



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO CALORIMÉTRICO DE LAS
INTERACCIONES ENTRE LAS PROTEÍNAS TRIOSA
FOSFATO ISOMERASA DE TRYPANOSOMA CRUZI,
TRYPANOSOMA BRUCEI Y DOS DE SUS
QUIMERAS CON LIPOSOMAS DE
DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA:

AUGUSTO JOSÉ GONZÁLEZ NAVEJAS



Ciudad Universitaria, CdMx, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente: Dr. Miguel Antonio Costas Basin

Vocal: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Secretario: Dr. Ernesto Carrillo Nava

1er. Suplente: Dr. David Turcio Ortega

2do. Suplente: Dr. Salvador Guadalupe Hernández Vargas

*Este trabajo se realizó bajo
la dirección del Dr. Miguel Antonio Costas Basin
en el Laboratorio de Biofisiología, Departamento de Fisiología
Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.*

Dr. Miguel Antonio Costas Basin

Asesor

Augusto José González Navejas

Sustentante

Agradecimientos

Primero quisiera agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica y personal.

Al igual, agradezco profundamente a la Facultad de Química por todo el conocimiento transmitido y oportunidades brindadas.

Un particular agradecimiento a uno de mis mayores mentores en mi vida académica, el Dr. Miguel Antonio Costas Basin, el cual me abrió las puertas a su laboratorio y me brindo su confianza, paciencia, conocimiento y apoyo durante mi estancia en el laboratorio y la realización de este trabajo.

Al igual, un agradecimiento a todo el grupo de trabajo que compone el laboratorio (Jessica, Jorge, Cesar, Lorelei, Miguel Angel, Andrea) por los consejos, sugerencias, enseñanzas y amistad que me brindaron.

Al Dr. Ruy Perez Monfort y al Dr. Georges Dreyfus por abrirme las puertas de sus laboratorios para la realización de una parte de este trabajo en el Instituto de Fisiología Celular. Al Dr. Javier de la Mora por la ayuda brindada, pero sobre todo a Nallely Cabrera por el apoyo y amistad que me brindo en todo momento, al igual que al grupo de trabajo del laboratorio 201 Oriente, Selma y Mónica, por la amistad y ayuda brindada.

Este proyecto se realizó gracias al apoyo económico brindado por DGAPA-PAPIIT-UNAM mediante los proyectos IN112813 e IN204616 y al subprograma 127 de la Facultad de Química para la formación básica en investigación.

A los doctores Carlos Amador y Laura Domínguez por la confianza y enseñanzas. Al igual, gracias a los chicos del cubículo, Rodrigo, Cecilia, Dulce, Javier, Alejandro, por su ayuda, consejos y amistad.

A mis amigos, por la confianza, las anécdotas, la diversión, los consejos, el cariño. Gracias principalmente a Juan Lara, Víctor, Monserrath, Arturo, Rodrigo Salas, Coquet, Alberto, Iván Cruz, Valeria Cruz, María Cano, Beatriz, Israel, Valeria Rangel, Humberto, José Luis, Daniela Rebollar, Maximiliano.

En especial a Raymundo Esquer, Iván Hernández, Alejandra Frías y Carolina Brindis que se han convertido en personas indispensables en vida, gracias por todo.

Al igual, quisiera agradecer a dos personas que ya no se encuentran entre nosotros, María Arancibia y Jennifer Buenfil, ya que ellas son fuente de mi inspiración.

A mi familia, a mis padres Augusto José González Canto y María de los Dolores Navejas Barbosa por todo su apoyo, enseñanzas, consejos, regaños, paciencia y amor que siempre me han demostrado a lo largo de mi vida. Al igual, gracias a mis hermanas, Martha y Sacnicte, que me han soportado y querido a lo largo de toda mi vida.

En fin, gracias a todas las personas que han pasado por mi vida, sin ustedes no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

Gracias... Totales.

Gustavo Ceratti

Abreviaturas y Símbolos

<i>TIM</i>	<i>Triosafosfato Isomerasa</i>
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>TbTIM</i>	<i>Triosafosfato Isomerasa de T. brucei</i>
<i>TcTIM</i>	<i>Triosafosfato Isomerasa de T. cruzi</i>
<i>Q5TbTIM</i>	<i>Triosafosfato Isomerasa de T. cruzi con la región 5 de T. brucei</i>
<i>Q5TcTIM</i>	<i>Triosafosfato Isomerasa de T. brucei con la región 5 de T. cruzi</i>
<i>DSC</i>	<i>Calorimetría Diferencial de Barrido</i>
<i>DPPC</i>	<i>1-2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina</i>
<i>TEA</i>	<i>Trietanolamina</i>
ΔH	<i>Cambio de Entalpía</i>
C_p	<i>Capacidad Calorífica</i>
T_m	<i>Temperatura en la que ocurre el máximo del C_p</i>
$T_{1/2}$	<i>Ancho de pico de la transición calorimétrica</i>
L_β	<i>Fase gel de los liposomas</i>
P_β	<i>Fase ondulada de los liposomas</i>
L_α	<i>Fase líquida de los liposomas</i>
<i>DLS</i>	<i>Dispersión Dinámica de Luz</i>
<i>PEX</i>	<i>Biogénesis peroximal</i>
<i>PTS</i>	<i>Señales de direccionamiento al peroxisoma</i>
<i>TPR</i>	<i>Tetraricopeptidos receptores</i>
<i>GAP</i>	<i>D-gliceraldehído-3-fosfato</i>
<i>DHAP</i>	<i>Dihidroxiacetona fosfato</i>

Índice general

Agradecimientos	III
Abreviaturas y Símbolos	V
1. Introducción	1
1.1. La enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño.	1
1.2. La Glucólisis en los tripanosomátidos.	5
1.3. La Triosa Fosfato Isomerasa.	7
1.3.1. Proteínas Químéricas	9
1.4. Calorimetría Diferencial de Barrido	11
1.5. Interacciones Membrana-Proteína	14
2. Hipótesis y Objetivos	17
2.1. Hipótesis	17
2.2. Objetivos	17
2.2.1. Objetivos Generales	17
2.2.2. Objetivos Particulares	17
3. Materiales y Métodos	18
3.1. Materiales	18
3.2. Métodos	18
3.2.1. Diseño de los genes de las proteínas químéricas.	18
3.2.2. Sobreexpresión y Purificación de las proteínas	19
3.2.3. Preparación de Liposomas	19
3.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	20

3.2.5. Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	20
3.2.6. Actividad de las TIMs	20
4. Resultados	21
4.1. Interacciones entre liposomas de DPPC y TIMs.	21
4.2. Efecto de la concentración y tiempo en la interacción entre liposomas y proteínas silvestres.	24
4.2.1. Efecto de la concentración.	24
4.2.2. Efecto del tiempo de incubación.	25
4.3. Interacciones de las proteínas con liposomas con ergosterol.	28
5. Conclusiones y Perspectivas	32

Capítulo 1

Introducción

1.1. La enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño.

La enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño son enfermedades causadas por parásitos de la familia de los tripanosomátidos. La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad del sueño es causada por el parásito *Trypanosoma brucei*. Ambas enfermedades afectan mayormente a regiones tropicales y son transmitidas por vectores; la primera por los triatominos y la segunda por la mosca tsetsé (Figura 1.1). Cerca de 60 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad del sueño en 36 países de África, donde 22 de esos países son de los menos desarrollados. Por otro lado, se sabe que 18 millones de personas están infectadas con la enfermedad de Chagas en Latinoamérica, de las cuales 5 millones tienen complicaciones intratables, según la Organización Mundial de la Salud [1, 2]. La mayoría de las personas afectadas por estas enfermedades se encuentran en comunidades rurales y en una situación económicamente desfavorable.

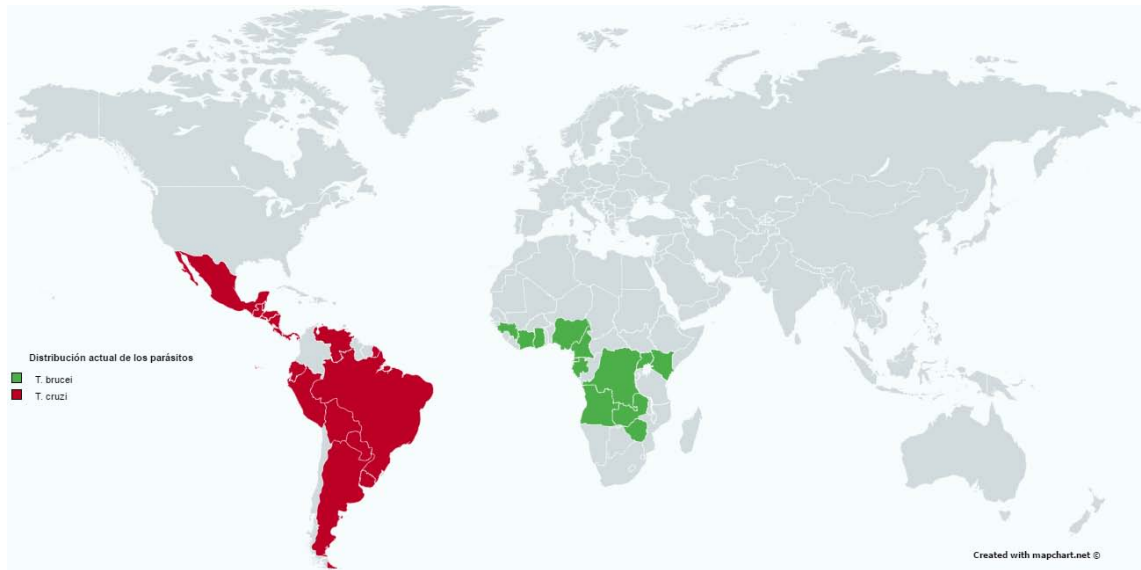


Figura 1.1: Mapa de la distribución actual de los parásitos. En rojo *T. cruzi* y en verde *T. brucei*.

Estas dos enfermedades parasitarias son incurables y causan alteraciones irreversibles, que en muchos casos terminan en muerte. La enfermedad de Chagas provoca alteraciones cardíacas (miocardiopatía, paros cardíacos, arritmias), digestivas (acalasia, megacolon) y/o neurológicas (encefalitis, neuropsicopatías). La enfermedad del sueño afecta principalmente al sistema nervioso central, derivando en coma y posteriormente la muerte.

Los tratamientos empleados para controlar estas enfermedades son altamente tóxicos. Por ejemplo, para la enfermedad de Chagas se emplean el benznidazol y el nifurtimox y para la enfermedad del sueño se utilizan el melarsoprol y la pentamidina. Todos estos medicamentos provocan alteraciones desde insuficiencia renal hasta encefalopatía. Por lo anterior, se buscan fármacos específicos y altamente efectivos en contra de los parásitos con el fin de tratar y eventualmente erradicar dichas enfermedades. Lograr el desarrollo de tales fármacos, requiere identificar elementos vitales para la supervivencia de los parásitos en pasos claves de sus ciclos de vida. El ciclo de vida de ambos parásitos es muy similar (Figura 1.2), teniendo algunas etapas en el hospedero y otras en el vector. Para *T. cruzi* se identifican los tripomastigotes y amastigotes, donde el primero no es replicativo y el segundo sí. Para *T. brucei*, dentro del hospedero se encuentra en su forma de tripomastigote, el cual es

el estado replicativo para este parásito. La mayor parte de su estadía, los parásitos se encuentran en el torrente sanguíneo, en su etapa de tripomastigoste, en dicho estado es posible la detección.

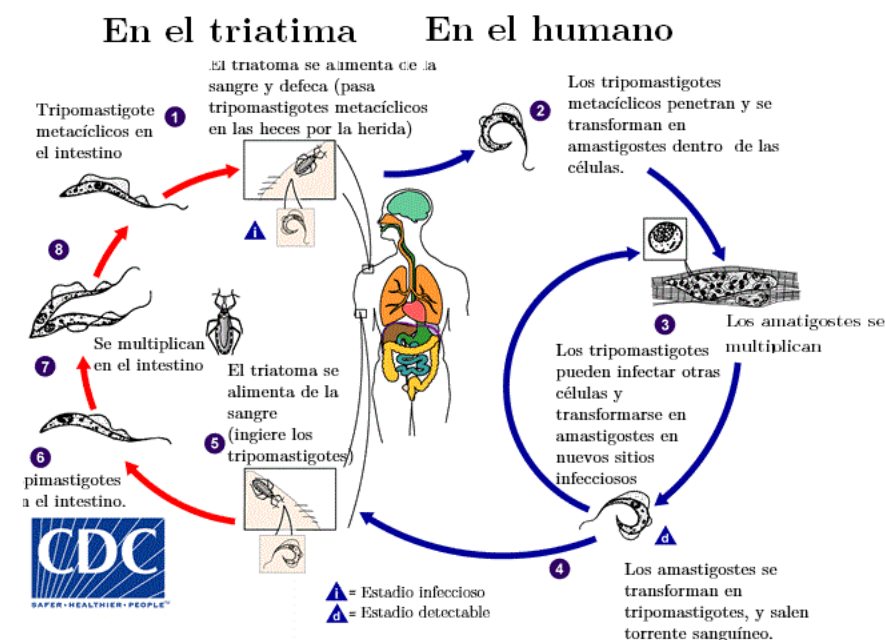
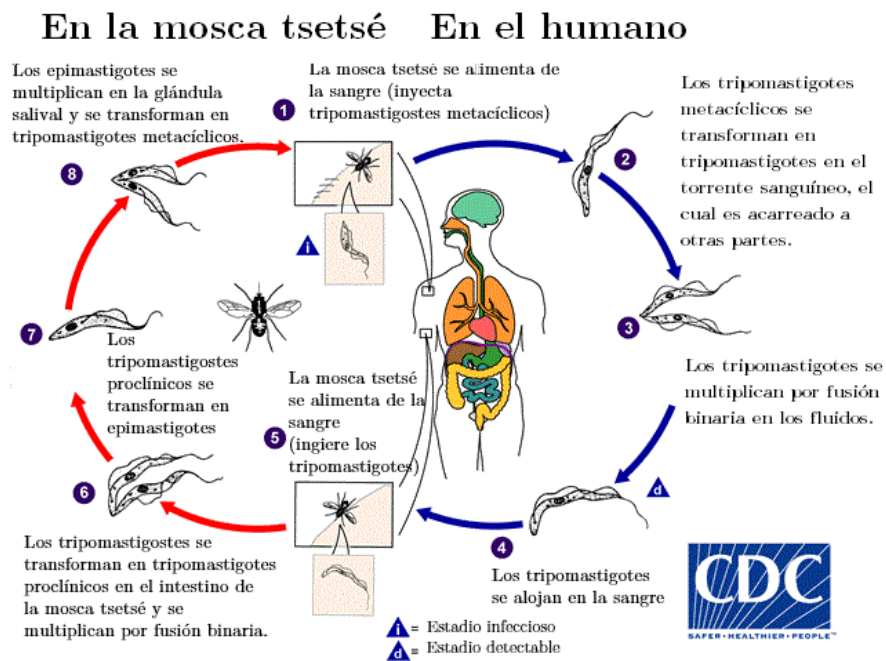


Figura 1.2: Ciclo de vida de ambos parásitos. A la izquierda se muestra el ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. A la derecha se muestra el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

Para *T. brucei*, cuando se lleva a cabo la reproducción de los parásitos, se da el mayor gasto energético. La energía es obtenida del metabolismo de los parásitos, donde la mayoría de los sustratos necesarios para realizar su metabolismo son obtenidos del hospedero. Las diferencias entre los metabolismo que realizan los tripanosomátidos son mínimas, donde se destaca que *T. brucei* obtiene todo el ATP de la glucólisis, *T. cruzi* puede llegar a obtener parte de su ATP por vías alternas, como el catabolismo de aminoácidos [3]. En este contexto, una estrategia factible para la supresión o eliminación de los parásitos es la inhibición de su glucólisis, que a continuación se describe brevemente.

1.2. La Glucólisis en los tripanosomátidos.

La mayor parte de la glucólisis de los tripanosomátidos se lleva a cabo en un orgánulo denominado glicosoma, el cual consta de una membrana lipídica compuesta de varios fosfolípidos, esteroides, proteínas y azúcares, entre otras cosas. En el glicosoma es donde se llevan a cabo las primeras siete reacciones de la glucólisis, las cuales son catalizadas por las enzimas: hexoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, fosfofructoquinasa, aldolasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa. (Figura 1.3).

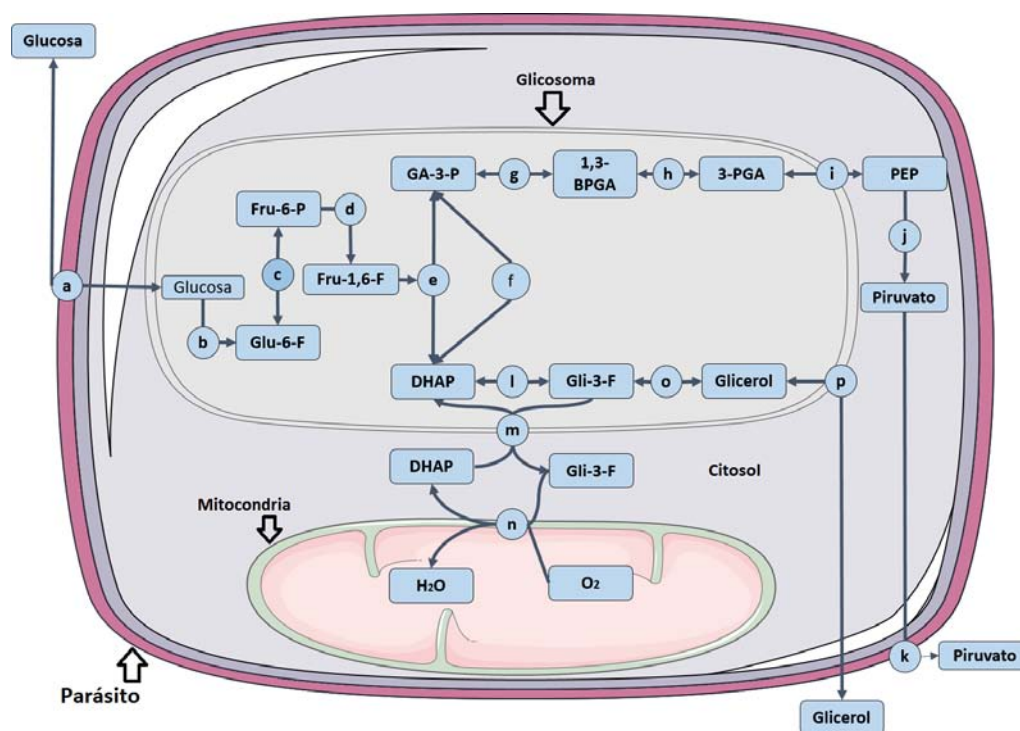


Figura 1.3: Esquema general de la glucólisis de los tripanosomas. a) Transporte de la glucosa al glicosoma. b) Hexoquinasa. c) Glucosa-6-fosfato isomerasa. d) Fosfofructoquinasa. e) Aldolasa. f) Triosa fosfato isomerasa. g) Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. h) Fosfoglicerato quinasa. i) Transporte de PEP al citosol, fosfoglicerato mutasa y enolasa. j) Piruvato quinasa. k) Transporte del piruvato al exterior del parásito. l) Glutamato deshidrogenasa. m) Transporte de DHAP y Gli-3-F al citosol. n) Glicerol-3-fosfato oxidasa. o) Glicerol quinasa. p) Transporte del glicerol al exterior del parásito [3].

Estudios bioquímicos han demostrado que la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa no son reguladas alostéricamente como sucede en la glucólisis de otros organismos, por lo que inhibidores de estas proteínas no serviría para detener la glucólisis de los parásitos [4]. Otros estudios mostraron que la compartimentalización de las enzimas glucolíticas, cumple la función de regulación enzimática [5] y evita la acumulación de intermediarios de la glucólisis que pueden llegar a ser potencialmente tóxicos para los propios parásitos [6]. En otro conjunto de estudios, se logró la supresión de los genes que codifican para la biogénesis peroximal (PEX) en *Trypanosoma brucei*, lo que provocó la muerte del parásito [7–9].

Todas las enzimas que participan en la glucólisis son transcritas en el citosol. Por ello, necesitan de una ruta de transporte que las lleve del citosol al glicosoma. Este tipo de transporte debe de estar mediado por señales de enrutamiento. Existen dos principales señales de direccionamiento al peroxisoma (PTS) que promueven el transporte de las enzimas al peroxisoma o glicosoma. Estos peptido señales constan de tres aminoácidos que se encuentran en posiciones terminales de la secuencia de las proteínas, los cuales son reconocidos por los receptores de tetrapeptidos (TPR) de algún receptor peroximal de importación citosólico. Este es el caso de varias de las enzimas antes mencionadas, la Triosa Fosfato Isomerasa siendo la más importante de sus excepciones. La Triosa Fosfato Isomerasa debe de tener otro tipo de señalización para poder ser importada del citosol al glicosoma. Hasta el momento, no se ha encontrado algún mecanismo de importación externo para esta enzima, por lo que se asume que debe poseer algún elemento intrínseco que le permita su transporte a través de la membrana [10]. Al respecto, se ha identificado un fragmento de 22 aminoácidos (del 140 al 161) en TbTIM, con la capacidad de guiar la misma hasta el glicosoma, es decir actuar como peptido señal. Esta identificación se logró mediante experimentos de fraccionamiento celular y estudios inmunofluorescentes [10].

1.3. La Triosa Fosfato Isomerasa.

La triosa fosfato isomerasa (E.C. 5.3.1.1-TIM) es una enzima glucolítica, la cual cataliza la interconversión del D-gliceraldehído-3-fosfato (GAP) al dihidroxiacetona fosfato (DHAP). La TIM se ha encontrado en todo tipo de organismos. Es una enzima cuya catalisis es controlada por la difusión por lo cual es considerada una enzima perfecta [11]. La TIM consta de 8 motivos o regiones, los cuales están constituidos por una hélice α , un loop y una hoja β [12] (Figura 1.4). TbTIM y TcTIM deben encontrarse en su forma dimérica, para ser activas. El alineamiento topológico de aminoácidos de ambas proteínas revela una similitud topológica del 92.4% con un RMSD de 0.96 (Figura 1.4) y el alineamiento de la secuencia revela una identidad de secuencia del 74% (Figura 1.5). En ambas secuencias hay un total de 65 diferencias. [13].

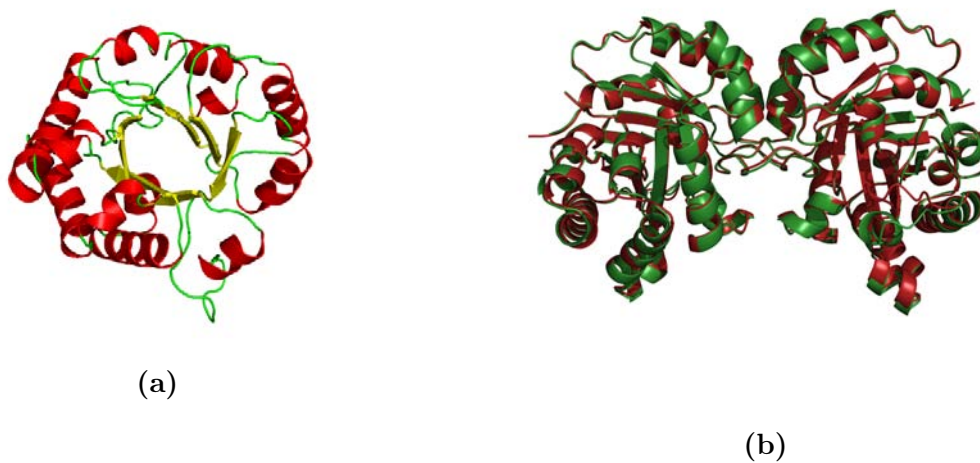


Figura 1.4: (a) Motivos estructurales de un barril TIM. En color rojo se encuentran las hélices α , en amarillo las hojas β y en verde la asas. (b) Superposición de las estructuras cristalinas de TbTIM en verde (código PDB: 2J27) y TcTIM en rojo (código PDB: 1TCD).

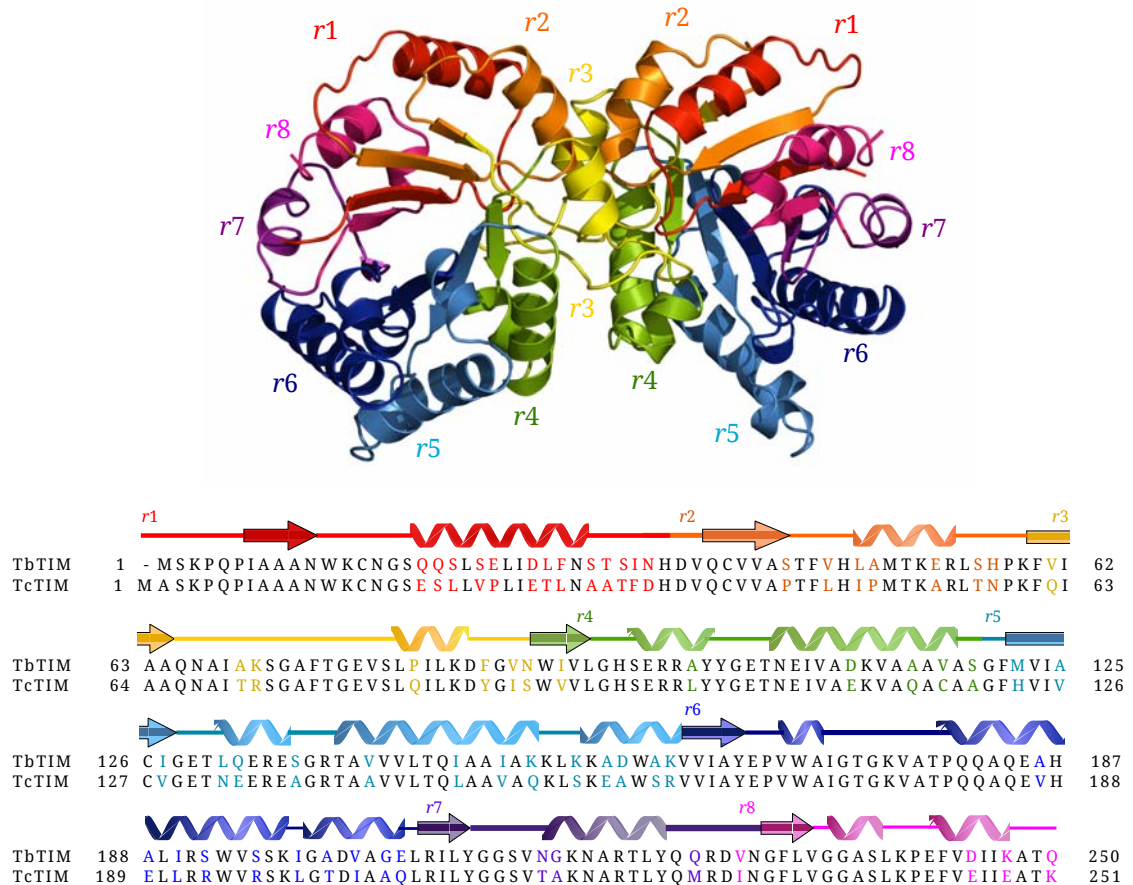


Figura 1.5: Representación de las 8 regiones y el alineamiento de las TIMs de *T. cruzi* y *T. brucei*. En la parte superior se encuentra la representación de la TIM mostrando las diferentes regiones que la constituyen en diferentes colores. En la parte inferior se encuentra el alineamiento de secuencia y la representación de su estructura secundaria. En negro se encuentra los aminoácidos que son iguales en las dos secuencias y en color se encuentran los aminoácidos que son diferentes en la secuencia [14].

Utilizando calorimetría diferencial de barrido, se determinó que la desnaturalización térmica de TcTIM y TbTIM es un proceso irreversible y cinéticamente controlado. La energía de activación, para el desplegamiento de TcTIM es de 793 kJ/mol y para TbTIM de 398 kJ/mol. El hecho de que la TcTIM se desnaturalice con una energía de activación mucho mayor tiene como consecuencia una velocidad de desnaturalización varios órdenes de magnitud menor, es decir TcTIM tiene una mayor estabilidad cinética que TbTIM [15].

1.3.1. Proteínas Químéricas

En la mitología clásica una quimera es un monstruo imaginario que vomitaba llamas y tenía cabeza de león, vientre de cabra y cola de dragón. Así, actualmente una quimera es aquello que se propone a la imaginación como posible o verdadero, no siéndolo. Las proteínas químéricas son generadas a partir de plásmidos generados sintéticamente que permiten la modificación y/o sustitución de regiones o dominios completos de una proteína (Fig. 1.6). Las proteínas químéricas permiten determinar la función e importancia de las diferentes regiones o dominios de su estructura.[16]

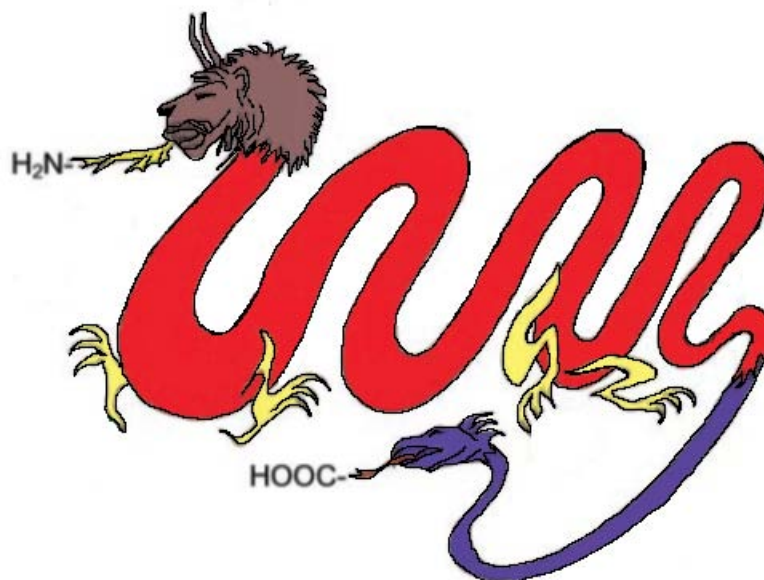


Figura 1.6: Representación de las proteínas químéricas.[16]

Como se mencionó en la sección 1.2, algunas enzimas glucolíticas de los tripanosomátidos son trasladadas y necesitan una ruta para llegar al glicosoma. Existen dos señales principales topogénicas (PTS) que dirigen las proteínas al peroxisoma o glicosoma. Estas señales se encuentran en los extremos de la secuencia de la proteína y son relativamente conservadas entre especies. En el caso de la TIM en los tripanosomátidos, no se encuentran dichas señales, por lo que se considera la posibilidad de que se tenga un péptido señal interno. Se identificó una secuencia de aminoácidos, la cual está relacionada con el importe de la TbTIM al glicosoma, mediante pruebas de inmunofluorescencia donde se fue siguiendo diferentes fragmentos pertenecientes a la TbTIM. Dicha secuencia consiste de la región del aminoácido 140 al 161, dichos aminoácidos pertenecen a la región 5 (ver 1.5) [10].

Por ello, en el presente trabajo se utilizaron dos quimeras de la TIM para que la diferencia entre TcTIM y TbTIM pueda ser estudiada con detalle. Las quimeras empleadas fueron la Q5TbTIM, que es la proteína TcTIM con la región 5 (del aminoácido 120 al 161) de TbTIM y la Q5TcTIM que es la proteína TbTIM con la región 5 de TcTIM. Con esto se podría observar el papel que tiene dicha región en la interacción de membrana-proteína.

1.4. Calorimetría Diferencial de Barrido

La figura 1.7 muestra esquemáticamente los elementos principales de un calorímetro diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés). Consiste de dos celdas, una para la muestra a analizar y la otra para la disolución de referencia, la cual es generalmente la disolución amortiguadora en la cual se preparó la muestra. Ambas celdas se mantienen a una pequeña diferencia de temperatura constante (ΔT). La diferencia de temperatura (ΔT) entre la celda de muestra y celda de la referencia se mantiene constante cuando se hace el barrido de temperatura. La diferencia de potencial que se aplica a alguna de las celdas para mantener el ΔT constante es la cantidad que se mide. La diferencia de potencial es directamente proporcional a la capacidad calorífica entre las muestras en las celdas.

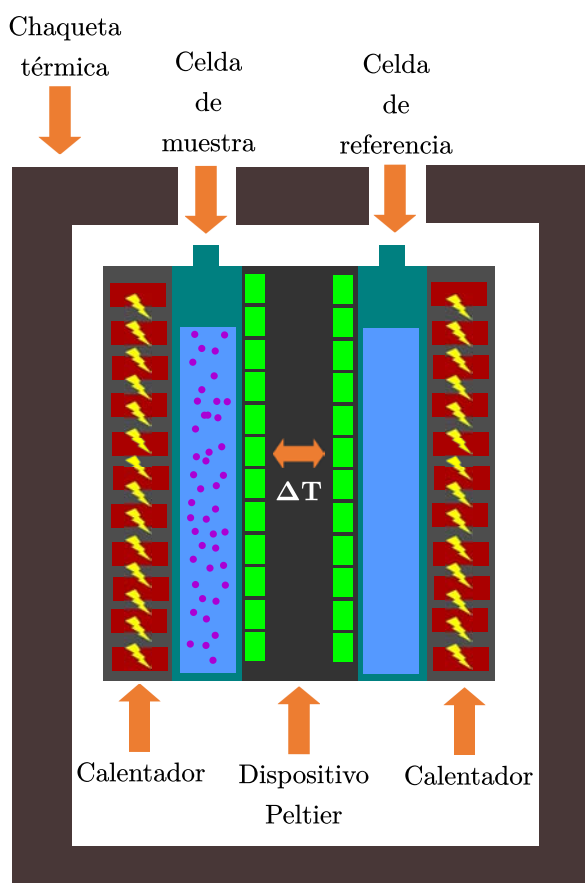


Figura 1.7: Ilustración esquemática de un DSC.

Cada experimento realizado en el DSC, consiste en tres mediciones; una de la referencia contra la referencia, la cual es nombrada línea base, otra de la referencia contra la muestra y la tercera es un nuevo barrido de esta última, para observar si la transición del estado nativo al desnaturalizado es reversible. Substrayendo la línea base a la traza obtenida con la muestra nos da la traza calorimétrica debida únicamente a la muestra. Dicha traza calorimétrica es reproducible para todos los sistemas si se encuentra la muestra en las mismas condiciones y el equipo bien calibrado. Con esta técnica se obtienen dos parámetros calorimétricos: (a) la entalpía (ΔH) asociada a la transición a estudiar y (b) la temperatura en la que ocurre el máximo de capacidad calorífica (T_m). Además, la cooperatividad de la transición está asociada al ancho de la señal debida a dicha transición.

Para el estudio de las interacciones entre membranas y proteínas se utilizan los liposomas, los cuales son modelos de membrana de composición conocida. En este trabajo se utilizaron liposomas unilamlares del fosfolípido DPPC. En el caso de muestras con liposomas y proteínas se observan tres transiciones (Figura 1.8), dos de ellas debidas al liposoma y otra a la proteína.

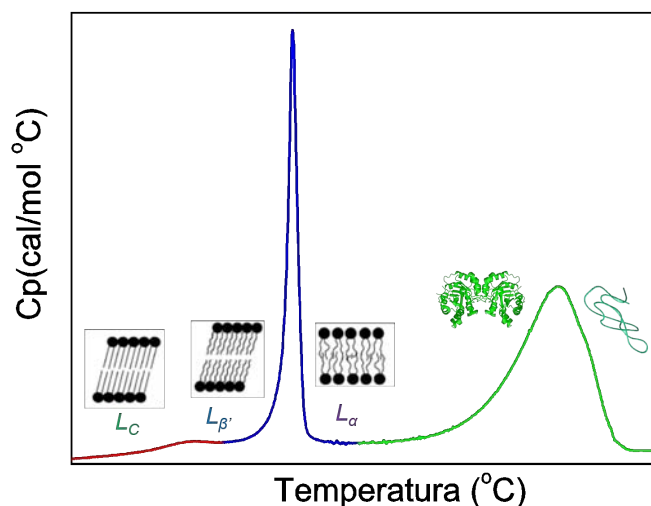


Figura 1.8: Termograma obtenido del DSC de un sistema típico en este trabajo. En rojo se encuentra la pre-transición y en azul la transición principal del liposoma. En verde la transición de la desnaturalización de la proteína.

Las dos transiciones del liposoma son la pre-transición y la transición principal. La pre-transición es donde coexisten la fase gel (L_β) y la fase ondulada (P_β). La

transición principal es donde coexisten la fase gel y la fase líquida (L_α).

Dichos cambios de fases reflejan cambios del arreglo geométrico y empaquetamiento de los fosfolípidos. Estas transiciones entre fases son reversibles y características, es decir, específicas para cada fosfolípido. En los fosfolípidos de la familia fosfatidilcolina existen 4 fases estables [17]:

- Fase laminar ortorrómbica cristalina (fase sub-gel)
- Fase laminar ortorrómbica (fase gel)
- Fase periódica hexagonal (fase ondulada)
- Fase desordenada líquida-cristalina (fase fluida)

Las transiciones de fase del liposoma dependientes de la temperatura son:

- Sub-transición (T_s): Es la transición entre la fase sub-gel y la gel. Para poder observar dicha transición es necesario incubar a bajas temperaturas por varios días, por lo que no se va considerar en este trabajo. Esta transición está relacionada con el incremento de desorden en la cadena alifática de los fosfolípidos [18].
- Pre-transición (T_p): Es la transición entre la fase gel y la ondulada. Está relacionada con el cambio en el empaquetamiento de los fosfolípidos, aunque modelos recientes sugieren que se debe principalmente a un incremento de la hidratación de la bicapa [19]. La pre-transición depende principalmente de la naturaleza química de la cabeza polar del fosfolípido. La pre-transición está presente para la familia de fosfatidilcolinas y fosfatidilgliceroles, pero no está presente en la familia de fosfatidiletanolaminas y glucolípidos [19].
- Transición principal (T_m): Es la transición entre la fase ondulada a la fluida. Es causada por el cambio en el orden presente de la membrana a uno más desordenado (de una fase más ordenada a una menos) y la pérdida de empaquetamiento de los fosfolípidos.

La transición de la proteína está asociada al desplegamiento térmico o desnaturalización térmica de la proteína. En caso de la TcTIM y TbTIM, esta desnaturalización térmica, es irreversible. La temperatura máxima de desplegamiento de TbTIM es de 54 °C y la de TcTIM es de 58 °C, para una velocidad de barrido de 60 °C/h [15].

1.5. Interacciones Membrana-Proteína

Las membranas biológicas son cruciales para los seres vivos. Las membranas están constituidas por lípidos, esteroides, proteínas periféricas e integrales, carbohidratos, etc. Los lípidos constituyen una barrera hidrofóbica la cual previene el intercambio arbitrario de elementos que se encuentran de un lado u otro. Realizar estos intercambios es función de las proteínas transmembranales. Regulan el intercambio de elementos o dirigen el transporte de dichos elementos entre ambos lados de la membrana. La especificidad de las interacciones membrana-proteínas son de importancia para la integración, actividad y plegamiento de las proteínas integrales, periféricas y aquellas que en algún momento tengan algún tipo de interacción con la membrana.

Las interacciones membrana-proteína juegan un papel en una gran variedad de procesos celulares, entre ellos la transducción de señales, transporte intracelular, catálisis de las enzimas, conversión de energía en la célula, defensa antimicrobiana y control de fusión de membranas [20–22]. Muchos padecimientos están relacionados con las interacciones de una membrana con una proteína, tales como la enfermedad de Parkinson [23], la enfermedad de Alzheimer [24, 25], diabetes tipo II [26], carcinoma de tiroides [27], encefalopatías espongiiformes [28], poli-neuropatías familiar [29], amiloidosis sistémica [29], entre otras.

Papahadjopoulos propuso la siguiente clasificación de interacción membrana-proteína [30] (Figura 1.9):

- Tipo 1: Proteínas solubles en agua, las cuales sólo tienen interacciones electrostáticas con la superficie de las membranas, es decir, con las cabezas polares de los fosfolípidos. Esto involucra una adsorción simple en la superficie de la membrana.

- Tipo 2: Proteínas solubles en agua, las cuales tienen interacción con las membranas con una combinación de fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas, teniendo interacción primero con las cabezas polares de los fosfolípidos y después con las cadenas hidrófobas de los mismos. Este tipo de proteínas pueden incorporarse parcialmente en la membrana provocando una disminución del grosor de la bicapa.
- Tipo 3: Proteínas insolubles en agua e intrínsecas a la membrana, que expanden la capa fosfolipídica e incrementan la permeabilidad de las membranas.

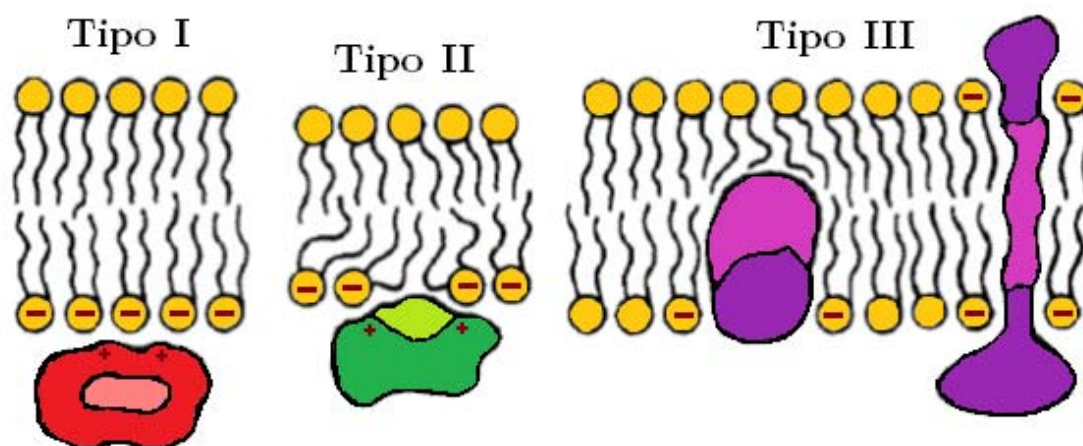


Figura 1.9: Representación de las interacciones proteína/membrana según el tipo de proteína. Las regiones hidrofóbicas de las proteínas se muestran en colores claros y las hidrofílicas en colores oscuros [30].

Las transiciones de los liposomas en presencia de proteínas normalmente no sufren un cambio. Es decir, se conserva la fase en la que se encuentra el liposoma. Únicamente se da un incremento de interacciones intra e intermoleculares. La cadena hidrofóbica sufre una expansión lateral y una disminución en el grosor de la bicapa, al igual, se da un ligero incremento del volumen del liposoma.

Para las proteínas de tipo I, no hay un incremento significativo en su temperatura de transición (T_m), y sólo existen ligeros cambios de la cooperatividad y su entalpía. Esto es debido a que sólo se dan interacciones electrostáticas superficiales y no hay un

cambio significativo en el liposoma. Para las proteínas de tipo II, hay un decremento en la temperatura de transición (T_m), un incremento en la cooperatividad y un decremento en su entalpía. Esto es debido a que se produce un cambio estructural en la proteína al penetrar parcialmente a la membrana. Para las proteínas de tipo III se tiene un cambio en su temperatura de transición (T_m) y en su cooperatividad, y se obtiene un cambio significativo de la entalpía. Esto es debido a que su penetración es mayor en comparación de las proteínas II.

Capítulo 2

Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

Dado que TbTIM y TcTIM son transcritas en el citosol, pero ejercen su función en el glicosoma, estas proteínas son capaces de atravesar la membrana de su respectivo glicosoma. Por ello, la hipótesis es que estas proteínas son de tipo II. Además, dado que la región 5 de la TIM en TbTIM es indispensable para la interacción con el glicosoma, la quimera Q5TbTIM tendrá una interacción mayor con los liposomas que la proteína Q5TcTIM.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivos Generales

Describir mediante parámetros fisicoquímicos las interacciones entre las TIMs con sistemas membranales modelo de DPPC; además, caracterizar el comportamiento de las proteínas frente a un sistema membranal con ergosterol.

2.2.2. Objetivos Particulares

Mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), describir:

- La interacción de las proteínas silvestres y quiméricas con las membranas de DPPC.
- La interacción de las proteínas silvestres con membranas de DPPC y ergosterol.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1. Materiales

El 1-2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol ($\geq 98\%$), ergosterol ($\geq 95\%$), cloroformo anhídrido ($\geq 99\%$), clorhidrato de etanolamina (TEA, $\geq 99.5\%$) y el ácido etildiaminotetraacético (EDTA, $\geq 98.5\%$) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Todos los reactivos fueron usados sin una purificación subsecuente.

3.2. Métodos

3.2.1. Diseño de los genes de las proteínas quiméricas.

Las quimeras generadas fueron la Q5TbTIM (la TIM de *T. cruzi* con la región 5 de T, brucei) y Q5TcTIM (la TIM de *T. brucei* con la región 5 de *T. cruzi*). Los genes fueron sintetizados por la compañía Genscript (Piscataway, NJ). Partiendo de las secuencias de ADN reportadas en la base del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) que codifican para TbTIM y TcTIM (códigos: X03921 y U53867, respectivamente) se diseñaron los genes de dos quimeras con las regiones 5 intercambiadas (aminoácidos 120 al 161). Los genes de las quimeras se clonaron en plásmido de expresión pET-3a con los sitios de restricción NdeI y BamHI. Cada gen fue secuenciado y transformado en células BL21(DE3)pLysS (Novagen, Madison WI).

3.2.2. Sobreexpresión y Purificación de las proteínas

Se realizó la expresión y la purificación de la TIM de *T. brucei* (TbTIM), *T. cruzi* (TcTIM) y las proteínas quiméricas según lo indicado en la referencia [13], en el laboratorio del Dr. Ruy Pérez Monfort bajo la supervisión de la Biol. Nallely Cabrera. (IFC, UNAM). La expresión se realizó en medios de Luria Bertani suplementados con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y se incubaron a 37 °C. Posteriormente, se indujeron con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido 0.4 mM y se incubaron de 16 horas a 37 °C. Siguiendo el protocolo de la referencia [13] se purificaron la TcTIM en el buffer de Lisis, mientras que TbTIM y las quimeras se purificaron con el buffer de Lisis con NaCl 300 mM. Para la purificación, se utilizó la columna con resina de intercambio iónico SP-Sepharose (Fast Flow) y la columna empacada con la resina hidrofóbica Toyopearl 650 M. Las proteínas se concentraron para tener una concentración final no mayor de 50 mg/mL.

3.2.3. Preparación de Liposomas

Se preparó una disolución buffer de TEA (100 mM) y EDTA (10 mM) a pH = 7.4. Usando un volumen adecuado de esta disolución a 55 °C, se añadió un peso de fosfolípido tal que la disolución final poseyera una concentración mayor a 2 mM. Esta disolución se extruyó (a 55 °C) a través de membranas inertes de policarbonato de 200 nm de diámetro (Millipore), 15 veces, a fin de obtener vesículas grandes unilaminares (LUV's) puras, usando un extrusor Lipex Extruder (British Columbia, Canadá). Las membranas con ergosterol fueron preparadas mediante la metodología conocida como evaporación de fase reversa. Se preparó una disolución 1 mg/mL de fosfolípido-cloroformo. La disolución resultante se lleva a un rotavapor a 55 °C y se somete a 12 horas de alto vacío, para eliminar cualquier traza de solvente orgánico. La película seca de fosfolípido se resuspendieron y se hidrataron con la disolución buffer de TEA y se sometieron a los ciclos de extrusión, tal y como se hizo con las membranas de DPPC puro.

3.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las mediciones de DSC se realizaron con un calorímetro diferencial de barrido de MicroCal VP-DSC (MicroCal, Inc.), con un volumen de celda de 515 μL . Cada barrido se realizó a una presión aproximada de 55.5 psi y constó de un tiempo de equilibrado de 30 minutos a 25 °C y la velocidad de barrido fue de 60 °C/h. Las muestras de liposomas estaban a una concentración de 0.03 mM en todos los casos, excepto en la medición de cinética y los liposomas dopados con ergosterol. La concentración de proteína varió entre 0.03 mM y 2 mM.

3.2.5. Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Se realizaron mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS) para las disoluciones de liposomas empleadas en este trabajo antes de ser usadas en el calorímetro, para conocer la distribución del tamaño de los liposomas. Se empleó el equipo Zetasizer μV (Malvern Instruments) cuyo rango de detección es de 0.15-1000 nm de radio, con un ángulo de 90 °. La concentración de liposomas para esta medición fue de 0.02 mM, teniendo 5 conjuntos de 20 mediciones cada una.

3.2.6. Actividad de las TIMs

La actividad enzimática fue determinada indirectamente en la dirección de gliceraldehido-3-fosfato (GAP) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) con la reacción de la α -glicerolfosfato deshidrogenasa (α -GDH) como un ensayo enzimático acoplado. La reacción iniciaba con la adición de 5 ng/mL de la enzima a la mezcla de la celda, que contenía 100 mM TEA, 10 mM EDTA, pH 7.4, 1 mM GAP, 0.2 mM β -Nicotiamida adenina dinucleótido (NADH) y 5 $\mu\text{g/mL}$ α -GDH. La oxidación del NADH fue seguida mediante espectrometría a 340 nm con un espectrómetro Cary.50 (Varian, Australia Pt, Ltd). La temperatura del bloque de la celda se mantuvo a 25 °C, con un baño de temperatura constante.

Capítulo 4

Resultados

Utilizando la técnica de DLS (sección 3.2.5) se comprobó que todas las muestras de liposomas empleadas en las mediciones calorimétricas tuvieron una distribución de diámetros homogénea y estrecha (centrada cerca de 200 nm). Así mismo, se comprobó que todas las proteínas eran catalíticamente competentes empleando el ensayo descrito en la sección 3.2.6. Todas las trazas calorimétricas se obtuvieron como se menciona en la sección 3.2.4.

4.1. Interacciones entre liposomas de DPPC y TIMs.

Se sabe que la TIM no cuenta con ninguno de las dos señales de direccionamiento al peroxisoma (PTSs). En un estudio realizado se identificó un fragmento de 22 aminoácidos (del aminoácido 140 al 161) de dicha proteína donde podría encontrarse el péptido señal y que tendría la capacidad de dirigir a la proteína para lograr entrar al glicosoma [10]. El fragmento se encuentra en la región 5 de la proteína, por lo que se logró expresar las proteínas quiméricas, donde se intercambiaron las regiones 5. Las quimeras fueron Q5TbTIM (TcTIM con la región 5 de TbTIM) y Q5TcTIM (TbTIM con la región 5 de TcTIM). Se obtuvieron las trazas calorimétricas de las proteínas quiméricas y de las proteínas silvestres en presencia y ausencia de liposomas en una relación 1/1 proteína/lípido (0.03 mM/0.03 mM) (Figuras 4.1 y 4.2).

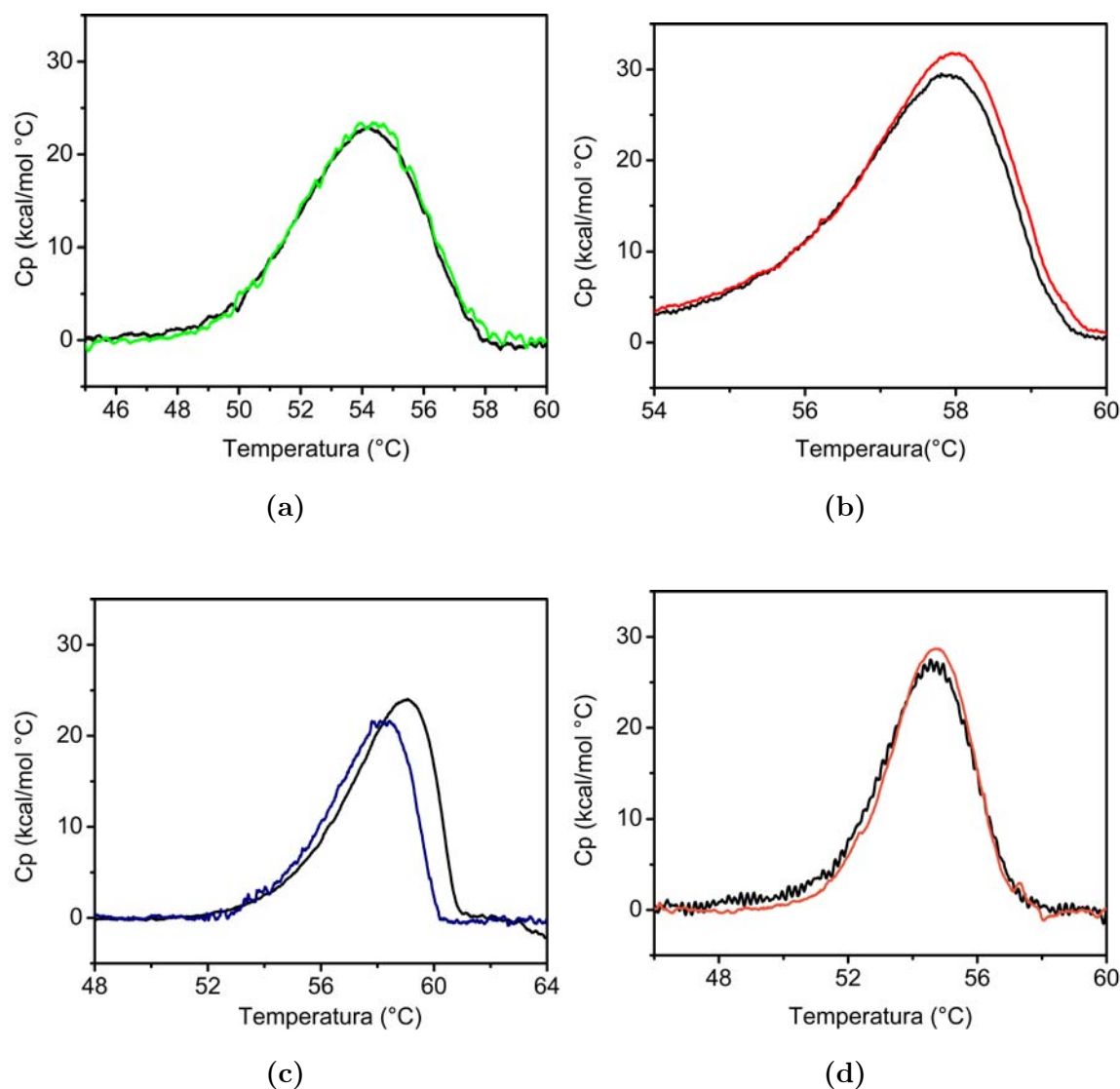


Figura 4.1: Termogramas de las proteínas silvestres y quiméricas en presencia y ausencia de liposomas en una relación (1/1). (a) Trazas de la TbTIM en presencia (verde) y ausencia de liposomas (negro), (b) Trazas de la TcTIM en presencia (rojo) y ausencia de liposomas (negro), (c) Trazas de la Q5TbTIM en presencia (azul) y ausencia de liposomas (negro); y (d) Trazas de la Q5TcTIM en presencia (naranja) y ausencia de liposomas (negro).

Para representar los cambios en los parámetros termodinámicos de la proteína en presencia de liposomas y de los liposomas en presencia de liposomas, se definen las diferencias en las ecuaciones 4.1, 4.2 y 4.3.

Donde la diferencia de T_m se define como ΔT_m (ecuación 4.1), la diferencia de $T_{1/2}$ se define como $\Delta T_{1/2}$ (ecuación 4.2) y la diferencia entre ΔH se compara con el porcentaje que se define como $\% \Delta H$ (ecuación 4.3).

$$\Delta T_m = T_{m_{mezcla}} - T_{m_{proteina\ o\ glicosoma}} \quad (4.1)$$

$$\Delta T_{1/2} = T_{1/2_{mezcla}} - T_{1/2_{proteina\ o\ glicosoma}} \quad (4.2)$$

$$\% \Delta H = \frac{\Delta H_{mezcla} - \Delta H_{proteina\ o\ glicosoma}}{\Delta H_{proteina\ o\ glicosoma}} * 100 \% \quad (4.3)$$

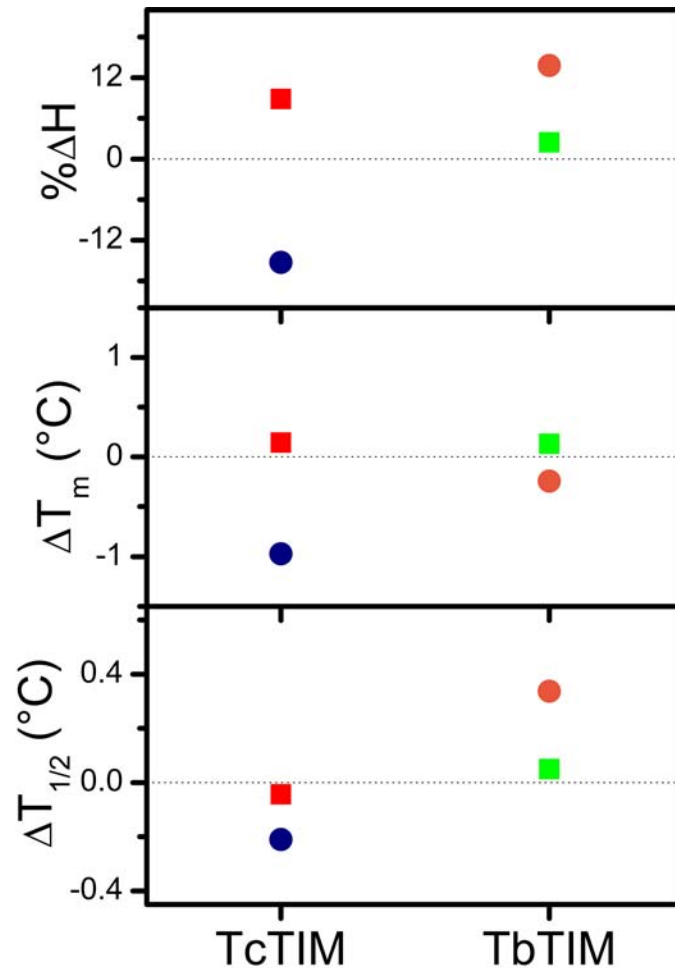


Figura 4.2: La diferencia de los parámetros termodinámicos determinados mediante el efecto que tienen los liposomas sobre las proteínas y el papel que juega la región 5 a una relación 1/1 (proteína/liposoma). En rojo TcTIM, en verde TbTIM, en azul Q5TbTIM y en naranja Q5TcTIM.

En la Figura 4.2, se aprecia que ninguna proteína tiene un cambio significativo en sus trazas calorimétricas en presencia de liposomas comparando con las trazas calorimétricas en ausencia de liposomas en la Figura 4.2. Es decir, no hay un cambio apreciable y significativo en su ΔH , T_m y $T_{1/2}$. Estos resultados indican que las proteínas se encuentran en la disolución comportándose como una proteína tipo I, en la presencia de liposomas de DPPC a una relación 1/1 (proteína/liposoma). Es decir, la hipótesis de que la TbTIM y la Q5TbTIM podrían ser proteínas tipo II en su interacción con la membrana modelo es falsa.

4.2. Efecto de la concentración y tiempo en la interacción entre liposomas y proteínas silvestres.

4.2.1. Efecto de la concentración.

Al observar los resultados en la sección 4.1 puede suponerse que la falta de interacción de los liposomas con las proteínas sea debida a la baja concentración de liposomas. Por ello, se aumentó la relación proteína/lípido a 1/10, 1/20 y 1/30 con las proteínas silvestres. En estos experimentos, se aumentó la concentración de los liposomas a 2 mM y se optó por conservar la concentración de liposomas fija y variar la concentración de las proteínas para alcanzar las relaciones mencionadas.

La figura 4.3 muestra que las proteínas silvestres, los termogramas son similares a las distintas relaciones evaluadas. Esto confirma que la proteína se encuentra en la disolución comportándose como una proteína tipo I, en la presencia de liposomas de DPPC a las distintas relaciones de concentración evaluadas.

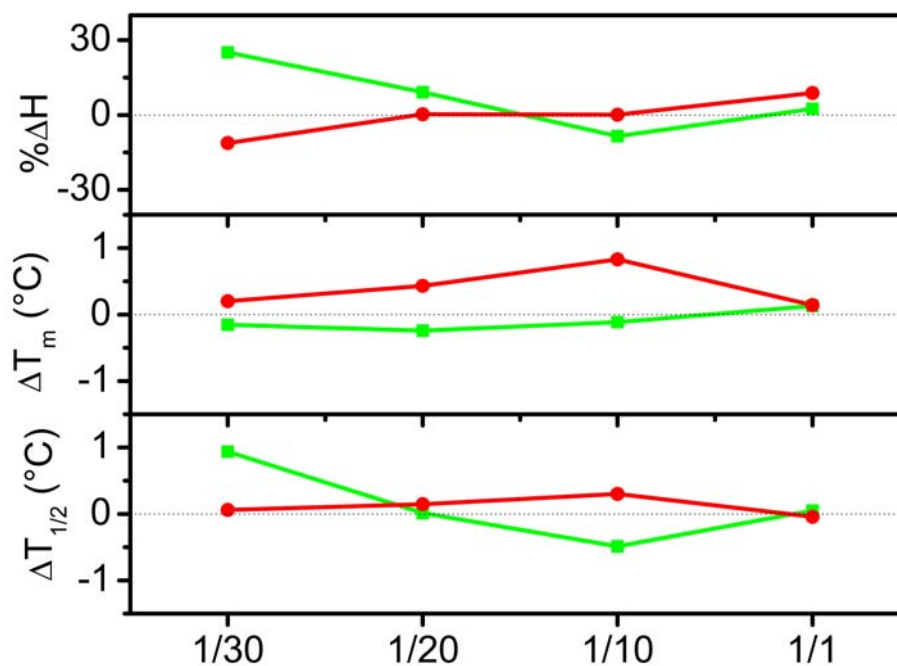


Figura 4.3: Efecto de la concentración de liposomas sobre las proteínas silvestres TcTIM (rojo) y TbTIM (verde) a diferentes relación de proteína / lípido (mol/mol).

4.2.2. Efecto del tiempo de incubación.

Un factor que podría ser importante en los resultados de las figuras 4.2 y 4.3 es el tiempo de incubación, es decir, el tiempo transcurrido antes de la medición calorimétrica y durante el cual las proteínas y liposomas ya están en contacto. Por lo anterior, se planteó estudiar la evolución cinética del sistema proteína-liposoma. Para este experimento, se eligió como relación proteína/liposoma la relación de 1/30 y 8 días como tiempo máximo de incubación. Se obtuvieron los termogramas incubando a una temperatura de 25 °C a los tiempos de 0 horas, 24 horas (un día), 72 horas (tres días) y 192 horas (8 días). Con los termogramas se obtuvieron los datos calorimétricos de la transición principal del liposoma y de la transición de la desnaturalización de las proteínas y se compararon con los parámetros calorimétricos de los liposomas y proteínas puras de cada sistema para obtener la cinética de la interacción membrana-proteína.

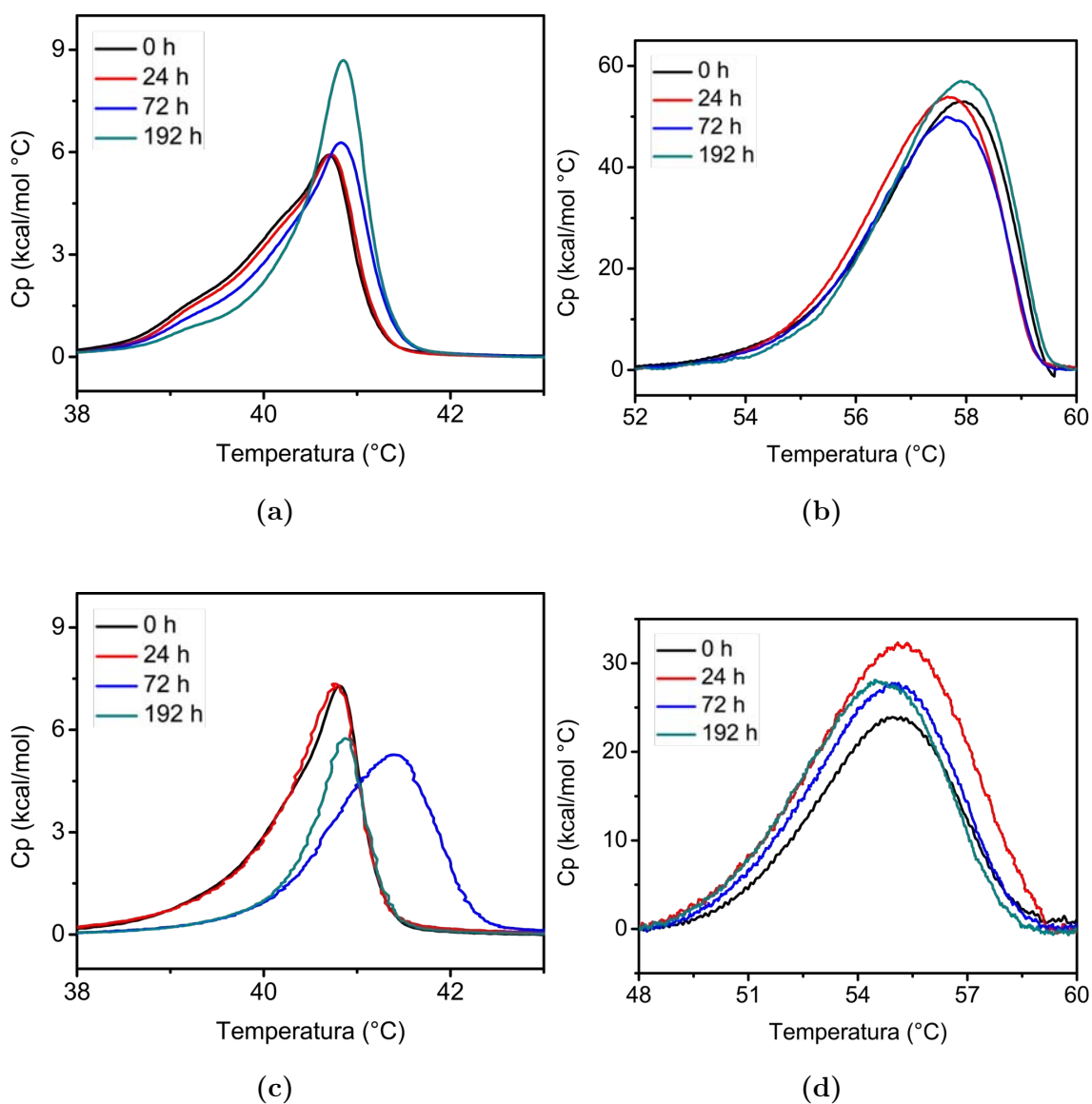


Figura 4.4: Termogramas a distintos tiempos para el sistema de liposomas de DPPC con las TIMs (1/30). (a) Transición principal de los liposomas con TcTIM. (b) Transición de TcTIM en presencia de liposomas. (c) Transición principal de los liposomas con TbTIM. (d) Transición de TbTIM en presencia de liposomas.

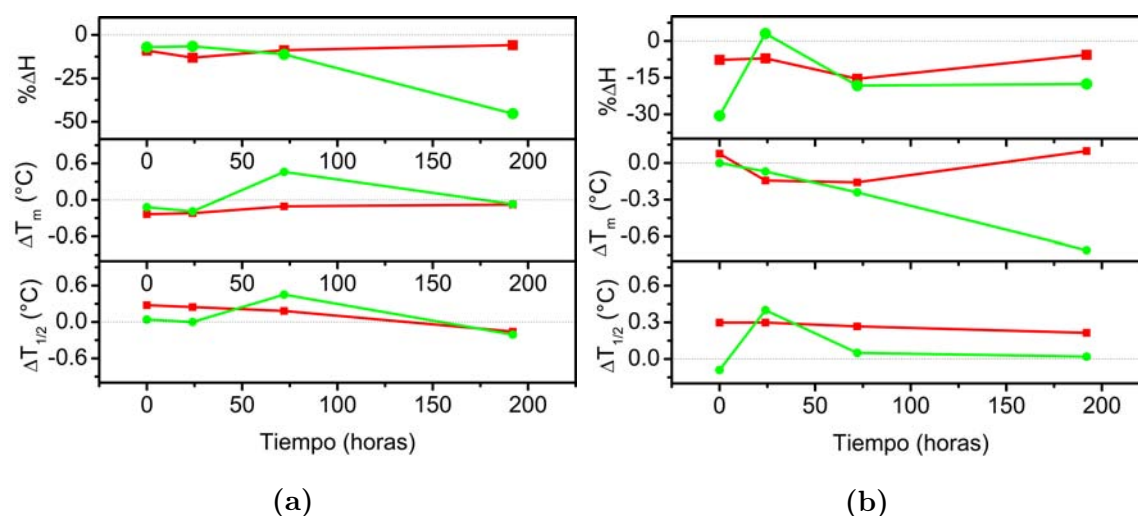


Figura 4.5: Cinética de los parámetros calorimétricos del sistema TIM/liposomas (a) Cinética de los parámetros calorimétricos de TbTIM (verde) y TcTIM (rojo) sobre los liposomas de DPPC. (b) Cinética de los parámetros calorimétricos de los liposomas de DPPC sobre TbTIM (verde) y TcTIM (rojo).

Respecto a la T_m y $T_{1/2}$ no hay un cambio apreciable en ninguno de los sistemas ya que los cambios observados son menores a 1 grado. Sin embargo, se tiene a la semana un cambio significativo en la entalpía de la transición de los liposomas en presencia de TbTIM. Dicho cambio no es apreciable con el sistema de TcTIM con liposomas. Este cambio puede ser debido a un envejecimiento (floculación) de los liposomas. En resumen, las proteínas se comportan como tipo I frente a los liposomas de DPPC y no tienen dependencia con el tiempo de incubación.

Dado que las proteínas TcTIM y TbTIM se comportan como proteínas tipo I, las interacciones con los liposomas de DPPC son de naturaleza electrostática. Estas interacciones ocurren entre la superficie cargada negativamente de los liposomas y las cargas superficiales en las proteínas. Mediante el servidor H++ se obtuvo el gráfico de como se va variando la carga total de la proteína respecto al pH, dicho gráfico se obtuvo a partir de los residuos titulables y que se encuentran cerca de la superficie de la proteína [31].

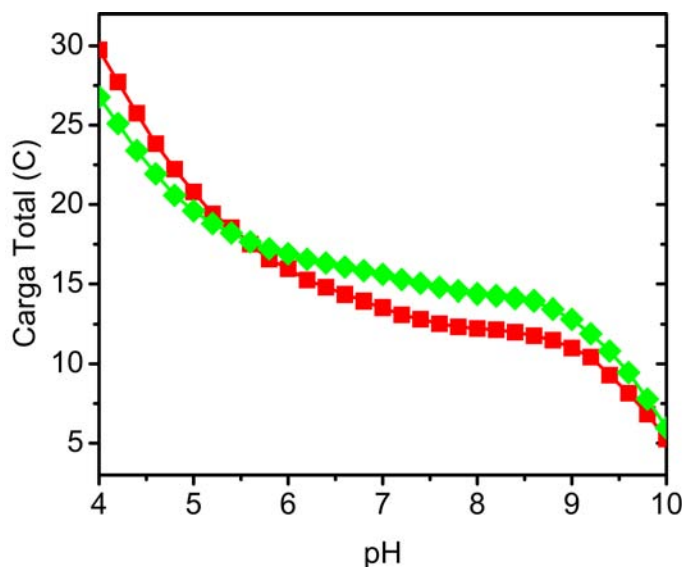


Figura 4.6: Gráfico de la carga total de las proteínas TbTIM (verde) y TcTIM (rojo) contra el pH, obtenida con el servidor H++.

Se observa que la carga total de la proteína a un pH cercano a 7.4 es mayor para TbTIM que para TcTIM, por lo que TbTIM debe de tener una mayor interacción electrostática con las membranas. A pesar de dicha diferencia no se observan cambios significativos en las trazas calorimétricas.

4.3. Interacciones de las proteínas con liposomas con ergosterol.

Se sabe que el glicosoma está compuesto por varios fosfolípidos [4] y esteroides, principalmente: colesterol, el cual es obtenido fuera del parásito, y ergosterol, el cual es sintetizado por el parásito. Se sabe que el ergosterol se encuentra en una mayor cantidad en el glicosoma [32], por lo que es de mayor relevancia biológica para estos parásitos. Para mimetizar mejor el glicosoma se obtuvieron los termogramas mediante DSC de los sistemas de liposomas de DPPC dopados con ergosterol (10 % mol/mol) en ausencia y presencia de las proteínas TbTIM y TcTIM. Se optó por 10 % del esteroide para poder comparar con los termogramas de liposomas con colesterol obtenidos en otro trabajo [33], del mismo modo se utilizó una relación 1/10 proteína/lípido.

En la figura 4.7 se muestran los termogramas de la transición principal de los liposomas dopados con ergosterol, en presencia y ausencia de proteína en una relación 1/10.

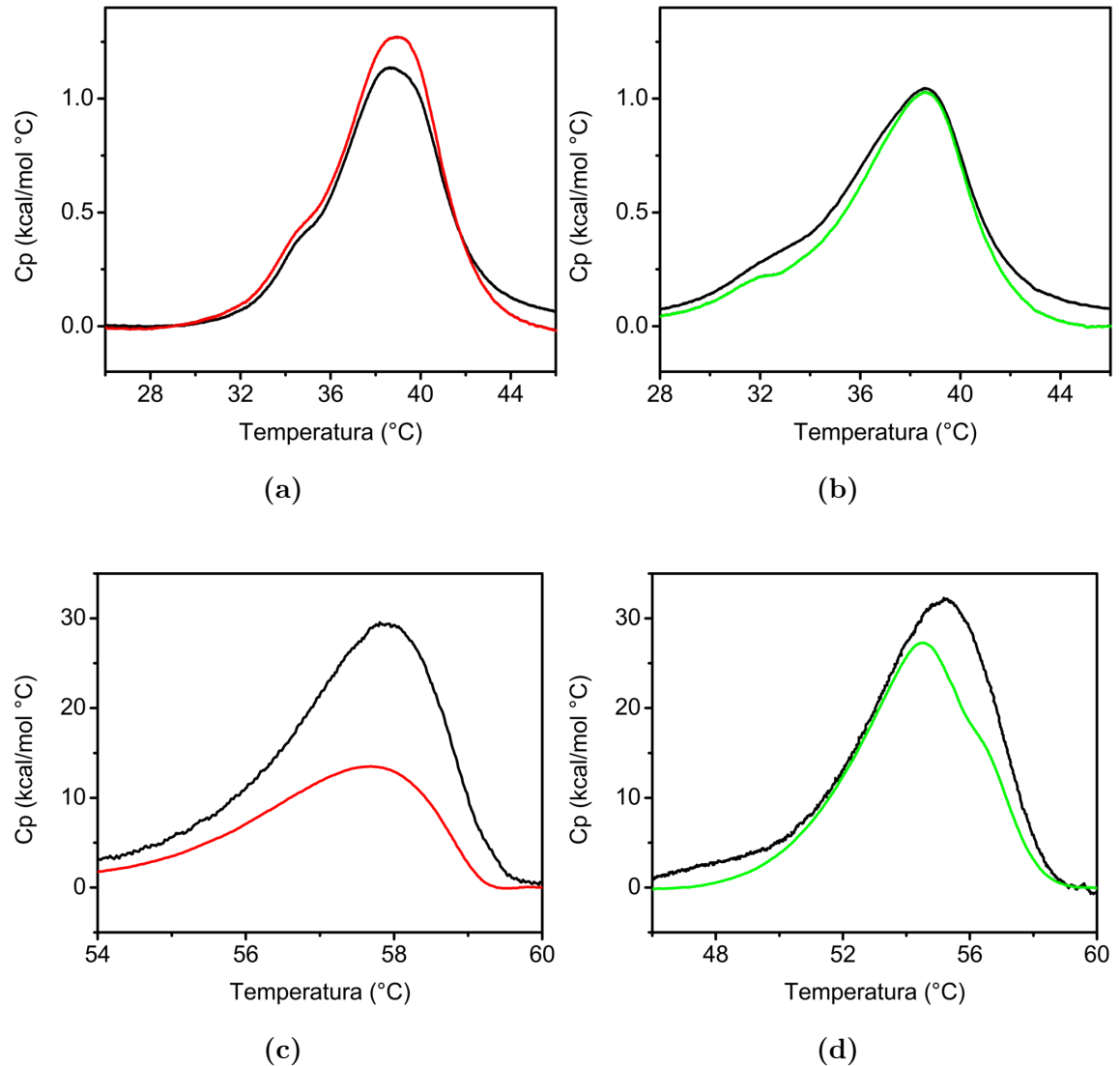


Figura 4.7: (a) y (b) Transición principal de los liposomas de DPPC con ergosterol (10% mol/mol) en ausencia (negro) y presencia de las proteínas silvestres (TcTIM en rojo y TbTIM en verde). (c) y (d) Transición asociada al desplegamiento de las proteínas silvestres en ausencia (negro) y presencia de liposomas dopados con ergosterol (TcTIM en rojo y TbTIM en verde).

En la transición principal de los liposomas no se presentan cambios, es decir los

valores de T_m , ΔH y $T_{1/2}$ no son diferentes en presencia y ausencia de las proteínas silvestres como se aprecia en la figura 4.7.

En la figura 4.7 se muestran los termogramas de la transición asociada al desplegamiento de la proteína en ausencia y presencia de liposomas dopados con ergosterol.

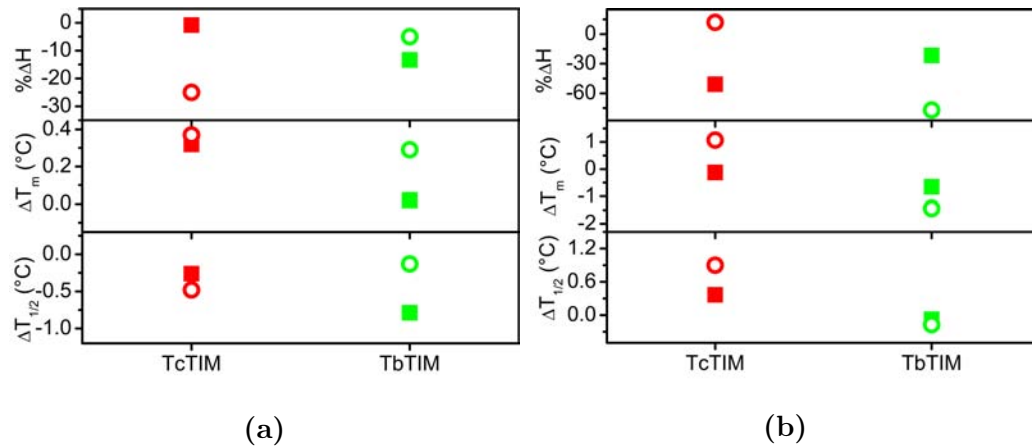


Figura 4.8: Parámetros termodinámicos para la transición principal de los liposomas de DPPC con ergosterol (cuadrados rellenos) y colesterol (círculos vacíos) 10 % mol/mol en presencia de las proteínas silvestres (TbTIM en verde, TcTIM en rojo) (a). Transición de las proteínas silvestres (TbTIM en verde, TcTIM en rojo) en presencia de liposomas de DPPC con ergosterol (cuadrados rellenos) y colesterol (círculos vacíos) 10 % mol/mol. Los datos de colesterol se obtuvieron en [33].

En la figura 4.8, para el caso de ergosterol, se aprecia un cambio en la T_m de la transición de TbTIM de 1 °C, una disminución de su ΔH de 20% y un cambio de $T_{1/2}$ de 0.6 °C. En cambio con TcTIM, no se aprecia un cambio de la T_m significativo (<1 °C), pero se ve una disminución del 50% del ΔH y un cambio de su $T_{1/2}$ de 2 °C. Este es un indicio de que TcTIM se encuentra parcialmente desplegada en presencia de los liposomas dopados con ergosterol. Claramente, el ergosterol es muy relevante para la interacción entre la membrana y la proteína. Respecto al colesterol se apreciaba que se comportan de una forma similar las transiciones de liposomas y proteínas.

Capítulo 5

Conclusiones y Perspectivas

Conclusiones

- Las proteínas silvestres y quimeras empleadas en este trabajo son proteínas tipo I frente a liposomas de DPPC a las relaciones de concentración proteína/lipido de 1/1, 1/10, 1/20 y 1/30.
- Los resultados calorimétricos (DSC) no apoyan las hipótesis planteadas a partir de la literatura bioquímica respecto a la interacción entre las proteínas con la membrana del glicosoma.
- La interacción de TcTIM con las membranas es favorecida por la presencia de ergosterol.

Perspectivas

Con los resultados obtenidos de este trabajo se sugieren los siguientes puntos:

- El uso de 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC) para la fabricación de liposomas, ya que este es el fosfolípido principal de los parásitos.
- Tratar de mimetizar el glicosoma, generando liposomas con diferentes mezclas de fosfolípido y esteroides.
- El uso del calorímetro de titulación isotérmica (ITC) como herramienta para el estudio de este sistema.

Bibliografía

- [1] Organización Mundial de la Salud. Chagas disease (american trypanosomiasis) @<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, June 2016.
- [2] Organización Mundial de la Salud. Trypanosomiasis, human african (sleeping sickness) @<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en>, February 2016.
- [3] A. G. M. Tielens y J. J. Van Hellemond. Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. *Parasitol. Today*, 14(7):265–271, 1998.
- [4] F. R. Opperdoes, P. Baudhuin, I. Coppens, C. De Roe, S. W. Edwards, P. J. Weijers y O. Misset. Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.*, 98(4):1178–1184, 1984.
- [5] J. R. Haanstra. Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(46):17718–23, 2008.
- [6] P. S. Kessler y M. Parsons. Probing the role of compartmentation of glycolysis in procyclic form *Trypanosoma brucei*: RNA interference studies of PEX14, hexokinase, and phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.*, 280(10):9030–9036, 2005.
- [7] C. Guerra-Giraldez, L. Quijada y C. E. Clayton. Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.*, 115:2651–2658, 2002.

- [8] B. Moyersoen, R. E. Beever y F. Martin. Genetic diversity of *Pisolithus* in New Zealand indicates multiple long-distance dispersal from Australia. *New Phytol.*, 160(3):569–579, 2003.
- [9] H. Krazy y P. Michels. Identification and characterization of three peroxins—PEX6, PEX10 and PEX12—involved in glycosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1763(1):6–17, 2006.
- [10] N. Galland, S. de Walque, F. G. J. Voncken, C. Verlinde y P. Michels. An internal sequence targets *Trypanosoma brucei* triosephosphate isomerase to glycosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 171(1):45–49, 2010.
- [11] W. J. Albery y J. R. Knowles. Efficiency and evolution of enzyme catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 16(5):285–293, 1977.
- [12] R. Urfer y K. Kirschner. The importance of surface loops for stabilizing an eightfold beta alpha barrel protein. *Protein Sci.*, 1(1):31–45, 1992.
- [13] I. García Torres. Quimeras de la triosafosfato isomerasa: Transformación progresiva de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* en la triosa fosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*. *Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.*, Julio 2012.
- [14] A. G. Quezada, A. J. Díaz-Salazar, N. Cabrera, R. Pérez-Montfort, A. Piñeiro y M. Costas. Interplay between Protein Thermal Flexibility and Kinetic Stability. *Structure*, 2016, en prensa.
- [15] M. Costas, D. Rodríguez-Larrea, L. De Maria, T. V. Borchert, A. Gómez-Puyou y J. M. Sanchez-Ruiz. Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *J. Mol. Biol.*, 385(3):924–937, 2009.
- [16] D. Yin, S. Gavi, H. Wang y C. Malbon. Probing receptor structure / function with chimeric G-protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.*, 65(6):1323–1332, 2004.

- [17] C. B. Fox, R. H. Uibel y J. M. Harris. Detecting phase transitions in phosphatidylcholine vesicles by Raman microscopy and self-modeling curve resolution. *J. Phys. Chem. B*, 111(39):11428–11436, 2007.
- [18] R. Koynova y B. Tenchov. Interactions of surfactants and fatty acids with lipids. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 6(3):277–286, 2001.
- [19] T. Heimburg. Physical properties of biological membranes. *Handbook of Molecular Biophysics*. Ed. H. G. Bohr. Wiley-VCH, pages 593–616, 2009.
- [20] M. S. Terakawa, H. Yagi, M. Adachi, Y. Lee y Y. Goto. Small liposomes accelerate the fibrillation of amyloid β (1-40). *J. Biol. Chem.*, 290(2):815–826, 2014.
- [21] B. Mikhail, E. Mileykovskaya y W. Dowhan. Lipids in the assembly of membrane proteins and organization of protein supercomplexes. *Subcell Biochem.*, 49:197–239, 2008.
- [22] J. M. Holopainen, J. Lehtonen y P. Kinnunen. Lipid microdomains in dimyristoylphosphatidylcholine–ceramide liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, 88(1):1–13, 1997.
- [23] M. Zhu, P. O. Souillac, C. Ionescu-Zanetti, S. A. Carter y A. L. Fink. Surface-catalyzed amyloid fibril formation. *J. Biol. Chem.*, 277(52):50914–50922, 2002.
- [24] M. Bokvist, F. Lindstrom, A. Watts y G. Grobner. Two types of Alzheimer’s β -Amyloid (1-40) peptide membrane interactions: Aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation. *J. Mol. Biol.*, 335(4):1039–1049, 2004.
- [25] C. N. Chirita, M. Necula y J. Kuret. Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro. *J. Biol. Chem.*, 278(28):25644–25650, 2003.
- [26] J. D. Knight y A. D. Miranker. Phospholipid catalysis of diabetic amyloid assembly. *J. Mol. Biol.*, 341(5):1175–1187, 2004.

- [27] S. Wang, T. A. Good y D. L. Rymer. The influence of phospholipid membranes on bovine calcitonin peptide's secondary structure and induced neurotoxic effects. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37(8):1656–1669, 2005.
- [28] J. Kazlauskaitė, N. Sanghera, I. Sylvester, C. Ve y T. J. T. Pinheiro. Structural changes of the prion protein in lipid membranes leading to aggregation and fibrilization. *Biochemistry*, 42(11):3295–3304, 2003.
- [29] H. Zhao, E. Tuominen y P. Kinnunen. Formation of amyloid fibers triggered by phosphatidylserine-containing membranes. *Biochemistry*, 43(32):10302–10307, 2004.
- [30] K. Jacobson y D. Papahadjopoulos. Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations. *Biochemistry*, 14(1):152–161, 1975.
- [31] R. Anandakrishnan, B. Aguilar y A. V. Onufriev. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulation. *Nucleic Acids Res.*, (40(W)):W537–541, 2012.
- [32] W. Quiñones, J. A. Urbina, M. Dubourdiou y J. L. Concepción. The glycosome membrane of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: Protein and lipid composition. *Exp. Parasitol.*, 106(3-4):135–149, 2004.
- [33] M. A. Magaña. Interacciones proteína-liposoma caracterizadas por calorimetría diferencial de barrido. *Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.*, Octubre, 2015.
- [34] Y. P. Zhang, R. Lewis, R. S. Hodges y R. N. McElhaney. Interaction of a peptide model of a hydrophobic transmembrane alpha-helical segment of a membrane protein with phosphatidylcholine bilayers: differential scanning calorimetry and Fourier transform infrared spectroscopic studies. *Biochemistry*, 31:11579–11588, 1992.
- [35] S. L. Timm, A. D. Pereira-Netto y M. M. Oliveira. Fatty acids of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.*, 71(3):397–402, 1982.

- [36] T. Wieprecht, O. Apostolov, M. Beyermann y J. Seelig. Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa: Thermodynamic and mechanistic aspects. *Biochemistry*, 39(2):442–452, 2000.
- [37] M. R. Wenk y J. Seelig. Magainin 2 amide interaction with lipid membranes: Calorimetric detection of peptide binding and pore formation. *Biochemistry*, 37(11):3909–3916, 1998.
- [38] G. P. Gorbenko y P. K. Kinnunen. The role of lipid-protein interactions in amyloid-type protein fibril formation. *Chem. Phys. Lipids*, 141(1-2):72–82, 2006.
- [39] G. P. Gorbenko, V. M. Ioffe y Paavo K. J. Kinnunen. Binding of lysozyme to phospholipid bilayers: evidence for protein aggregation upon membrane association. *Biophys. J.*, 93(1):140–153, 2007.
- [40] D. T. Hart, P. Baudhuin y F. R. Opperdoes. Biogenesis of the glycosome in *Trypanosoma brucei*: the synthesis, translocation and turnover of glycosomal polypeptides. *EMBO J.*, 6(5):1403–1411, 1987.
- [41] J. J. Bergers, M. H. Vingerhoeds y J. N; Janssen L. H; Fischer M. J; Crommelin D. J. van Bloois, L; Herron. The role of protein charge in protein-lipid interactions. pH-dependent changes of the electrophoretic mobility of liposomes through adsorption of water-soluble, globular proteins. *Biochemistry*, 32(17):4641–4649, 1993.
- [42] H. Yokoyama, K. Ikeda, M. Wakabayashi, Y. Ishihama y M. Nakano. Effects of lipid membrane curvature on lipid packing state evaluated by isothermal titration calorimetry. *Langmuir*, 29(3):857–860, 2012.
- [43] K. Temmerman y W. Nickel. A novel flow cytometric assay to quantify interactions between proteins and membrane lipids. *J. Lipid Res.*, 50(6):1245–1254, 2009.
- [44] I. Shin, D. Kreimer, I. Silman y L. Weiner. Membrane-promoted unfolding of

- acetylcholinesterase: a possible mechanism for insertion into the lipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(7):2848–2852, 1997.
- [45] J. F. Nagle. Theory of biomembrane phase transitions. *J. Chem. Phys.*, 58(1):252, 1973.
- [46] G. Klocek, T. Schulthess, Y. Shai y J. Seelig. Thermodynamics of melittin binding to lipid bilayers. Aggregation and pore formation. *Biochemistry*, 48(12):2586–2596, 2009.
- [47] J. F. Nagle. Lipid bilayer phase transition: density measurements and theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 70(12):3443–3444, 1973.
- [48] R. N. McElhaney. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chem. Phys. Lipids*, 30(2-3):229–259, 1982.
- [49] C. Arnulphi, L. Jin, M. A. Tricerri y A. Jonas. Enthalpy-driven apolipoprotein A-I and lipid bilayer interaction indicating protein penetration upon lipid binding. *Biochemistry*, 43(38):12258–12264, 2004.
- [50] J. M. Steim, M. E. Tourtellotte, J. C. Reinert, R. N. McElhaney y R. L. Rader. Calorimetric evidence for the liquid-crystalline state of lipids in a biomembrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (1):104–109.
- [51] J. R. Henriksen y T. L. Andresen. Thermodynamic profiling of peptide membrane interactions by isothermal titration calorimetry: A search for pores and micelles. *Biophys. J.*, 101(1):100–109, 2011.
- [52] J. F. Nagle y S. Tristram-Nagle. Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.*, 1469(3):159–195, 2000.
- [53] J. F. Faucon, J. Dufourcq, C. Lussan y R. Bernon. Lipid-protein interactions in membrane models fluorescence polarization study of cytochrome b5-phospholipids complexes. *BBA - Biomembr.*, 436(2):283–294, 1976.

- [54] Y. Lin, D. Liu, H. Haw y L. Tseng. Measurement of the second virial coefficient of DPPC- and DPPG-liposomes by isothermal titration calorimetry. *J. Chinese Inst. Chem. Eng.*, 38(2):103–106, 2007.
- [55] K. Shiffer, S. Hawgood, H. P. Haagsman, B. Benson, J. Clements y J. Goerke. Lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, alter the thermodynamic properties of phospholipid membranes: A differential calorimetry study. *Biochemistry*, 32:590–597, 1993.
- [56] P. C. Mason, B. D. Gaulin, R. M. Epand, G. D. Wignall y J. S. Lin. Small angle neutron scattering and calorimetric studies of large unilamellar vesicles of the phospholipid dipalmitoylphosphatidylcholine. *Phys. Rev. E*, 59(3):3361–3367, 1999.
- [57] M. Michalek y M. Leippe. Mechanistic insights into the lipid interaction of an ancient saposin-like protein. *Biochemistry*, 54(9):1778–1786, 2015.
- [58] B. Mui, L. Chow y M. J. Hope. Extrusion technique to generate liposomes of defined size. *Methods Enzymol.*, 367(1980):3–14, 2003.
- [59] Polikandritou L., E. Sheu, J. S. Lin y H. A. Pereira. Interaction of a synthetic peptide based on the neutrophil-derived antimicrobial protein CAP37 with dipalmitoyl-phosphatidylcholine membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1329(2):285–290, 1997.
- [60] A. A. Polyansky, P. E. Volynsky, A. S. Arseniev y R. G. Efremov. Adaptation of a membrane-active peptide to heterogeneous environment. II. The role of mosaic nature of the membrane surface. *J. Phys. Chem. B*, 113(4):1120–1126, 2009.
- [61] B. Wang, L. Zhang, S. C. Bae y S. Granick. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(47):18171–18175, 2008.
- [62] M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb y P. R. Cullis. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution,

- trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *BBA - Bio-membr.*, 812(1):55–65, 1985.
- [63] R. Galántai, I. Bárdos-Nagy, K. Módos, J. Kardos, P. Závodszky y J. Fidy. Serum albumin-lipid membrane interaction influencing the uptake of porphyrins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 373(1):261–270, 2000.
- [64] H. M. Seeger, C. A. Bortolotti, A. Alessandrini y P. Facci. Phase-transition-induced protein redistribution in lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B*, 113(52):16654–16659, 2009.
- [65] J. Sabín, G. Prieto, J. Estelrich, F. Sarmiento y M. Costas. Insertion of semi-fluorinated diblocks on DMPC and DPPC liposomes. Influence on the gel and liquid states of the bilayer. *J. Colloid Interface Sci.*, 348(2):388–392, 2010.
- [66] A. Ortiz y J. C. Gómez-Fernández. A differential scanning calorimetry study of the interaction of free fatty acids with phospholipid membranes. *Chem. Phys. Lipids*, 45:75–91, 1987.
- [67] F. R. Opperdoes y P. Borst. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: The glycosome. *FEBS Lett.*, 80(2):360–364, 1977.
- [68] B. Bakker, H. Westerhoff y P. Michels. Regulation and control of compartmentalized glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 27(5):513–525, 1995.
- [69] S. Keller, S. Keller, H. Heerklotz y H. Heerklotz. Monitoring lipid membrane translocation of sodium dodecyl sulfate by isothermal titration calorimetry. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(4):1279–1286, 2006.
- [70] I. García-Torres, N. Cabrera, A. Torres-Larios, M. Rodríguez-Bolaños, S. Díaz-Mazariegos, A. Gómez-Puyou y R. Perez-Montfort. Identification of amino acids that account for long-range interactions in two triosephosphate isomerases from pathogenic trypanosomes. *PLoS One*, 6(4), 2011.

- [71] N. Baker, D. Sept, S. Joseph, Holst M. J. y McCammon J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (98):0037–10041, 2001.