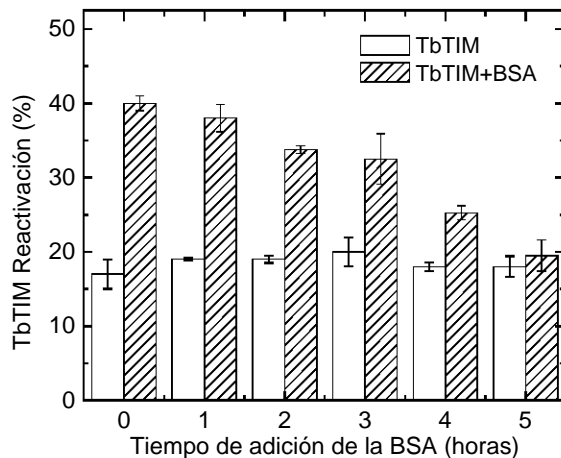


Figura 8. Efecto de la adición de BSA a diferentes tiempos de reactivación. Se reactivó 1 µg/ml de TbTIM y a diferentes tiempos se adicionaron 19 µg/ml de BSA. Los valores promedio corresponden a la actividad registrada en las 24 horas. El 100 % de la actividad fue 3121 µg/min-mg. En estos tiempos, el control, como se demostró en otros experimentos, se mantuvo en un valor constante.

Estabilidad del dímero de TbTIM por BSA. La pregunta que surge de los resultados anteriores concierne el mecanismo a través del cual la BSA incrementa la formación de dímeros activos. De acuerdo a las reacciones del Esquema II, se puede ver que cuando la cantidad de enzima reactivada es constante, los dímeros están en equilibrio con monómeros plegados (reacciones 2 y 3 del Esquema II). Por lo tanto, se pensó que el efecto favorable de BSA desvía el equilibrio entre monómeros plegados y dímeros; es decir, que la BSA podría desviar el equilibrio hacia los dímeros activos al interactuar con ellos.

Esta posibilidad se exploró midiendo la actividad específica de la TIM después de que se incubaron a varias concentraciones con y sin BSA. La razón de los experimentos fue que la incubación de los dímeros a concentraciones menores a su constante de disociación produce un

incremento en la población de monómeros. Debido a que los monómeros de la TIM son inactivos, es de esperar que a bajas concentraciones de TbTIM la actividad específica de la enzima disminuya. De esta manera, si BSA incrementa la estabilidad de los dímeros, se esperaría que a bajas concentraciones de TIM en presencia de BSA la población de dímeros fuera mayor que en su ausencia. Los resultados indicaron que sin BSA la actividad específica disminuye en la medida que se reduce la concentración de proteína, mientras que en presencia de BSA a todas las concentraciones de TbTIM la actividad específica se mantuvo a niveles óptimos (Figura 9A). Por lo tanto, los datos indican que la BSA estabiliza al dímero favoreciendo el equilibrio de la reacción hacia los dímeros activos. El efecto estabilizador de la BSA se observó a partir de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 9B).

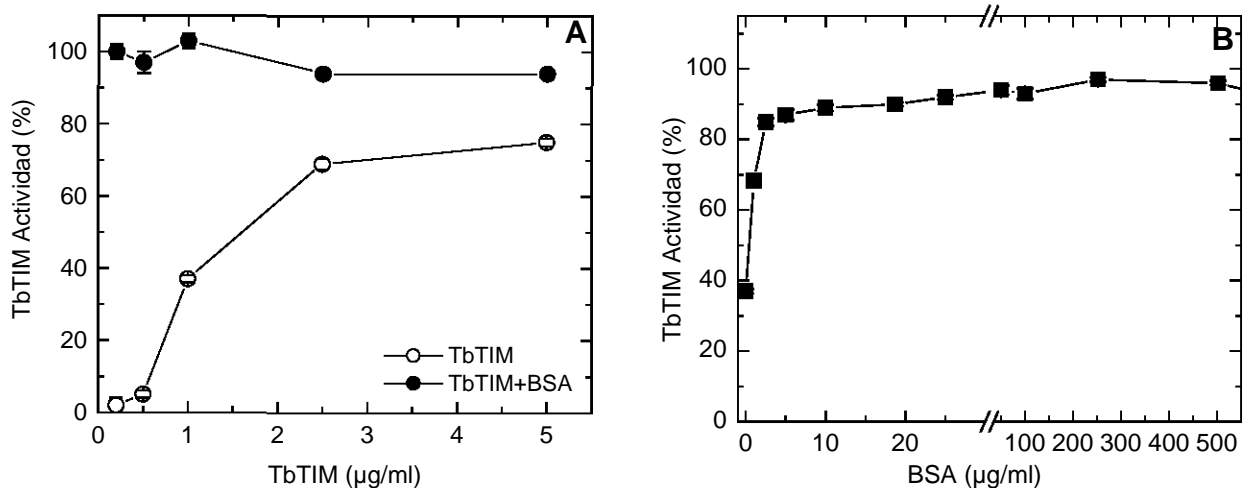


Figura 9. Estabilización del dímero por acción de la BSA. A: Las concentraciones indicadas de la TbTIM nativa se incubaron con y sin 19 $\mu\text{g/ml}$ de BSA; después de 24 horas la actividad se registró. El 100% es la actividad al tiempo cero (3401 $\mu\text{mol/min/mg}$). B: 1 $\mu\text{g/ml}$ de TbTIM se incubó durante 24 horas con las concentraciones indicadas de BSA.

La interacción entre de la TbTIM y otras proteínas favorecen la reactivación y estabilidad de la TbTIM. En un ambiente aglomerado y heterogéneo como es el citoplasma, es muy probable que las proteínas interactúen con otras macromoléculas. Bajo esta suposición y tomando en cuenta los resultados de la Figura 9, se hipotetizó que la interacción entre distintas

proteínas pueden afectar tanto su plegamiento como su estabilidad. Para estudiar esta posibilidad se analizó la reactivación y estabilidad de la TIM en presencia de ocho proteínas diferentes. Los experimentos de reactivación y estabilidad de la TbTIM se llevaron a cabo como se indicó en la sección de métodos. En ambos casos, la concentración de TbTIM fue 1 µg/ml, y la concentración de las otras proteínas fue de 19 µg/ml. Las proteínas que se estudiaron fueron: albúmina de bovino, alcohol deshidrogenasa, deoxirribonucleasa, ribonucleasa A, lisozima, ovoalbúmina, citocromo *c* y hexocinasa (ver Tabla 1). Se encontró que todas las proteínas incrementaron la reactivación de la TbTIM al estabilizar el dímero de la enzima (Figura 10A y 10B), indicando que la TbTIM tiene la capacidad de interactuar con una amplia variedad de proteínas.

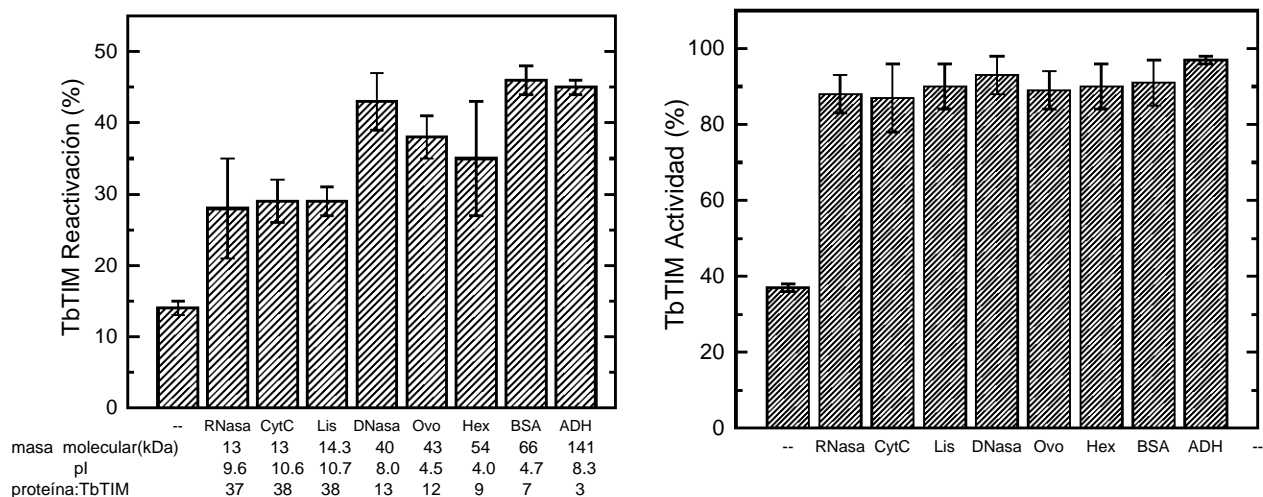


Figura 10. Efecto de diferentes proteínas en la formación y estabilización del dímero activo. A, reactivación de 1 µg/ml de TbTIM en ausencia y presencia de 19 µg/ml de las proteínas indicadas; a las 24 horas se registró la actividad. Con las proteínas de mayor masa molecular se obtuvo la reactivación más alta. B, la TbTIM nativa (1 µg/ml) se incubó a 25°C con y sin las proteínas indicadas (19 µg/ml), a las 24 horas se midió la actividad. Se observó que todas las proteínas estabilizan al dímero. BSA: albúmina de bovino; ADH: alcohol deshidrogenasa; DNasa: deoxirribonucleasa; Ovo: ovoalbúmina; Hex: hexocinasa; Lis: lisozima; CytC: citocromo *c*; RNasa: ribonucleasa A. Los valores corresponden al registro de actividad a las 24 horas. El 100 % de actividad fue para A: 3499 umol/min/mg, para B: 3401 umol/min/mg.

La capacidad de la TbTIM para interactuar con otras proteínas está de acuerdo con los trabajos de varios grupos; por ejemplo, Orosz y colaboradores (2000) vieron que la TIM puede unirse a estructuras celulares, como microtúbulos y membrana celulares. Así mismo, Dhar-

Chowdhury y colaboradores (2005) reportaron que la TIM se une al canal de K_{ATP} y que regula la función del canal. Jung y colaboradores (2002) analizaron el papel del complejo formado entre la cofilina y la TIM en la regulación de la actividad de la Na,K-ATPasa. Walden y colaboradores (2004) reportaron que la TIM de *Thermoproteus tenax* presenta un equilibrio entre dímeros y tetrameros que se desvía hacia la forma tetramérica por la enzima glicerol 1-fosfato deshidrogenasa, y que esto trae como consecuencia un aumento en la estabilidad de la enzima.

Efecto de la BSA en la reactivación de la TIM de varias especies. Con la finalidad de conocer si la BSA actúa únicamente en la TbTIM, se estudió el efecto de las proteínas sobre TIMs de otra especies: *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), *Leishmania mexicana* (LmTIM), *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM). Las enzimas se desnaturalizaron y reactivaron en las mismas condiciones que se emplearon con TbTIM. Se encontró que la BSA incrementa la reactivación en todas las TIMs, indicando que el efecto de la BSA no es exclusivo para la TbTIM (Figura 11).

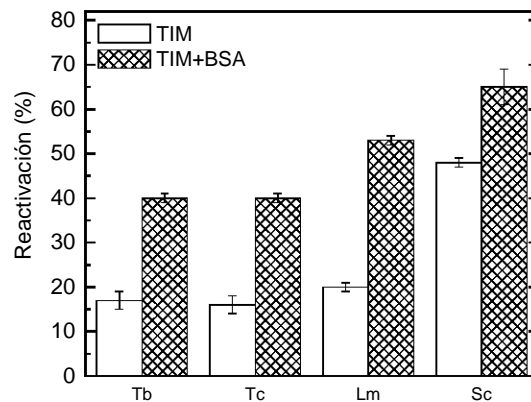


Figura 11. Efecto de la BSA en diferentes TIMs. Se reactivó 1 $\mu\text{g/ml}$ de cada TIM sin y con 19 $\mu\text{g/ml}$ de BSA. *Trypanosoma brucei* (Tb) *T. cruzi* (Tc) *Leishmania mexicana* (Lm) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). El 100 % de las actividades fue: TbTIM: 3422 $\mu\text{mol/min/mg}$, TcTIM: 3638 $\mu\text{mol/min/mg}$, LmTIM: 3762 $\mu\text{mol/min/mg}$, ScTIM: 7572 $\mu\text{mol/min/mg}$.

Análisis calorimétrico en la unión de la TbTIM y lisozima. Con la finalidad de conocer la energética de las interacciones entre la TIM y las proteínas que se estudiaron, se midieron los cambios de entalpía que ocurren cuando una proteína se mezcla con la TbTIM. Esto se determinó

por ITC. Por las razones que se especifican en Material y métodos sólo fue posible analizar la unión de la TbTIM con lisozima.

Para llevar a cabo estos experimentos fue necesario realizar diversas pruebas para determinar las concentraciones de la lisozima y de la TbTIM que proporcione una señal calorimétrica detectable y reproducible. La descripción de la técnica del experimento se detalló en la sección de Métodos. En la celda que contenía lisozima (0.7 mM) se inyectaron 15 μ l de TbTIM (0.35 mM de dímeros). Como controles se midió el calor liberado durante la dilución de TbTIM (jeringa) en el amortiguador TEA-EDTA (celda), y el calor de dilución que se produce por la adición del amortiguador a una solución de lisozima (0.7 mM). Esto último se realizó debido a que la lisozima puede asociarse consigo misma (Banerjee *et al.*, 1975). Se emplearon altas concentraciones de proteína tanto en la jeringa como en la celda. Bajo estas condiciones, la inyección del amortiguador a la solución de lisozima indujo un cambio relativamente grande con señal endotérmica, por lo que se ensayaron diferentes concentraciones de lisozima para encontrar una condición en la cual la señal inducida por la interacción de la TbTIM con lisozima no se enmascarara con la señal de la dilución, tanto de la lisozima como de la TbTIM. En la gráfica insertada en la Figura 12B, se muestra el cambio de calor que ocurre cuando 15 μ l del amortiguador se inyectaron en la celda que contiene lisozima. El mejor resultado fue con 10 mg/ml de lisozima (0.7 mM) en la celda y 0.35 mM de dímero de TbTIM en la jeringa (Figura 12B). El cambio de calor inducido por la inyección del amortiguador en la solución de lisozima y el que se indujo por la inyección de TbTIM en el amortiguador (Figura 12A) se restaron del experimental (TbTIM en lisozima), el valor se dividió con la concentración molar de TbTIM inyectada para obtener la entalpía de unión que fue -0.32 kcal/mol.

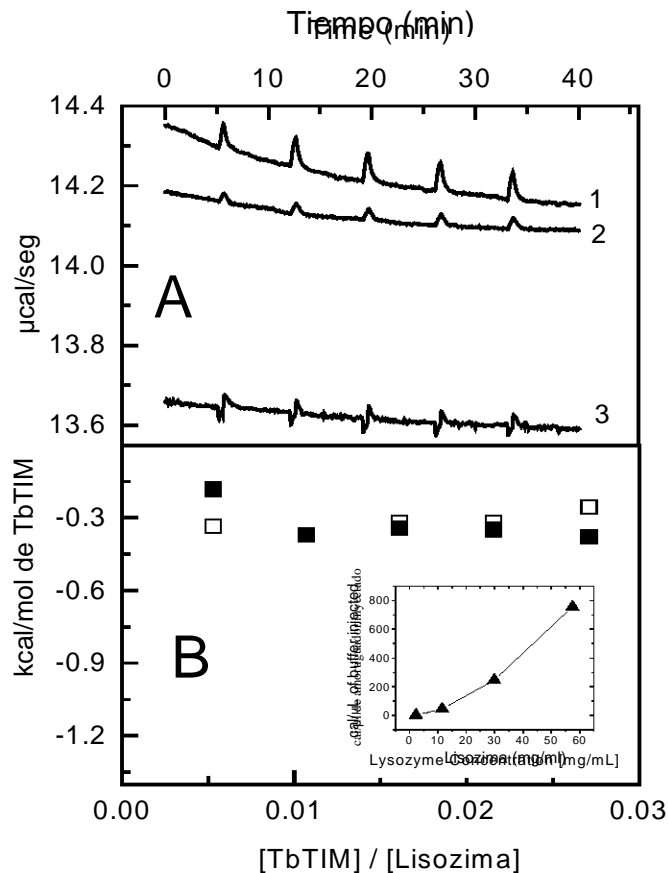


Figura 12. Cambios de calor producidos por la unión de TbTIM con lisozima. En A: 1) Se midieron los cambios de calor cuando 15 μl del amortiguador se inyectaron repetidamente en una solución de lisozima (0.7 mM) (celda). El trazo en 2 muestra los cambios de calor que ocurrieron cuando 15 μl de una solución de 0.35 mM de TbTIM se inyectaron a una solución de 0.7 mM de lisozima (celda). En el trazo 3 se muestra la respuesta calorimétrica de inyecciones repetidas de una solución de TbTIM (0.35 mM) a amortiguador. En B: se describe el cambio de entalpía producido por la interacción entre TbTIM y lisozima como función del cociente molar TbTIM / lisozima. Los cuadros en blanco corresponden a los calores obtenidos a partir de las trazas calorimétricas en A después de tomar en cuenta el calor de dilución producidos por la inyección de la enzima al amortiguador y por la inyección del amortiguador a la solución de lisozima. Los cuadros negros son una réplica del experimento. El cambio de entalpía promedio fue de -0.32 kcal/mol de TbTIM. En el inserto de la figura B se muestra el calor que produce la inyección del amortiguador a las soluciones de lisozima que tienen las concentraciones indicadas. Los datos sugieren que el cambio de calor se debe a la disociación de lisozima que está asociada consigo misma.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el estudio de las proteínas, el término plegamiento se refiere al proceso por el cual una proteína adquiere su conformación nativa a partir de estructuras desnaturalizadas o recién formadas en el ribosoma. Durante el plegamiento se forman intermediarios que se pueden unir a través de sus regiones hidrofóbicas expuestas para dar lugar a agregados (Jaenicke, 2000). La presencia de los agregados disminuye la efectividad de la ruta de plegamiento, además de que pueden formar parte de estructuras proteicas que alteran las funciones de las células, como es el caso de los priones y los amiloides (Jaenicke, 2000; Taylor *et al.*, 2002).

Las chaperonas y la aglomeración macromolecular son dos factores importantes en la generación de estructuras nativas. El 30% de las proteínas que se encuentran en la célula requieren de la participación de chaperonas para su plegamiento. Las chaperonas son proteínas que favorecen la producción de estructuras nativas evitando que proteínas con estructura no nativa se agreguen o se proteolice (Ellis, 1990). Se podría considerar que el efecto de las ocho proteínas que se estudiaron en la formación de los dímeros de la TIM es similar al de las chaperonas (“chaperone-like”); esta posibilidad se debe tomar en cuenta ya que las proteínas disminuyen la formación de especies no activas. Sin embargo, el mecanismo por el cual las ocho proteínas actúan en la reactivación de la TIM es independiente del ATP, mientras que la acción de las chaperonas involucra unión de ATP, hidrólisis del ATP y liberación de los productos. Por otro lado, se sabe que las chaperonas se unen temporalmente a regiones hidrofóbicas expuestas en la superficie de intermediarios del plegamiento (Ellis, 1990, 1992), mientras que nuestros datos indican que se unen y estabilizan a las estructuras nativas de la TIM. Por lo tanto, la acción de las proteínas que aquí se describe es drásticamente diferente a la de las chaperonas.

En la célula la concentración de macromoléculas (proteínas y ARN) es del orden de 400 mg/ml (Ellis y Minton, 2003). Esto implica que dentro de la célula las reacciones bioquímicas se

realizan en un ambiente aglomerado (“crowding”), lo que sugiere que las interacciones entre proteínas son inevitables. Esta situación nos hizo pensar que dichas interacciones podrían afectar algunas de las propiedades de las proteínas. Existen pocos reportes en los cuales se ha estudiado el papel de las interacciones proteína-proteína y cuál es su efecto en las características generales de las proteínas. Por lo tanto, es interesante y relevante que hayamos encontrado que en una solución diluida, en la cual no hay efecto de la aglomeración macromolecular, las interacciones de ocho proteínas con la TIM benefician su reactivación al estabilizar el dímero activo. Esto nos da la pauta para suponer que dentro de la célula pueden existir múltiples interacciones proteína-proteína y que estas pueden afectar el plegamiento de varias proteínas. En este sentido el trabajo de Minton *et al.* (1982) es de interés, los autores observaron que las proteínas resistentes a la desnaturalización por calor o etanol estabilizan a otras proteínas que son susceptibles a la inactivación.

Generalidades del efecto de interacciones proteína-proteína en el plegamiento. Los efectos que observamos con la TbTIM no son únicos. Existe un número relativamente alto de reportes que describen que en soluciones diluidas, proteínas con características fisicoquímicas diferentes incrementan el replegamiento de varias proteínas y por tanto, disminuyen su agregación. La Tabla 5 muestra un resumen de estos trabajos. De manera general se puede observar que las proteínas que se estudiaron difieren en sus características fisicoquímicas, y que además, su efecto ocurre en condiciones diluidas. Por lo tanto, los datos que presentamos podrían ser generales, y no exclusivos de la TIM. En este sentido es importante señalar que en los trabajos de la Tabla 5 no se describe el mecanismo por el cual las proteínas incrementan la reactivación. Sólo en el caso de la MAP2 se realizaron mutaciones en el extremo carboxilo terminal y se concluyó que esta es la zona de interacción con la alcohol deshidrogenasa, insulina, lactato deshidrogenasa, α -glucosidasa y malato deshidrogenasa. Cabe mencionar que los autores también

reportaron que MTP muestra una actividad excelente como chaperona (Sarkar *et al.*, 2004). En el trabajo de Zhi y colaboradores (1992) se usaron chaperonas y BSA en la reactivación de la citrato sintasa; demostraron que las chaperonas incrementan la reactivación de manera específica en un 80 %. La BSA sólo se empleó en los experimentos para confirmar la especificidad de la chaperona con la citrato sintasa, por esta razón no se determinó el mecanismo por el cual la BSA incrementa la reactivación. De la misma manera, Lilie y colaboradores (1993) utilizaron a la prolil isomerasa y la BSA en la reactivación del fragmento Fab del anticuerpo MAK 33, y demostraron que tanto la prolil isomerasa como la BSA aumentan la producción de estructuras nativas. Así mismo, Matsuzaki *et al.* (1998) observaron que la chaperona GroEL y una proteína de 58 kDa del periplasma de *R. sphaeroides* tienen la capacidad de inhibir la agregación de las enzimas dimetil sulfóxido reductasa y rodanasa (una proteína de la matriz mitocondrial).

El hecho de que la reactivación de varias proteínas se favorece por otras proteínas diferentes sugiere que el fenómeno es bastante común. Lamentablemente y como se mencionó, el mecanismo involucrado en dicho proceso no se ha estudiado. Sin embargo, es pertinente señalar que también existen muchos trabajos en los que se ha visto interacciones entre proteínas que pueden estar o no relacionadas con la función de la proteína. Por ejemplo, Lakatos y Minton (1991) reportaron que tanto la BSA como el citocromo *c* se asocian a actina, sugiriendo que la actina puede interactuar con una amplia variedad de proteínas globulares por medio de interacciones no específicas. Ovádi *et al.* (1986) y Srere *et al.*, (1990) observaron que muchas proteínas se asocian para formar complejos enzimáticos, y que estos son fundamentales en el metabolismo. Por otro lado, Volker y Knull (1997) demostraron la interacción de enzimas glicolíticas con tubulina. Esto da la pauta para pensar que en el citoplasma, las proteínas están en contacto con diversas estructuras celulares y macromoléculas y así incrementan la eficiencia de su función.

Especificidad o no especificidad en las interacciones proteína-proteína. En este trabajo nos encontramos el problema de definir si las interacciones proteína-proteína que observamos eran o no específicas. En cierta forma, las interacciones proteína-proteína que distinguimos se pueden definir como no específicas, debido a que proteínas drásticamente diferentes incrementan la reactivación y estabilidad de distintas TIMs. Sin embargo, es necesario recordar que nuestros experimentos sobre la reactivación de la TIM indican que las ocho proteínas interactúan predominantemente con el dímero y no con el monómero plegamiento. Lo cual revela que las proteínas muestran preferencia por las estructuras nativas. Esto implica que el fenómeno si es específico.

Proteína en estudio	Proteína no chaperona	Concentración de la proteína	Efecto de la proteína no chaperona	Referencia
Citrato sintasa	BSA	300 µg/ml	Incrementa la reactivación en un 23 %	Zhi <i>et al.</i> , (1992)
Lactato deshidrogenasa, α-glucosidasa y malato deshidrogenasa	MAP2	280 µg/ml	Disminuye la formación de agregados en un 80 %	Sarkar <i>et al.</i> , (2004)
Alcohol deshidrogenasa, β, γ-cristalina	α-cristalina	130 µg/ml	Reduce la agregación un 80 %	Horwitz (1992)
Fragmento Fab del anticuerpo MAK 33	BSA	390 µg/ml	Incrementa la reactivación en un 30 %	Lilie <i>et al.</i> , (1993)
Lisozima reducida	RNasa A, BSA, histonas, proteínas básicas de mielina, ADH y DNasa I	150 µg/ml	Incrementa la reactivación en un 70 %	Trivedi <i>et al.</i> , (1997)
Dimetil sulfóxido reductasa y rodanasa	Proteína de 58 kDa del periplasma de <i>R.</i>	10 µg/ml	Aumenta la reactivación hasta un 80%	Matsuzaki <i>et al.</i> , (1998)

	<i>sphaeroides</i>			
--	--------------------	--	--	--

Tabla 5. Proteínas no chaperonas con características fisicoquímicas diferentes en soluciones diluidas que favorecen el plegamiento de otra proteína.

Energética de las interacciones proteína-proteína. El cambio de calor que ocurrió cuando la lisozima se mezcló con TbTIM provee una evidencia directa de la interacción proteína-proteína, y también indicó que la interacción es muy débil. El estudio del efecto de interacciones débiles entre proteínas es muy difícil debido a que la magnitud de las interacciones que forman a los complejos puede estar en los límites de detección de la calorimetría actual. De hecho, para nosotros fue técnicamente muy difícil establecer los cambios energéticos de la interacción. Sin embargo, pudimos determinar los cambios de entalpía de la interacción de la TbTIM con lisozima, lo cual fue de -0.32 kcal/mol; lo cual implica que las interacciones son verdaderamente débiles. El que una interacción sea débil, de ninguna manera significa que no sean importantes. Por ejemplo, se ha reportado que las interacciones débiles participan en el ensamblaje de la cápside virus esféricos (Zlotnick, 2003), la estabilidad de la estructura terciaria de las proteínas (Scandurra *et al.*, 2000), en la adaptación de microorganismos a ambientes halofílicos (Costenaro *et al.*, 2002) y en la activación de factores de transcripción (Sugase *et al.*, 2007). Por tanto, es posible que las interacciones que hemos observado sean sólo un ejemplo de un proceso general.

En resumen, el equilibrio de la ruta de plegamiento de una proteína puede desplazarse hacia la formación de estructuras nativas estabilizándolas a través de interacciones débiles con otras proteínas. Es de importancia indicar que tales interacciones se pueden dar entre proteínas que difieren drásticamente en sus características fisicoquímicas. Por lo tanto, es posible que además de la participación de chaperonas y la aglomeración macromolecular en el plegamiento y estabilidad de proteínas las interacciones débiles entre proteínas ejerzan un papel importante en la formación y vida media de cuando menos algunas proteínas en el espacio intracelular.

APÉNDICE I

PLÁSMIDO pET3a

El vector pET-3a contiene una secuencia T7.Tag en el extremo amino terminal y un sitio de clonación BamHI. Este vector presenta las siguientes secuencias especificando entre paréntesis el número de pares de bases correspondiente: promotor T (615-631), inicio de la transcripción T7 (614), secuencia codificante T7.Tag (519-551), término T7 (404-450), origen pBR322 (2814), secuencia codificante *bla* (3575-4432) (Figura 11).

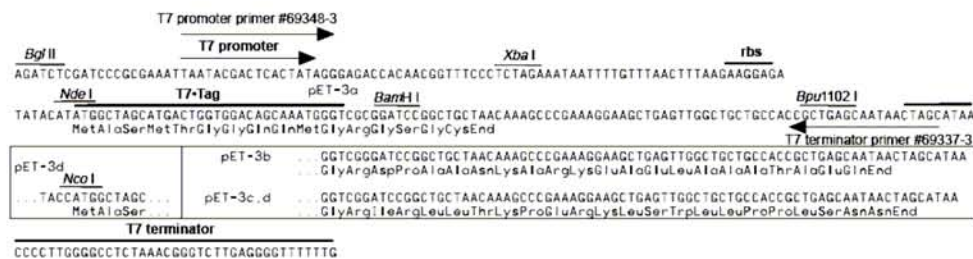
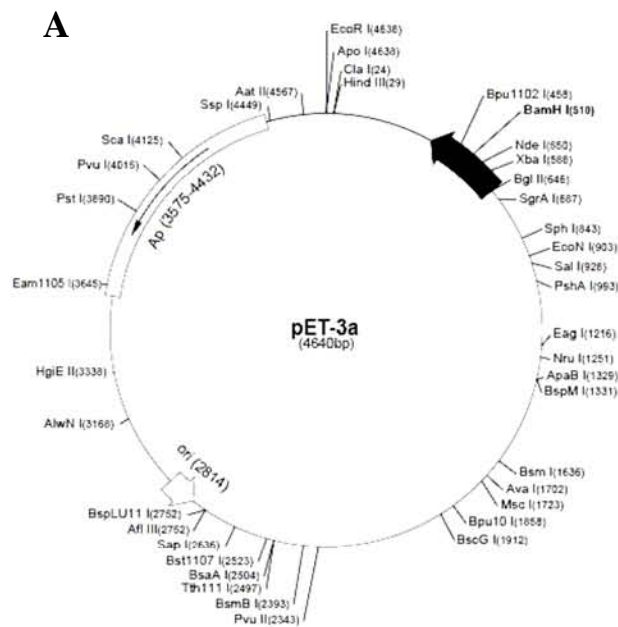


Figura 11. Vector pET3a. A: mapa de sitios de restricción del vector. B: secuencia de bases nitrogenadas del vector, se indica secuencia del promotor y algunos sitios de corte para enzimas de restricción.

APÉNDICE II

ELECTROFORESIS CON GELES SDS-PAGE

La técnica que se empleó para la electroforesis con geles en condiciones desnaturalizantes fue con base al trabajo publicado por Schagger y von Jagow (1987).

Acrilamida 30% (100 ml)

Archilamida 30 %
Bis-acrilamida 0.94 %

Amortiguador von Jagow (100 ml)

TRIS 0.3 M
HCl 8.25 ml
SDS 0.3 %
pH 8.25

Amortiguador superior (cátodo) (1L)

TRIS 0.1 M
Tricina 0.1 M
SDS 0.1 %
pH 8.25

Amortiguador inferior (ánodo) (1L)

TRIS 0.2 M
pH 8.93

Amortiguador para aplicar las muestras al gel (1ml)

Amortiguador von Jagow 0.125 ml
SDS 10% 0.1 ml
Glicerol 100% 0.15 ml
DTT (opcional) 15 mM
Agua destilada 0.4 ml
Azul de Coomassie 0.2 ml (de una solución de 5 mg/ml)

MEZCLA PARA GELES

Reactivo	Gel 12% (resolvedor)	Gel 4% (concentrador)
Agua destilada	1.5 ml	2.46 ml
Acrilamida	2.4 ml	0.53 ml
Amortiguador	1.5 ml	1.0 ml
Glicerol (80%)	0.6 ml	-
Persulfato de amonio (PSA) (10%)	0.03 ml	0.03 ml
TEMED	0.015 ml	0.015 ml

Las muestras se desnaturalizan por acción del SDS que contiene el amortiguador para aplicar las muestras en el gel y, al colocarlas en baño maría en ebullición durante 3 minutos. La mezcla de muestra y amortiguador tuvieron un radio 5:1 v/v. El voltaje que se empleó fue 110 V constante y una corriente de 90 mA inicial y 45 mA final. El tiempo que dura la electroforesis es aproximadamente 3 horas.

APÉNDICE III

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD

REACTIVOS

Amortiguador TEA-EDTA

Trietanolamina	100 mM
EDTA	10 mM
pH	7.4

Gliceraldehído 3-fosfato (G3P) (sustrato):

- 1.5 g de resina Dowex se resuspendió en 5 ml de agua destilada.
- Agitar en vortex durante 1 minuto, dejar sedimentar y extraer el agua por succión. Repetir este procedimiento seis veces.
- A la resina, lo más seca posible, adicionar 5 ml de agua destilada en ebullición y 100 mg de G3P.
- Colocar el tubo con la mezcla anterior en un baño maría en ebullición, agitar constantemente durante 3 minutos 15 segundos.
- Enfriar la mezcla en hielo.
- Filtrar por una membrana de 0.22 μ m.
- Ajustar el pH a 5.0 con bicarbonato de sodio (sólido).
- Alicuotar en tubos de 1ml.
- Guardar a -70°C.

Nota: la concentración final fue 20 mM.

β -nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)

- 7 mg de NADH se disolvieron en 100 μ l de amortiguador TEA-EDTA.

- Guardar a -70°C.
- La concentración final fue: 0.01 Mm

α -glicerolfosfato deshidrogenasa (α -GDH)

Esta enzima está precipitada en sulfato de amonio. De esta solución se tomaron 5 μ l y se adicionaron a 995 μ l de amortiguador TEA-EDTA.

La concentración final de la enzima fue 50 μ g/ml.

REFERENCIAS

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

Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. y White F. H. (Jr.) (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *PNAS*, 47: 1309-1314.

Banerjee, S. K., Pogolotti A (Jr.), Rupley, J.A. (1975) Self-association of lysozyme. *J. Biol. Chem.*, 250: 8260 - 8266.

Beaucamp, N., Hofman, A., Kellerer, B. y Jaenicke, R. (1997) Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritime*: design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Science*, 6: 2159-2165.

Beisenherz, G. (1955) Triosephosphate isomerase from calf muscle. *Meth. Enzymol.*, 1: 387-391.

Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D. y Knowles, J. R. (1988) Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry*, 27: 1158-1167.

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

Bukau, B., Weissman, J. y Horwich, A. (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 125: 443-451.

Cheng, M., Hartl, F, Martin, J., Pollock, R., Kalousek, F., Neupert, W., Halberg, E., y Horwich, A. (1989) Mitochondrial heat-shock protein Hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature (London)*, 337: 620-625.

Colclasure, G. C. y Parker, J. C. (1991) Cytosolic protein concentration is the primary volume signal in dog red cells. *J. Gen. Physiol.*, 98: 881-892.

- Costenaro, L., Zaccai, G. y Ebel, Ch. (2002) Link between protein-solvent and weak protein-protein interactions gives insight into halophilic adaptation. *Biochemistry*, 41: 13245-13252.
- Coyle, J. E., Texter, F. L., Aschcroft, A. E., Masselos, D., Robinson, C. V. y Radford, S. E. (1999) GroEL accelerates the refolding of hen lysozyme without changing its folding mechanism. *Nature*, 6: 683-690.
- Dhar-Chowdhury, P., Harell, M. D., Han, S.Y., Jakowska, D., Parachuru, L., Morrissey, A., Srivastava, S., Liu, W., Malester, B., Yoshida, H. y Coetzee, W. A. (2005) The glycolytic enzymes, glyceraldehyde-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: 38464-38470.
- Dobson, Ch. M. (2004) Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods*, 34: 4-14.
- Ellis, R. J. (1990) Molecular chaperones: The plant connection. *Science*, 250: 954-959.
- Ellis, R. J. (1992) Cytosolic chaperonin confirmed. *Nature (London)*, 358: 191-192.
- Ellis, R. J. y Minton, A. P. (2003) Cell biology: join the crowd. *Nature*, 425: 27-28.
- Ellis, R. J. y van der Vies, S. M. (1988). The rubisco subunit binding protein. *Photosynth. Res.*, 16: 101-115.
- Fisher, H. F. y Singh, N. (1995) Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Methods Enzymol.*, 259: 194-221.
- Gao, X. G., Garza-Ramos, G., Saavedra-Lira, E., Cabrera N., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R. y Gómez-Puyou, A. (1998) Reactivation of triosephosphate isomerase from three trypanosomatids and human: effect of Suramin. *Biochem. J.*, 332: 91-96.
- Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Casjens, S. R. y Kaiser, A. D. (1973) Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J. Mol. Biol.*, 76: 45-60.
- Gokhale, R. S., Ray, S. S., Balaram, H. R. y Balaram, P. (1999) Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry*, 38: 423-431.
- Goloubinoff, P., Gatenby, A. A. y Lorimer, G. H. (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligómeros in *Escherichia coli*. *Nature*, 337: 44-47.
- Gupta, R. S. (1990) Sequence and structural homology between a mouse t-complex protein TCP-1 and the "chaperonin" family of bacterial (GroEL, 60-65 kDa heat shock antigen) and eukaryotic proteins. *Biochem. Int.*, 20: 833-841.
- Hartl, U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381: 571-580.

- Hartl, U. F. y Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295: 1852-1858.
- Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S. M., Tilly, K, Dennis, D. T., Georgopoulos, G. C., Hendrix, R. W. y Ellis, R. J. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature (London)*, 333: 330-334.
- Hernández-Alcántara, G., Garza-Ramos, G., Mendoza-Hernández, G., Gómez-Puyou, A. y Pérez-Montfort, R. (2002) Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry*, 41: 4230-4238.
- Horwich, A. L. y Willison, K. R. (1993) Protein folding in the cell: functions of two families of molecular chaperone, hsp60 and TF55-TCP1. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 339: 313-326.
- Horwitz, J. (1992) α -Crystallin can function as a molecular chaperone. *PNAS*, 89: 10449-10453.
- Houbaviy, H. B. y Burley, S. K. (2001) Thermodynamic analysis of the interaction between YY1 and the AAV P5 promoter initiator element. *Chem. Biol.*, 8: 179-187.
- Hurtley, S. M. y Helenius, A. (1989) Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 5: 277-307.
- Indyk, L. y Fisher, H. F. (1998) Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol.*, 295: 350-364.
- Jaenicke, R. (1991) Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.*, 202: 715-728.
- Jaenicke, R. (1995) Folding and association versus misfolding and aggregation of proteins. *Philos Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 348: 97-105.
- Jaenicke, R. (1999) Folding and stability of domain proteins. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 71: 155-241.
- Jaenicke, R. (2000) Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J. Biothechnol.*, 79: 193-203.
- Jaenicke, R., y Lilie, H. (2000) Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv. Protein. Chem.*, 53: 329-401.
- Jung, J., Yoon, T., Choi, E. C. y Lee, K. (2002) Interaction of cofilin with triosephosphate isomerase contributes glycolytic fuel for Na,K-ATPase via Rho-mediated signal pathway. *J. Biol. Chem.*, 277: 48931-48937.

- Kincaid, M. M. y Cooper, A. A. (2006) Misfolded proteins traffic from the endoplasmic reticulum (ER) due to ER export signals. *Mol. Biol. Cell.*, 18: 455-463.
- Knowles, J. R. (1991) Enzyme catalysis: no different, just better. *Nature*, 350: 121-124.
- Kohl, L., Callens, M., Wierenga, R. K., Opperdoes, F. R., Micels, P. A. (1994) Triosephosphate isomerase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and characterization of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and analysis of the protein. *Eur. J. Biochem.*, 220: 331-338.
- Kohlhoff, M., Dahm, A. y Hensel, R. (1996) Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Letters*, 383: 245-250.
- Lakatos, S. y Minton A. (1991) Interactions between globular proteins and F-actin in isotonic saline solution. *J. Biol. Chem.* 266, 18707-18713.
- Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. y Finch J T. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein wich binds histones and transfers them to DNA. *Nature (London)*, 275: 416-420.
- Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R. y Buchner, J. (1993) Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro. *Prot. Sci.*, 2: 1490-1496.
- Lodi, P. J. (1994) Triosephosphate isomerase requires a positively charged active site: the role of lysine-12. *Biochemistry*, 33: 2809-2814.
- Lodi, P. J. y Knowles, J. R. (1993) Direct evidence for the exploitation of an α -helix in the catalytic mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 32: 4338-4343.
- Maruyama T, Katoh S, Nakajima M, Nabetani H (2001) Mechanism of bovine serum albumin aggregation during ultrafiltration. *Biotech. Bioeng.*, 75: 233-238.
- Matsuzaki, M., Kiso, Y., Yamamoto, I. y Satoh, T. (1998) Isolation of a periplasmic molecular chaperone-like protein of *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* that is homologous to the dipeptide transport protein DppA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 180: 2718-2722.
- McVittie, J. D., Esnouf, M. P. y Peacocke, A. R. (1977) The denaturation-renaturation of chicken-muscke triosephosphate isomerase in guanidinium chloride. *Eur. J. Biochem.*, 81:307-315.
- Menard, R, Sansonetti, P., Parsot, C. y Vasselon, T. (1994). Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell*, 79: 515-525.
- Minton, A. P. (1983) The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences. *Mol. Cell. Biochem.*, 55: 119-140.

- Minton, A. P. (2001) The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J. Biol. Chem.*, 276: 10577-10580.
- Musgrove, J. E. y Ellis, R. J. (1986) The rubisco large subunit binding protein. *Phil. Trans R. Soc. Lond. B*, 313: 419-428.
- Nájera, H., Costas, M. y Fernández-Velasco, D.A. (2003) Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem J.*, 370: 785-792.
- Orosz, F., Wágner, G., Liliom, K., Kovacs, J., Baroti, K., Horanyi, M., Farkas, T., Hollan, S. y Ovadi, J. (2000) Enhanced association of mutant triosephosphate isomerase to red cell membranes and to brain microtubules. *PNAS*, 97: 1026-1031.
- Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramírez J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Pérez-Montfort, R. (1997) Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.*, 244: 700-705.
- Ovádi, J., Aragón, J. J. y Sols, A. (1986) Phosphofructokinase and fructosebisphosphatase from muscle can interact at physiological concentrations with mutual effects on their kinetic behavior. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 135: 852-856.
- Pace, N. C., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. y Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 4: 2411-2423.
- Pelham, H. R. B. (1989) Control of protein exit from the ER. *A. Rev. Cell. Biol.*, 5: 1-23.
- Perozzo, R., Folkers, G., Scapozza, L. (2004) thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 24: 1-52.
- Raines, R. T., Sutton, E. L., Straus, D. R., Gilbert, W. y Knowles, J. R. (1986) Reaction energetics of a mutant triosephosphate isomerase in which the active-site glutamate has been changed to aspartate. *Biochemistry*, 25: 7142-7154.
- Ren, G., Lin, Z., Tsou, Ch-l. y Wang, Ch-ch. (2003) Effects of macromolecular crowding on the unfolding and the refolding of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Prot. Chem.*, 22: 431-439.
- Richard, J. P. (1984) Reaction of triosephosphate isomerase with L-glyceraldehyde 3-phosphate and triose 1,2-enediol 3-phosphate. *Biochemistry*, 24: 949-953.
- Rietveld, A.W. M. y Ferreira, S. T. (1998) Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry*, 37: 933-937.

- Rivas, G., Fernández, J. A. y Minton, A. P. (1999) Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium: theory, experiment, and biological significance. *Biochemistry*, 38: 9379-9388.
- Rozacky, E. E., Sawyer, T. H., Barton, R. A. y Gracy, R. W. (1971). Studies of human triosephosphate isomerase. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 146: 312-320.
- Sarkar, T., Mitra, G., Gupta, S., Manna, T., Poddar, A., Panda, D., Das, K. P. y Battacharyya, B. (2004) MAP2 prevents protein aggregation and facilitates reactivation of unfolded enzymes. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1488-1496.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Polito, L. y Engel, P. C. (2000) Protein stability in extremophilic archaea. *Front. Biosci.*, 5: d787-795.
- Schurig, H., Beaucamp, N., Ostendorp, R., Jaenicke, R., Adler, E. y Knowles, J. R. (1995) Phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* form a covalent bifunctional enzyme complex. *EMBO J.*, 14: 442-451.
- Schägger, H. y von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166: 368-379.
- Srere, P. A., Ovadi, J. (1990) Enzyme-enzyme interactions and their metabolic role. *FEBS Letters*, 268: 360-364.
- Sugase, K., Dyson, H. J. y Wright, P. E. (2007) Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature*, 447: 1021-1025.
- Swinkels, B. W., Gibson, W. C., Osinga, K. A., Kramer, R., Veeneman, G., van Boom J. H. y Borst, P. (1986) Characterization of the gene for the microbody (glycosomal) triosephosphate isomerase of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, 5: 1291-1298.
- Taylor, P. J., Ardí, J. y Fischbeck, K. H. (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, 296: 1991-1995.
- Trivedi, V. D., Raman, B., Mohan, Ch. Y Ramakrishna, T. (1997) Co-refolding denatured-reduced hen egg white lysozyme with acidic and basic proteins. *FEBS Letters*, 418: 363-366.
- van den Berg, J. y Qin, J. (2006) Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy. *Trends Biotechnol.*, 24: 22-27.
- Vázquez-Contreras E., Zubillaga R. A., Mendoza-Hernández G., Costas M. y Fernández-Velasco D. A. (2000) Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein Pept. Letters*, 7: 57-64.

- Velázquez-Campoy, A., Leavitt, S. A. y Freire, E. (2004) Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol. Biol.*, 261, 35-54.
- Volker, K. W. y Knull, H. R. (1996) A glycolytic enzyme binding domain on tubulin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 338: 237-243.
- Walden, H., Taylor, G. L., Lorentzen, E., Pohl, E., Lilie, H., Schramm, A., Knura, T., Stubbe, K., Tjaden, B. y Hensel, R.. (2004) Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J. Mol. Biol.*, 342: 861-875.
- Waley, S. G. (1973) Refolding of triosephosphate isomerase. *Biochem. J.*, 135: 165-172.
- Wattiau, P. y Cornelis, G. R. (1993) SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol. Microbiol.* 8, 123-131.
- Webb, M. R. y Knowles, J. R. (1975) The orientation and accessibility of substrates on the active site of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 14: 4692-498.
- Wierenga, R. K. y Noble, M. E. M. (1992a) Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.*, 224: 1115-1126.
- Wierenga, R. K. y Noble, M. E. M. (1992b) Dynamics of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated. *Biochemistry*, 34: 8309-8319.
- Wierenga, R. K., Borchert, T. V. y Noble, M. E. M. (1992c) Crystallographic binding studies with triosephosphate isomerases: conformational changes induced by substrate and substrate-analogues. *FEBS Letters*, 307: 34-39.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vried, G. y Nauche, S. (1991) Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate. *J. Mol. Biol.*, 220: 995-1015.
- Williams, J. C., y McDermott, A. E. (1995) Dynamics of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated. *Biochemistry*, 34: 8309-8319.
- Yaffe, M. B., Farr, G. W., Miklos, D., Horwich, A. L., Sternlicht, M. L. y Sternlicht, H. (1992). TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature*, 358: 245-248.
- Zabori, S., Rudolph, R. y Jaenicke, R. (1980) Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z Naturforsch [C]*, 35: 999-1004.
- Zhi, W., Landry, S. J., Gierasch, L. M. y Sreere, P. A. (1992) Renaturation of citrate synthase: influence of denaturant and folding assistants. *Protein Science*, 1: 522-529.
- Zhou, B-r., Liang, Y., Du, F., Zhou, Z. y Chen, J. (2004) Mixed macromolecular crowding accelerates the oxidative refolding of reduced, denatured lysozyme. *J. Biol. Chem.*, 279: 55109-55116.

Zimmerman, S. B. (1991) Estimation of macromolecular concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 222: 599-620.

Zlotnick, A. (2003) Are weak protein-protein interactions the general rule in capsid assembly? *Virology*, 315: 269-274.

Zomosa-Signoret, V., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (2003) Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry*, 42: 3311-3318.