

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO



**Expresión y caracterización funcional de la actividad chaperona
de la proteína BIP/HSP70 de *Entamoeba histolytica***

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
PRESENTA**

Andrea Rosalía Quintana Sotelo

Tijuana, B. C.

Marzo de 2013.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Tijuana, Baja California
Febrero de 2013

C. ANDREA ROSALIA QUINTANA SOTELO

Pasante de Químico Farmacobiólogo

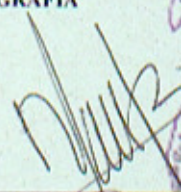
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS


es propuesto por el **DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA** y por la **DRA. ROSA ELENA MARES ALEJANDRE** quienes serán responsables de la calidad de trabajo que usted presenta, referido al tema:

"Expresión y caracterización funcional de la actividad chaperona de la proteína BIP/HSP70 de Entamoeba histolytica" el cual deberá desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

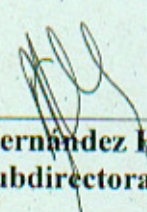
- I.- INTRODUCCION
- II.- ANTECEDENTES
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSION DE RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFIA




Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Asesor



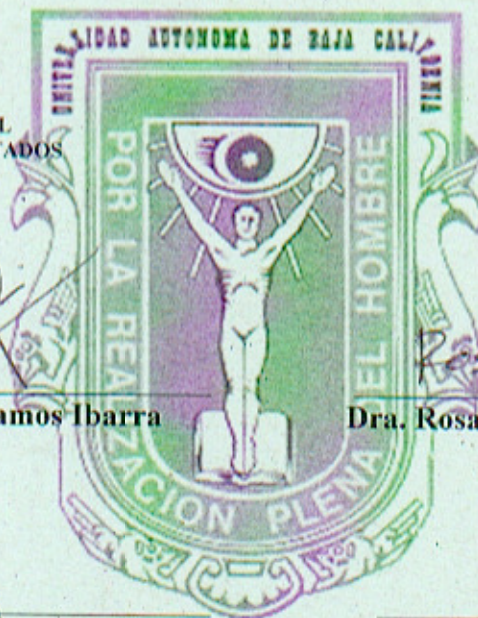
Dra. Rosa Elena Mares Alejandre
Co- Asesor



Q. Noemi Hernández Hernández
Subdirectora



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director



El presente trabajo de investigación fue realizado en el
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA
de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

Bajo la Dirección y Tutoría del
DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA
DRA. ROSA ELENA MARES ALEJANDRE

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento del
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(Financiamiento 155714, Fondo Sectorial SEP-CONACYT 2010 para Ciencia Básica)
PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DEL PROFESORADO
(Financiamiento para la Incorporación de Nuevos PTC, Convocatoria 2011)

AGRADECIMIENTOS

*Primero que a nadie, le agradezco a **Dios** por darme los medios y la salud para poder realizar el presente trabajo... Gracias por todas tus bendiciones.*

*A mi madre, **Rocío Sotelo**, le agradezco todo su apoyo a lo largo de mi vida, nunca me dejo de procurar, siempre estuvo al pie del cañón en todo brindándome su fortaleza para continuar... Gracias mami.*

*A mi hermana **Paola Cabanillas**, gracias por estar siempre ahí cuando te necesito... Gracias hermanita.*

*Gracias a mi familia en general, siempre han estado al pendiente de mis proyectos y me han apoyado en todas las decisiones. En especial a los **Medina Flores**, mi segundo hogar, nunca olvidare sus atenciones y el cariño con el que siempre me reciben... Los quiero.*

*Al Laboratorio de Biotecnología UABC Tijuana, por aceptarme como una más en su equipo, gracias a todos mis compañeros por ofrecerme ese apoyo incondicional y sus consejos. **Alexis, Alejandra, Salvador, Vanessa, Samanta**... Gracias chicos.*

*Al **Dr. Marco A. Ramos Ibarra** y la **Dra. Rosa E. Mares Alejandre**, por su acertada dirección, tenacidad, paciencia y sobre todo por enseñarme y acompañarme en el camino a esta experiencia, por todo lo que he aprendido de ustedes... Gracias.*

*Al **Dr. Samuel Guillermo Meléndez López** y al **Dr. José Manuel Cornejo Bravo**, por ser parte de esta experiencia, ya que siempre estuvieron ahí para apoyarme, brindarme consejos y ayudarme cuando fue requerido, se que siempre será así... Gracias.*

*Gracias a la **UABC Tijuana (FCQI)** por las experiencias vividas, sé que siempre estarán abiertas las puertas... gracias por ayudarme a crecer profesionalmente.*

Contenido

Índice de Figuras.....	v
Índice de Tablas	vi
Abreviaturas.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Entamoeba histolytica</i> y amibiasis.....	1
1.1.1. Amibiasis como problema de salud pública.....	1
1.1.2. <i>E. histolytica</i> y ciclo biológico.....	2
1.1.3. Patogenia celular y molecular de la amibiasis.....	4
1.1.4. Vía de secreción de proteínas amibiana.....	6
1.1.5. Diagnóstico y tratamiento de la amibiasis.....	7
1.2. Vía de secreción de proteínas.....	8
1.2.1. Transporte y translocación de proteínas hacia el RE.....	8
1.2.2. Modificaciones post-traduccionales en el RE.....	9
1.2.3. Transporte vesicular posterior al retículo endoplásmico.....	9
1.2.4. Endocitosis.....	10
1.2.5. Exocitosis y vesículas secretoras: constitutivas y reguladas.....	10
1.3. Chaperonas moleculares y plegamiento de proteínas.....	11
1.3.1. Chaperonas: clasificación, estructura y función.....	11
1.3.2. Plegamiento <i>in vivo</i>	12
1.3.3. Plegamiento <i>in vitro</i>	14
1.4. Familia de proteínas BIP/HSP70.....	15
1.4.1. Superfamilia HSP: Clasificación, estructura y función.....	15
1.4.2. Proteínas BIP/HSP70.....	18
1.4.3. BIP/HSP70 y patologías en humanos.....	20
1.4.4. BIP/HSP70 como blanco farmacológico.....	20
1.5. Importancia del estudio de la proteína BIP/HSP70 de <i>E. histolytica</i>.....	21
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
2.1. Hipótesis.....	23
2.2. Objetivo general.....	23
2.3. Objetivos específicos.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Reactivos biológicos y químicos.....	24
3.1.1. Células y medios de cultivo.....	24
3.1.2. Plásmidos.....	24

3.1.3.	Anticuerpos.....	25
3.1.4.	Reactivos químicos y bioquímicos	26
3.2.	Estuches comerciales y sistemas de purificación.....	26
3.3.	Equipo y paquete computacional.....	26
3.4.	Protocolos generales de análisis de proteínas	27
3.4.1.	Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 10%	27
3.4.2.	Inmuno-detección (<i>western blot</i>).....	28
3.4.3.	Determinación de proteínas mediante micro-ensayo de <i>Bradford</i>	28
3.5.	Expresión de <i>EhBIP/HSP70</i>.....	29
3.5.1.	Transformación bacteriana	29
3.5.2.	Análisis de expresión de <i>EhBIP/HSP70</i> a mini-escala.....	30
3.5.3.	Efecto de la concentración de inductor.....	30
3.5.4.	Expresión proteica de <i>EhBIP/HSP70</i> a mdi-escala	31
3.6.	Purificación de <i>EhBIP/HSP70</i>	31
3.6.1.	Obtención del lisado bacteriano soluble total en condiciones nativas.....	31
3.6.2.	Cromatografía de afinidad a níquel	32
3.6.3.	Precipitación con sulfato de amonio.....	32
3.6.4.	Cromatografía de exclusión molecular	32
3.7.	Análisis de la actividad chaperona de <i>EhBIP/HSP70</i>.....	33
3.7.1.	Ensayo de protección de la agregación de insulina	33
3.7.2.	Ensayo de renaturalización de GFP.....	33
3.7.3.	ATP como activador de la renaturalización de GFP	34
3.7.4.	Análisis estadístico	35
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
4.1.	La cepa SHuffle™ Express de <i>E. coli</i> exhibe un alto nivel de expresión de <i>EhBIP/HSP70</i>	36
4.2.	La expresión de <i>EhBIP/HSP70</i> se induce a baja concentración de IPTG	37
4.3.	<i>EhBIP/HSP70</i> se purifica en niveles aceptables	38
4.4.	<i>EhBIP/HSP70</i> protege la agregación de insulina	40
4.5.	<i>EhBIP/HSP70</i> asiste el replegamiento de GFP.....	41
4.6.	El ATP activa el replegamiento de GFP asistido por <i>EhBIP/HSP70</i>.....	42
5.	CONCLUSIONES	43
6.	BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXO.	Tablas de resultados.....	50

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> [CDC, 2012].	2
Figura 2. Trofozoito de <i>Entamoeba histolytica</i> con eritrocitos fagocitados, observado con un microscopio de contraste por interferencia diferencial [CDC, 2012].	3
Figura 3. Micrografías electrónicas de barrido de un modelo experimental de amibiasis intestinal (observada en el colon de un cobayo).	4
Figura 4. Invasión de la mucosa intestinal por <i>E. histolytica</i>	7
Figura 5. Tipos de infección amibiana: asintomática e invasiva.	8
Figura 6. Representación gráfica de algunas modificaciones post-traduccionales en las proteínas [Sadava, 2009].	9
Figura 7. Representación gráfica de las vías de secreción constitutiva y regulada [Alberts, 2007].	10
Figura 8. Estructura de las chaperoninas.	11
Figura 9. Mecanismo de activación de las HSP y la reparación de proteínas desnaturalizadas (DP).	15
Figura 10. Diferentes soluciones estructurales para la unión de proteínas a las principales familias de chaperonas moleculares.	16
Figura 11. Estructura de la proteína HSP70 de humano.	18
Figura 12. Modelo hipotético de la translocación de proteínas a través del RE.	19
Figura 13. Representación esquemática del plásmido pQHBIP.	25
Figura 14. Expresión a mini-escala de <i>EhBIP</i> en 4 cepas de <i>E. coli</i>	37
Figura 15. Expresión a mini-escala de <i>EhBIP</i> en diferentes concentraciones de IPTG.	37
Figura 16. Separación de proteínas (SDS-PAGE al 10%) de las fracciones obtenidas durante la cromatografía de afinidad a níquel.	38
Figura 17. Análisis de la proteína <i>EhBIP/HSP70</i> (2 µg) mediante SDS-PAGE al 10%.	39
Figura 18. Representación gráfica de la actividad protectora de la agregación de insulina asistida por <i>EhBIP/HSP70</i>	40
Figura 19. Representación gráfica del replegamiento de la proteína GFP asistido por <i>EhBIP/HSP70</i>	41
Figura 20. Representación gráfica del replegamiento de la proteína GFP asistido por <i>EhBIP/HSP70</i> y activado por ATP.	42

Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas para la expresión de <i>EhBIP/HSP70</i>	24
Tabla 2. Valores obtenidos (A_{650}) del análisis protección a la agregación de la cadena B de insulina.	50
Tabla 3. Porcentaje de protección a la agregación de la cadena B de insulina.	50
Tabla 4. Valores obtenidos (UF) del análisis de renaturalización de GFP.	51
Tabla 5. Valores de la constante de reacción (k , min^{-1}) de las cinéticas de renaturalización de GFP.	51
Tabla 6. Valores obtenidos (UF) del análisis de renaturalización asistida de GFP en presencia de ATP.	52

Abreviaturas

A	Absorbancia
AHA	Absceso hepático amebiano
ADN	Acido desoxirribonucleico
AG	Aparato de Golgi
AP	Amibaporo
ATP	Adenosin trifosfato
BIP	<i>Del inglés:</i> Binding protein
CCT	Chaperonina que contiene TCP-1
CHIP	<i>Del inglés:</i> C-terminal HSC70 interaction protein
CHO	<i>Del inglés:</i> Chinese hámster ovarian
CI	Con inductor
COP	<i>Del inglés:</i> Coat protein
CP	Cistein proteinasa
CPA	Cistein proteinasa amibiana
CRD	<i>Del inglés:</i> Cistein rich dominium
C-terminal	Carbono terminal
daGFP	GFP desnaturalizada
DO	Densidad óptica
DSG	15-desoxiespergualina
DTT	Ditiotreitol
E	Elución
ECM	<i>Del inglés:</i> Extracellular matrix
EDTA	Acido etilendiamino tetra-acético
EhBIP	BIP de <i>Entamoeba histolytica</i>
EhCP	Cisteín proteinasa de <i>Entamoeba histolytica</i>
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Fe-SOD	Superóxido dismutasa de hierro
Gal/GalNac	Galactosa/N-acetil galactosamina
GFP	<i>Del inglés:</i> Green fluorescent protein
H, hrs	Hora, horas
H₂Od	Agua destilada
HSF	<i>Del inglés:</i> Heat shock factor
HSP	<i>Del inglés:</i> Heat shock protein
ICE	<i>Del inglés:</i> IL-1 converting enzyme
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía de México
kDa	Kilodalton (s)
LB	Luria Bertani
LBST	Lisado bacteriano soluble total
M, mM, µM	Molar, milimolar, micromolar

M6P	Manosa- 6-fosfato
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
min	Minutos
mL, μL	Militros, microlitros
NAC	<i>Del inglés:</i> Nascent peptide associated complex
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBD	<i>Del inglés:</i> Nucleotide binding dominium
Ni	Níquel
NP	Fracción no pegada
N-terminal	Amino terminal
OMS	Organización mundial de la salud
ON	Oxido nítrico
p.e.	Por ejemplo
pIL-1β	Precursor de interleucina 1 β
PPI	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa
RAC	<i>Del inglés:</i> Ribosome associated complex
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
RQ	Reducción química
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SI	Sin inductor
SRP	<i>Del inglés:</i> Signal recognition particle
T	Temperatura
TA	Temperatura ambiente
TEMED	Tetra-metilen-etilendiamina
TF	<i>Del inglés:</i> Trigger factor
TPR	<i>Del inglés:</i> Tetracopeptide repetition
TSA	<i>Del inglés:</i> Thiol specific antioxidant
UPR	<i>Del inglés:</i> unfolded protein response
V	Volts
W	Fracción de lavado

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Entamoeba histolytica* y amibiasis

1.1.1. Amibiasis como problema de salud pública

Ciertamente, las enfermedades infecciosas han constituido una de las principales causas de morbi/mortalidad en el mundo, siendo la amibiasis una de ellas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la amibiasis como la situación en la que el parásito *Entamoeba histolytica* se encuentra presente en un hospedero, con o sin manifestaciones clínicas. La amibiasis es una infección intestinal que representa un grave problema de salud pública, y aunque es de distribución mundial, se presenta principalmente en países subdesarrollados, afectando particularmente las zonas tropicales (como Sudamérica, África, y el sureste de Asia), con mayor incidencia en zonas de menor desarrollo socioeconómico y cultural (donde no existen buenas prácticas de higiene). Las estimaciones mundiales indican que alrededor del 10-20% de la población infectada con *Entamoeba histolytica* es asintomática. Aproximadamente, 50 millones de casos de amibiasis ocurren cada año, de los cuales el 100,000 (0.2%) son mortales [CDC, 2012].

En humanos, la infección amibiana puede ser ocasionada por dos especies de *Entamoeba*: *E. histolytica* o *E. dispar*. Interesantemente, ambas especies se comportan de manera diferente en los hospederos infectados, a pesar de que comparten ciclos biológicos, nichos ecológicos, y mecanismos de transmisión. *E. histolytica* es la especie patógena y, a menudo, es la causa de la enfermedad invasiva (intestinal o extra-intestinal); en tanto, *E. dispar* es no patógena (hasta la fecha no existen evidencias de lesiones en tejidos de hospederos humanos) [Ramos, 2005].

México es considerado un país endémico de amibiasis. En un estudio seroepidemiológico reportado en el 2005, se observó que el 8.4% de la muestra poblacional analizada posee anticuerpos anti-amibianos, lo que demostró la alta frecuencia de infección por *E. histolytica* [Ramos, 2005]. El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que la amibiasis intestinal se ubicó dentro de las primeras 15 causas de morbilidad en el periodo 2000-2009; aun más, señaló que en el año 2000 se presentaron 1353.4 casos por

cada 100 mil habitantes (ocupando el cuarto lugar), cifra que fue mejorando, ya que para el año 2009, descendió al séptimo lugar (513.46 casos por cada 100 mil habitantes) [INEGI, 2012]. Ante estos datos, ha sido evidente la intervención científica; específicamente, en relación al estudio de los factores que determinan la patogénesis, tanto a nivel del patógeno como del hospedero y el medio ambiente, lo cual sirve como base para comprender la evolución clínica, el tratamiento, y la prevención de la infección.

1.1.2. *E. histolytica* y ciclo biológico

E. histolytica es un microorganismo unicelular eucariota, causante de diferentes cuadros clínicos, desde la disentería amebiana (infección intestinal) hasta el absceso hepático amebiano (infección extra-intestinal) [Davis, 2009]. En relación a su taxonomía, pertenece a

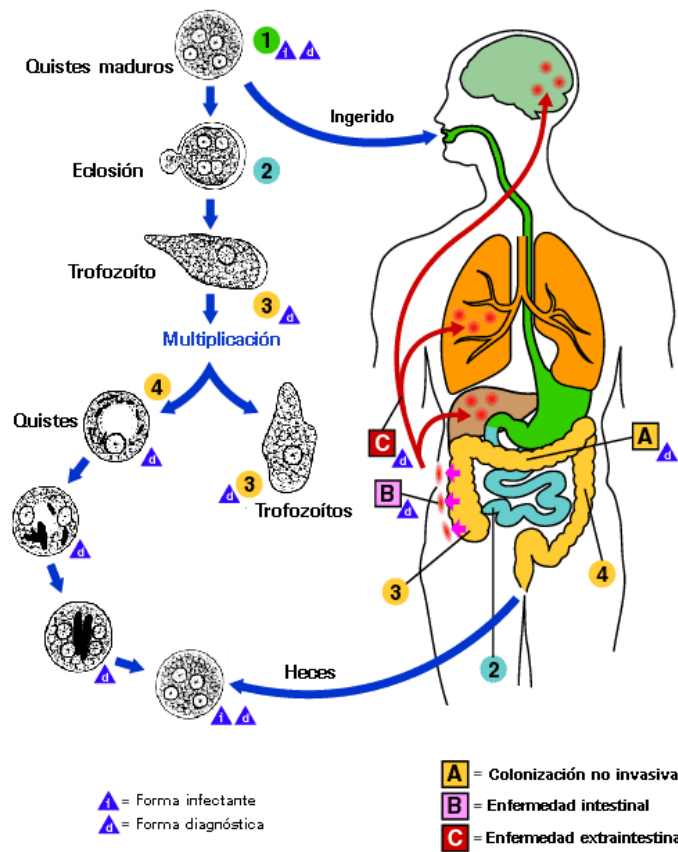


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* [CDC, 2012].

la familia *Entamoebidae*, del orden *Amoebida*, subfilum *Sarcodina*, superclase *Rhizopoda*, y clase *Lobosea* [Ximénez, 2007].

El ciclo vital de *E. histolytica* consta de tres estadios: quiste, metaquiste y trofozoito. Los quistes regularmente se encuentran en heces formadas, mientras que los trofozoitos en heces diarreicas (Figura 1). La infección ocurre cuando los quistes maduros (tetra-nucleados) son ingeridos a través de alimentos o bebidas contaminados con heces fecales.

El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado; donde el metaquiste es liberado (tetra-nucleado) y, posteriormente, sufre una duplicación nuclear seguida de una división celular, rindiendo ocho trofozoitos mono-nucleados, los cuales migran hacia el colon. Los trofozoitos invaden la región ileo-cecal (mediante su adhesión a la mucosa intestinal), se establecen y multiplican por fisión binaria. Cuando las condiciones no lo permiten, los trofozoitos siguen el movimiento intestinal hacia el recto, donde después de dos duplicaciones nucleares sucesivas (sin división celular) y un mecanismo de enquistamiento, se producen los quistes maduros (tetra-nucleados), los cuales son liberados en las heces fecales (con poca frecuencia y cuando las heces son diarreicas, es posible observar trofozoitos mono- o bi-nucleados). Debido a la protección que le confiere su pared, el quiste puede sobrevivir días o hasta semanas en el medio ambiente.

En algunos individuos, el trofozoito permanece confinado en el lumen intestinal sin ocasionar infección invasiva, convirtiéndolos en portadores asintomáticos (eliminadores de quistes). Por otro lado, cuando los trofozoitos invaden la mucosa intestinal, los pacientes desarrollan disentería amibiana (enfermedad intestinal); sin embargo, cuando invaden el tejido intestinal, lo degradan y se dirigen hacia otros tejidos, como el hígado, los individuos desarrollan absceso hepático amibiano (enfermedad extra-intestinal). Cabe mencionar que la infección extra-intestinal, en raras ocasiones, puede alcanzar otros tejidos, como pulmón o cerebro. Morfológicamente, no es posible distinguir *E. histolytica* y *E. dispar*; sin embargo, la eritrofagocitosis es una característica que distingue a la especie patógena (Figura 2) [CDC, 2012; Ximénez, 2007].



Figura 2. Trofozoito de *Entamoeba histolytica* con eritrocitos fagocitados, observado con un microscopio de contraste por interferencia diferencial [CDC, 2012].

1.1.3. Patogenia celular y molecular de la amibiasis

Tanto la patogenia como la virulencia designan la capacidad del parásito para provocar la enfermedad; sin embargo, la virulencia está específicamente asociada con el nivel de daño tisular, grado de la infección, y, por ende, con la gravedad de la enfermedad. *E. histolytica* expresa factores de virulencia (moléculas implicadas en el establecimiento de la patología) que son requeridos en los procesos de adhesión y colonización intestinal, invasión de tejidos, y evasión de la respuesta inmune. Específicamente, la capacidad de adhesión y destrucción de tejidos está asociada a la expresión de un conjunto de proteínas que son secretadas, las cuales han sido evaluadas en modelos animales, como hámster o jerbo (Figura 3) [Espinoza-Castellano, 2000; Faust, 2012]. Diferentes estudios han identificado un número de moléculas de *E. histolytica* que aparentemente están relacionadas con su virulencia, incluyendo una lectina de unión a residuos de galactosa o N-acetil-galactosamina (lectina Gal/NAcGal), cisteína proteinasas (CP), amibaporos (AP), y peroxiredoxinas (Prx) [Davis, 2009].

Lectina de unión a galactosa o N-acetil-galactosamina (lectina Gal/NAcGal). En relación a la erosión epitelial, la primer molécula implicada es la lectina Gal/NAcGal, un factor primordial en la adhesión del parásito, ya que se une específicamente a residuos de galactosa o N-acetil-galactosamina expuestos por glicoproteínas de la células diana (*p.e.*, la mucina que recubre el epitelio intestinal). La lectina Gal/NAcGal es un complejo de membrana compuesto por un heterodímero, integrado por una subunidad pesada (hgl, 170 KDa) y otra ligera (lgl, 35 KDa) unidas por enlaces disulfuro, asociado de forma no

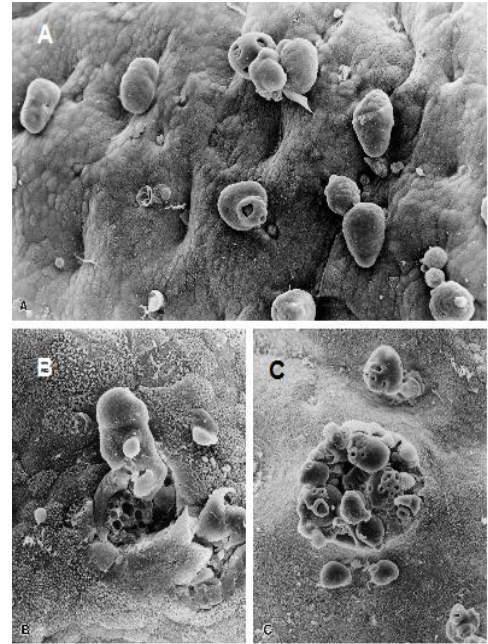


Figura 3. Micrografías electrónicas de barrido de un modelo experimental de amibiasis intestinal (observada en el colon de un cobayo).

(A) Trofozoitos de *E. histolytica* adheridos al epitelio interglandular. (B) Microinvasión de una pequeña región interglandular, se observa una lesión de invasión temprana con ulceración superficial. (C) Etapa avanzada de invasión, los trofozoitos han penetrado la mucosa y han generado una úlcera en el colon [Espinoza-Castellano, 2000].

covalente a una subunidad intermediaría (igl, 150 KDa). Se ha observado que cuando se exponen células CHO a trofozoitos que expresan una mutante de la lectina Gal/NAcGal, carente del amino-terminal, son relativamente resistentes a la adhesión y a la muerte inducida por *E. histolytica* [Espinoza-Castellano, 2000; Stanley, 2001]. Además, la resistencia a la lisis mediada por el complemento (mecanismo de inmunidad innata del hospedero), la cual favorece la supervivencia de *E. histolytica* en el torrente sanguíneo, se atribuye a la subunidad pesada, la cual cuenta con un dominio rico en cisteínas homólogo a CD59, un inhibidor de la activación complemento [Faust, 2012].

Cisteína Proteinasa (CP). Las CP liberadas por trofozoitos de *E. histolytica* juegan un papel clave en la invasión intestinal y la inflamación. La mayor parte de la actividad proteínasa mostrada por *E. histolytica* puede atribuirse a cuatro proteinasas: *EhCP1*, *EhCP2*, *EhCP3*, y *EhCP5*. Las CP pueden tener funciones importantes dentro del parásito (digestión de bacterias y eritrocitos fagocitados, activación de otras enzimas, etc.). Los lisados de *E. histolytica* o las *EhCP* purificadas son capaces de imitar tanto la actividad de la enzima convertidora de interleucina 1 (IL-1) como de unirse al precursor de interleucina 1 β para la formación de la citocina activa, cuya actividad está relacionada con la modulación de la función celular en la respuesta inflamatoria [Stanley, 2001].

Amibaporos (AP). Una de las capacidades sobresalientes de *E. histolytica*, es su habilidad para lisar células al contacto, la cual es conferida por una familia de péptidos formadores de poros o amibaporos. Los AP se insertan en la membrana de las células diana (bacterianas o eucariotas) y forman poros que dan lugar a la lisis celular. Mediante estudios de inhibición anti-sentido, se ha demostrado que los trofozoitos que expresan bajos niveles de AP-A muestran defectos en las funciones citolíticas y bactericidas [Zhang, 2004].

Peroxirredoxinas (Prx). Los trofozoitos de *E. histolytica* viven en un ambiente microanaeróbico en el colon, donde son expuestos a bajas concentraciones de oxidantes provenientes del metabolismo de bacterias circulantes; sin embargo, al invadir tejidos se exponen tanto a un ambiente con una alta concentración de oxígeno como a la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO), como respuesta de la protección primaria de células efectoras (neutrófilos y macrófagos). Como estrategia de protección contra la toxicidad del oxígeno, *E. histolytica* expresa tres enzimas que le funcionan como agentes anti-oxidantes: una superóxido dismutasa que contiene hierro (Fe-SOD), que cataliza la conversión de

superóxido (O_2^-) en oxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2); una flavin reductasa (NADPH:flavin-oxidoreductasa), que cataliza la reducción de O_2 a H_2O_2 , y una proteína anti-oxidante tiol-específica (TSA) o peroxirredoxina (Prx), la cual muestra actividad como peroxidasa y anti-oxidante [Choi, 2005].

1.1.4. Vía de secreción de proteínas amibiana

Las células eucariotas típicas poseen un sistema endomembranoso, altamente especializado, que controla la vía de secreción de proteínas y el tráfico vesicular intracelular, el cual consiste del retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi (AG), y diferentes tipos de vesículas. La vía de secreción de proteínas está constituida de varios procesos intracelulares: translocación a través del RE, modificaciones post-traduccionales en el RE, y selección y transporte hacia su destino final (tal como lisosoma, endosoma, membrana plasmática, y el ambiente extracelular) [Salgado, 2005].

Desde los primeros estudios microscópicos de *E. histolytica*, se observó algo fascinante, desde el punto de vista de su biología celular: un citosol simple, abundante en vesículas aparentemente no diferenciadas y carente de estructuras endomembranas típicas (RE y AG). Sin embargo, algunas funciones asociadas a la vía de secreción han sido identificadas en el estadio de trofozoito; *p.e.*, el transporte de la lectina Gal/NAcGal hacia la membrana celular y la secreción de cisteínas proteasas o amibaporos, entre otros [Salgado, 2005; Sánchez, 2005]. Además, un estudio mostró que algunos componentes proteicos del sistema endomembranoso se localizan en vacuolas durante la secreción de proteínas específicas para la formación de la pared quística [Manning-Cela, 2003].

Se han clonado algunos genes amibianos que codifican para proteínas conservadas y residentes del RE y AG de células típicas, proporcionando evidencias moleculares de la existencia de equivalentes funcionales del sistema endomembranoso en *E. histolytica* [Sánchez-López, 2000]: *EhSRP54*, subunidad de 54 KDa del complejo SRP involucrada en la primera etapa del transporte de proteínas hacia el RE [Ramos, 1997]; *EhSec61*, componente clave de la maquinaria de translocación de polipéptidos nacientes a través del RE [Salgado, 2005]; *EhPDI*, una enzima y chaperona residente del RE que cataliza la formación y rearreglo de enlaces disulfuro y, que además, puede actuar como chaperona molecular [Ramos, 2005; Mares, 2009; Ramos, 2011]; *EhSTT3*, una subunidad del complejo

oligosacaryltransferasa (OST) que participa en el mecanismo de N-glicosilación [Gutiérrez, 2000]; y *EhERD2*, receptor del AG responsable del mecanismo de recuperación de proteínas lumenales residentes del RE [Sanchez-Lopez, 1998].

1.1.5. Diagnóstico y tratamiento de la amibiasis

La amibiasis se diagnostica mediante la demostración de *E. histolytica* en heces o tejidos. En el caso de la enfermedad intestinal, el método más común consiste en un examen microscópico de las heces. Los quistes prevalecen en las heces sólidas, mientras los trofozoitos en las heces diarreicas. Según la OMS, el diagnóstico por microscopía de luz debe notificarse como especies de *Entamoeba histolytica/dispar*. La sigmoidoscopia puede revelar úlceras características, especialmente en una enfermedad más grave (Figura 4).

Actualmente, también pueden ser examinados aspirados o biopsias. Varios estuches comerciales para la detección antigénica están disponibles, al igual que algunos protocolos para la extracción de ADN y realización de PCR a partir de muestras fecales. Por otro lado, los estudios serológicos son especialmente útiles para el diagnóstico de la amibiasis invasiva y extra-intestinal, ya que más del 70% de los pacientes con colitis aguda invasiva y abscesos hepáticos generan anticuerpos contra *E. histolytica* [Wiser, 2010].

Existen varios medicamentos disponibles para el tratamiento de la amibiasis y la elección del fármaco o fármacos, dependerá de la etapa clínica de la infección (Figura 5). Las infecciones asintomáticas o no invasivas se tratan con amibicidas lumenales como la paromomicina, el furorato de diloxanida o yodoquinol, los cuales no se absorben bien y, por lo tanto, alcanzan altas concentraciones en el lumen del intestino. Por otro lado, el metronidazol y el timidazol, son recomendados para la enfermedad invasiva y extra-intestinal, ya que se absorben eficientemente, con el inconveniente de que permanecen en

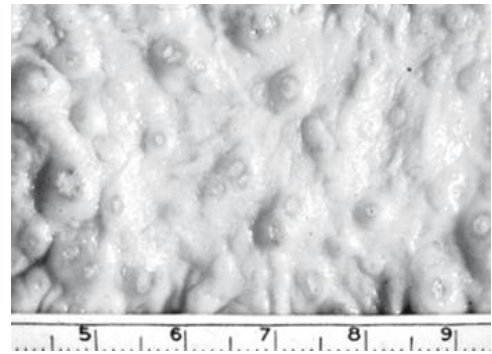
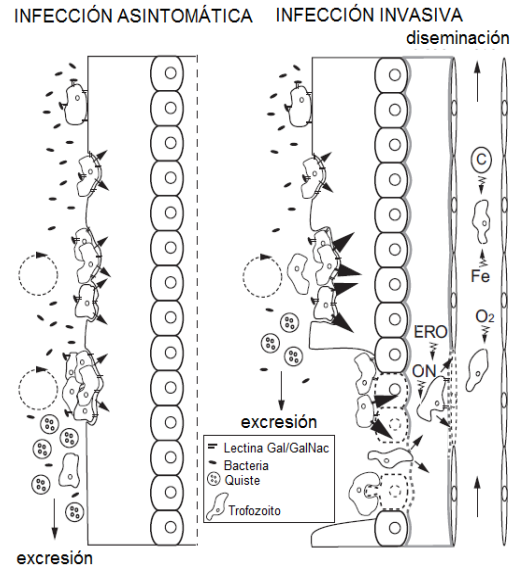


Figura 4. Invasión de la mucosa intestinal por *E. histolytica*.

Caso severo de amibiasis, donde se muestran varias úlceras en el lumen del colon [Wiser, 2010].

Figura 5. Tipos de infección amibiana: asintomática e invasiva.

Las trofozoitos se adhieren a la mucosa intestinal y se alimentan de bacterias. La actividad lítica de las enzimas (►), permiten la incrustación del trofozoito en la superficie mucosa para resistir las fuerzas mecánicas del lumen intestinal. Infección invasiva: (desencadenantes no identificados) el aumento de la actividad lítica progresiva degrada la barrera mucosa. Trofozoitos en contacto con el epitelio matan y fagocitan las células humanas, penetran la lámina propia. La reacción del huésped incluye la infiltración y activación de neutrófilos, mastocitos y macrófagos, lo que conduce la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), óxido nítrico (ON) y citoquinas pro-inflamatorias. Cuando los trofozoitos son capaces de romper la barrera endotelial, se difunden hacia el hígado y se enfrentan a mayores concentraciones de oxígeno (O₂), hierro (Fe) y con el sistema de ataque de complemento (C) [Faust, 2012].



bajas concentraciones en el lumen del intestino; por lo tanto, éstos deben ser co-administrados con agentes luminales, para eliminar por completo la infección. En casos no complicados, el pronóstico del tratamiento es generalmente bueno; además, son tratamientos tolerados por la mayoría de los pacientes y muestran pocos efectos secundarios. Sin embargo, en casos graves suele co-administrarse emetina (o dehidro-emetina) con nitroimidazol, teniendo en consideración la toxicidad de estos fármacos [Wiser, 2010].

1.2. Vía de secreción de proteínas

1.2.1. Transporte y translocación de proteínas hacia el RE

Un gran número de proteínas son transportadas a través de la membrana del RE cuando son sintetizadas (entre las que se incluyen proteínas secretoras y de membrana). La síntesis inicia en el citoplasma; sin embargo, las proteínas son dirigidas hacia la membrana del RE, mediado por la secuencia señal (segmento continuo de 20-25 aminoácidos no polares, localizados en el extremo amino terminal). El reconocimiento de la secuencia señal y la orientación de la cadena nascente requiere de la función combinada de la SRP y su receptor. Después, los polipéptidos son transportados a través de la membrana del RE. El sitio de translocación es probablemente una estructura bastante elaborada (complejo translocón). Algunos de los componentes del translocón están directamente involucrados en

el transporte; sin embargo, otros pueden formar parte de algunos mecanismos de modificación bioquímica, plegamiento, y ensamblaje del polipéptido naciente [Rapoport, 1992].

1.2.2. Modificaciones post-traduccionales en el RE

Muchas proteínas sufren modificaciones post-traduccionales en el RE. Una vez que una proteína ingresa a la luz del RE, la secuencia señal se elimina por acción de una peptidasa; y es entonces que está preparada para ser modificada. La proteólisis, glucosilación, y fosforilación (Figura 6) son algunas de las modificaciones esenciales para el correcto plegamiento y función de las proteínas [Sadava, 2009].

1.2.3. Transporte vesicular posterior al retículo endoplásmico

Cuando las proteínas ya fueron modificadas para su correcta función, éstas se empaquetan en pequeñas vesículas de transporte, que emergen del RE. Estas vesículas se dirigen hacia el *cis*-Golgi (adyacente al RE), donde se fusionan con las cisternas y liberan su contenido. La progresión de las proteínas ocurre a medida que las cisternas individuales migran alejándose del núcleo. Durante ese tránsito, las proteínas pueden ser modificadas por acción de enzimas presentes en la luz del aparato de Golgi. Cuando las cisternas alcanzan el *trans*-Golgi (cara cercana a la membrana plasmática), algunas vesículas se desplazan en sentido retrógrado (para recuperar proteínas residentes del AG o el RE); en tanto que otras destinadas a convertirse en lisosomas, vesículas de almacenamiento intracelular, o vesículas secretoras, se desplazan en sentido anterógrado. Los lisosomas y las vesículas de almacenamiento permanecen en el citoplasma; sin embargo, las vesículas secretoras se dirigen hacia la membrana plasmática, donde se fusionan y liberan su contenido hacia el espacio extracelular [Alberts, 2007].

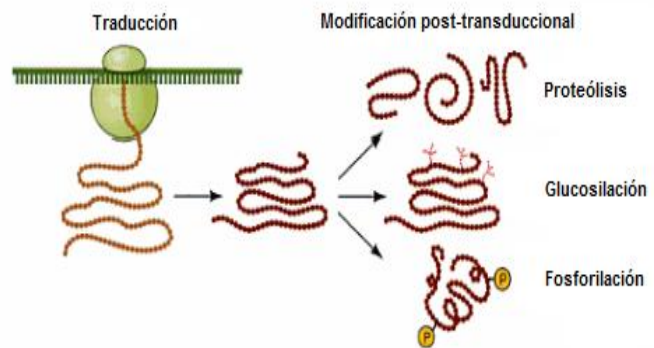


Figura 6. Representación gráfica de algunas modificaciones post-traduccionales en las proteínas [Sadava, 2009].

1.2.4. Endocitosis

La endocitosis es un mecanismo mediante el cual se conducen sustancias hacia el interior de la célula, a través de la superficie celular. Este mecanismo incluye las rutas por las cuales la célula toma macromoléculas, partículas, e incluso otras células, del medio extracelular. El material que será

introducido es progresivamente envuelto por una porción de membrana plasmática, el cual primero se invagina, y luego se presiona para formar una vesícula. Se distinguen dos tipos de endocitosis: fagocitosis (alimentación celular), que implica la ingestión de partículas insolubles, incluyendo microorganismos o células muertas; y pinocitosis (bebida celular), que implica la ingestión de fluido y solutos. La mayoría de las células eucariotas están en constante pinocitosis, como ruta de alimentación; sin embargo, la fagocitosis es realizada por células especializadas para ello [Alberts, 2007].

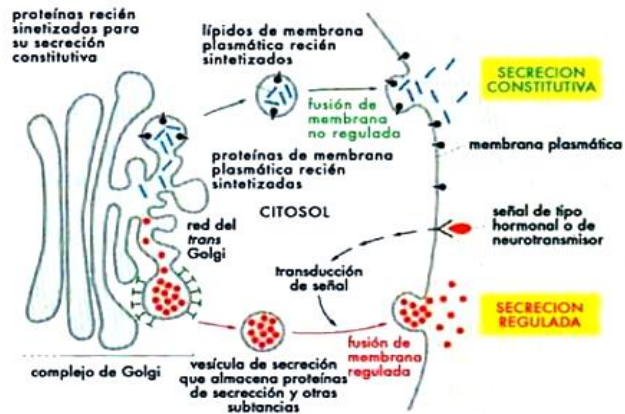


Figura 7. Representación gráfica de las vías de secreción constitutiva y regulada [Alberts, 2007].

1.2.5. Exocitosis y vesículas secretoras: constitutivas y reguladas

La secreción de proteínas por exocitosis ocurre en varios tipos celulares; sin embargo, este mecanismo está involucrado en la secreción de una amplia gama de moléculas. Existen dos caminos que divergen del *trans*-Golgi: la secreción constitutiva y regulada (Figura 7). Muchas proteínas son secretadas inmediatamente después de su síntesis, lo cual indica que se dispone de ellas al momento (secreción constitutiva) [Turner, 1992]. En células secretoras especializadas, existe otra vía de secreción, denominada regulada; en la cual, las proteínas (y otras sustancias) se concentran en vesículas, para ser almacenadas por periodos variables, hasta que la célula recibe una señal que estimula su secreción. Este es un mecanismo especializado de células que liberan hormonas, neurotransmisores, o enzimas digestivas [Turner, 1992; Alberts, 2007].

1.3. Chaperonas moleculares y plegamiento de proteínas

1.3.1. Chaperonas: clasificación, estructura y función

Las chaperonas moleculares son proteínas facilitadoras y reguladoras de los cambios conformacionales de otras proteínas. Es importante remarcar que no forman parte de la estructura final de la proteína. Específicamente, se unen y estabilizan conformeros de otras proteínas, por medio de ciclos de unión y liberación regulada, y son capaces de facilitar su transporte correcto y de reducir su agregación. A través de este mecanismo, las chaperonas moleculares desempeñan un papel esencial en muchos procesos celulares [Kosmaoglou, 2008].

Una de las familias mejor caracterizadas son las chaperoninas, que se encuentran en todos los organismos conocidos. Estas se clasifican en Grupo I, presentes en procariotas, y en cloroplastos y mitocondrias de eucariotas; las del Grupo II están presentes en el citosol de arqueobacterias y eucariotas [Gómez-Puertas, 2004]. Todas las chaperoninas comparten una estructura similar; es decir, son grandes oligómeros de aproximadamente 60 KDa. Cada subunidad también tiene una estructura similar, dividida en tres dominios: el dominio ecuatorial, que contiene el sitio de unión de nucleótidos y comparte las interacciones proteína-proteína con otras subunidades; el dominio intermedio, el cual actúa como un transmisor de los cambios conformacionales generados, después de la unión de nucleótidos, entre

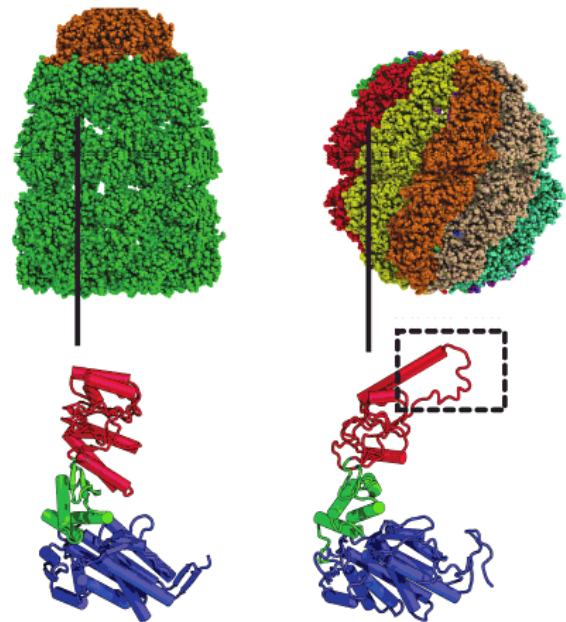


Figura 8. Estructura de las chaperoninas.

Panel izquierdo. En la parte superior se muestra la chaperonina GroEL/GroES (grupo I). Las subunidades GroEL se identifican en color verde, en tanto GroES en naranja. Los 4 anillos de GroEL y la tapa GroES están compuestos de 7 subunidades idénticas. En la parte inferior se muestra la estructura de la subunidad GroEL.

Panel derecho. En la parte superior se muestra la chaperonina TRiC (grupo II). Los diferentes anillos, conformados por 8 subunidades idénticas se denotan en distintos colores. En la parte inferior se identifica la estructura de la subunidad de TRiC, resaltando en líneas discontinuas el dominio ampliado apical (en forma de tapa) [Roux, 2011].

el dominio ecuatorial y el dominio apical (en el cual se encuentra el sitio de unión al sustrato).

Las chaperoninas de los Grupos I y II muestran diferencias importantes (Figura 8): en el Grupo I, cada anillo se compone de siete subunidades idénticas; en tanto, en el Grupo II, los anillos pueden estar constituidos por un octámero de una o dos subunidades diferentes, un nonámero de tres subunidades diferentes, o un octámero de de ocho subunidades diferentes. Otra diferencia importante es la presencia de una co-chaperonina en el Grupo I, que actúa en conjunto con la chaperonina en el plegamiento de proteínas. Este pequeño componente está ausente en el Grupo II, pero su función es imitada por una secuencia adicional situada en la punta del dominio apical de sus subunidades [Gómez-Puertas, 2004].

En relación a la función, las chaperonas moleculares se unen selectivamente tanto a polipéptidos recién sintetizados como a proteínas parcialmente plegadas, impidiendo su agregación, evitando su mal plegamiento, y facilitando su plegamiento correcto; además, colaboran en el replegamiento de proteínas desnaturalizadas por estrés ambiental. Interesantemente, las chaperonas moleculares son capaces de distinguir entre una proteína desplegada y otra plegada, reconociendo las características hidrofóbicas de las proteínas desplegadas.

En general, las chaperonas moleculares desempeñan un papel importante al conducir las proteínas a lo largo de las vías productivas del plegamiento, participar en mecanismos de translocación de proteínas a través de membranas de algunos organelos subcelulares, y facilitar la proteólisis de proteínas estructuralmente inestables [Boshoff, 2004; Kosmaoglou, 2008].

1.3.2. Plegamiento *in vivo*

Un proceso central en la biología celular es la conversión de la información genética en proteínas funcionales. En este proceso, los ribosomas forman parte esencial, ya que forman parte del mecanismo que traduce el ARN mensajero en polipéptidos [Young, 2004]. Durante su biosíntesis, los polipéptidos nacientes pueden seguir un sinnúmero de vías para alcanzar su conformación nativa (funcional). Afortunadamente, existe un mecanismo que involucra interacciones molécula-molécula, crucial para proteger y facilitar el plegamiento: el plegamiento asistido por chaperonas moleculares [Feldman, 2000].

Plegamiento en el citosol. Tanto en células procariotas como eucariotas, el citosol proporciona una red bien desarrollada de vías, a través de las cuales las chaperonas moleculares pueden interactuar con los polipéptidos en todas las etapas de plegamiento. Durante la biosíntesis de polipéptidos, se exponen extensas superficies hidrofóbicas que tienden a la agregación intermolecular, debido al hecho de que varios de éstos son sintetizados en estrecha proximidad. Para contrarrestar la agregación, las células han desarrollado un sistema sofisticado de chaperonas moleculares que apoyan el plegamiento tan pronto como los polipéptidos emergen del ribosoma. Entre algunas de las chaperonas citosólicas asociadas a las primeras etapas de la biosíntesis de proteínas, se reconocen las proteínas de choque térmico (HSP), el complejo asociado a ribosomas (RAC), y el complejo asociado a polipéptidos nacientes (NAC) [Young, 2004].

Plegamiento en el retículo endoplásmico. La mayoría de las proteínas secretadas en eucariotas son inicialmente dirigidas hacia el RE, donde se insertan en la membrana o son translocadas hacia el lumen del RE. En la primera etapa, participan las chaperonas BIP/Grp78 y Grp94/gp96, miembros de las familias HSP70 y HSP90, respectivamente. También, existen otros componentes únicos de la maquinaria del RE, calnexina y calreticulina. En comparación con el citoplasma, el lumen del RE ofrece un entorno distinto para el plegamiento de proteínas, ya que existe un ambiente oxidativo que facilita la formación de enlaces disulfuro. Otro aspecto importante en el plegamiento en el RE es la N-glicosilación. Por estas características, la maquinaria de plegamiento en el RE se ha definido como una estación de control de calidad, ya que las proteínas mal plegadas son retenidas, y ocasionalmente, enviadas a un sistema de degradación mediado por los proteasomas citoplásmicos [Smith, 1998; Brodsky, 2011].

Plegamiento en otros compartimientos intracelulares. Dos clases principales de chaperonas ATP-dependientes, las HSP70 y las chaperoninas, participan en el plegamiento de proteínas en el citosol de las células eucariotas y procariotas, así como en los organelos de origen endosimbiótico, tales como las mitocondrias y cloroplastos. Los primeros estudios funcionales de las chaperoninas de las mitocondrias y los cloroplastos (HSP60/cpn60), sugirieron que juegan un papel importante en los procesos de plegamiento de proteínas [Feldman, 2000].

1.3.3. Plegamiento *in vitro*

Reproducir el entorno medioambiental que favorece el plegamiento de una proteína hasta alcanzar su conformación nativa es un reto. Los mecanismos mediante los cuales se pliega un polipéptido han sido estudiados por medio de ensayos de replegamiento *in vitro* [Yon, 1991].

Condiciones medioambientales. Es altamente probable, que el proceso de plegamiento de una proteína *in vitro* difiera en muchos detalles con respecto al desarrollado *in vivo*. Las condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica, y concentración de proteína, son factores que están relacionados con el desplegamiento y replegamiento de proteínas nativas. Los ensayos *in vitro* han sido de gran ayuda para comprender los requerimientos y las condiciones ambientales que afectan o favorecen la conformación proteica [Creighton, 1995]. La desnaturalización de proteínas puede ser química o térmica, por lo tanto la reversibilidad implicaría la eliminación del desnaturalizante (por diálisis o dilución), o la disminución de la temperatura, en el caso de estudios térmicos. El desplegamiento puede ser completamente reversible, pero con un vía de replegamiento diferente [Harris, 2012].

Plegamiento asistido. La capacidad de prevenir la agregación *in vitro* de proteínas lábiles al calor ha sido demostrada por todas las clases de chaperonas [Schlieker, 2002]. De este modo, para los sistemas *in vitro* de agregación, la presencia de varias chaperonas aumenta el rendimiento de proteínas solubles nativas [Fink, 1999]. La mayoría de los experimentos sobre el plegamiento de proteínas *in vitro* se realiza con polipéptidos aislados, donde se perturba la estructura terciaria y se observa el replegamiento hacia el estado nativo. Además, este replegamiento puede ser asistido por chaperonas moleculares, evitando las agregaciones no deseadas y permitir que la cadena polipeptídica encuentre la vía de plegamiento correcto. Esta asistencia no siempre es gratuita, ya que, ocasionalmente, la formación del complejo chaperona-sustrato suele estar asociado a la hidrólisis de ATP. Existen también otras enzimas que pueden actuar como ayudantes del plegamiento, tal como la proteína disulfuro isomerasa (PDI), que cataliza una rápida formación y rearrreglo de enlaces disulfuro, o la peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (PPI), que facilitan la búsqueda de la conformación correcta de prolinas [Müller-Esterl, 2008].

1.4. Familia de proteínas BIP/HSP70

1.4.1. Superfamilia HSP: Clasificación, estructura y función

Las células son frecuentemente sometidas a condiciones variables de temperatura, pH, o concentraciones iónicas: condiciones de estrés que afectan la estabilidad del proteoma celular. La sobre-expresión de chaperonas sirve como mecanismo de supervivencia celular en un medio ambiente adverso. La capacidad de respuesta al estrés térmico se refleja en muchas chaperonas moleculares, las cuales son llamadas proteínas de respuesta al estrés o al choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés). Mediante estudios *in vivo* e *in vitro*, se ha demostrado que varios factores medioambientales que inducen estrés celular aumentan transitoriamente la producción de proteínas de respuesta al estrés como mecanismo de protección; *p.e.*, el estrés térmico induce la síntesis de más de 20 proteínas de respuesta al choque térmico (HSP), las cuales permiten a las células adaptarse a los cambios ambientales y metabólicos, y sobrevivir a tales condiciones.

La multifuncionalidad de las HSP hace patente su importancia biológica en varios mecanismos de regulación celular: (i) ensamblaje/desensamblaje de complejos protéicos; (ii) comunicación controlada entre conformaciones de proteínas; (iii) transporte intracelular y control de calidad; y (iv) degradación de proteínas. Las secuencias de las HSP muestran una alta homología través de la escala evolutiva (desde las bacterias hasta los seres humanos). En las células eucariotas, los genes que codifican para HSP incluyen, en su secuencia

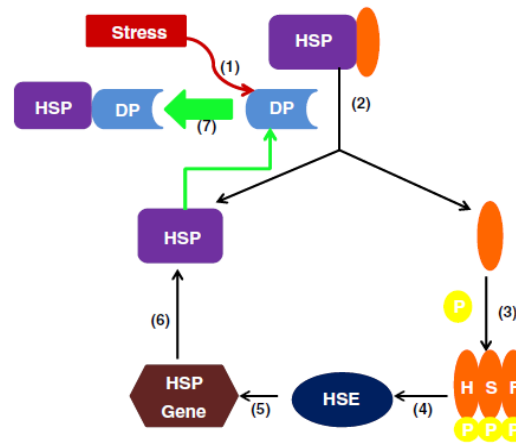


Figura 9. Mecanismo de activación de las HSP y la reparación de proteínas desnaturalizadas (DP).

(1) Las condiciones de estrés conducen a la desnaturalización de proteínas, (2) La presencia de DP estimula la disociación del complejo HSP-HSF, este complejo limita el proceso de transcripción en ausencia de DP, (3) Mientras HSP es libre para unirse a DP, HSF está siendo activado a través de la fosforilación y la trimerización con el fin de producir más HSPs, (4) Una vez activado HSF puede unirse al HSE, (5) HSE es una parte de la región promotora del gen HSP, (6) Una cantidad considerable de HSP es producida, (7) HSPs recién formadas son capaces de unirse a más DP [Khalil, 2011].

promotora, una secuencia conservada conocida como elemento de respuesta al choque térmico (HSE), y estos genes son activados por una proteína llamada factor de respuesta al choque térmico (HSF) (Figura 9) [Boshoff, 2004; Sreedhar, 2004; Kosmaoglou, 2008].

Clasificación. La familia de HSP de mamífero han sido clasificadas en seis sub-familias, de acuerdo a su peso molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, y las de bajo peso molecular sHSP (15 a 30 kDa). Cada sub-familia se compone de miembros que se expresan de manera constitutiva o regulada (inducción) (Figura 10) [Khalil, 2011].

Estructura y función. Cada una de las sub-familias HSP proporciona diferentes soluciones estructurales a los problemas de plegamiento de proteínas. Estas reconocen diversas conformaciones no nativas de los polipéptidos e interactúan a través de diferentes

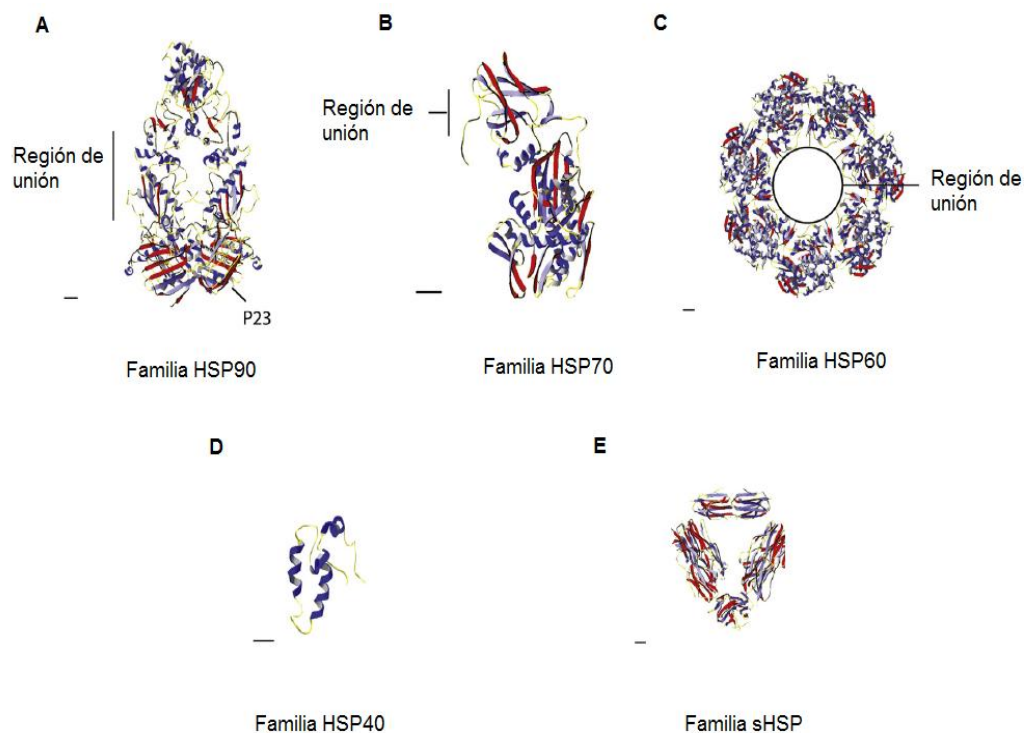


Figura 10. Diferentes soluciones estructurales para la unión de proteínas a las principales familias de chaperonas moleculares.

Diagramas de cinta que muestran representaciones de las estructuras y los sitios de unión de proteínas de las chaperonas siguientes: (A) La HSP90 de levadura es un dímero en complejo con la co-chaperona p23/Sba1 y análogo de ATP, (B) Los aminoácidos 1-554 de bobino HSC70 carecen del dominio C-terminal de 10 kDa, (C) La chaperonina tipo I (familia HSP60) GroEL consta de dos anillos apilados homoheptaméricos vistos desde arriba, (D) Dominio-J humano de la familia HSP40 miembro HDJ-1, (E) Estructura dodecamérica de HSP16.3 de *Mycobacterium tuberculosis* que muestra subunidades dímeras [Kosmaoglou, 2008].

modos de unión.

Hsp100. Definida por una secuencia núcleo de 200–250 residuos, que comprometen un dominio rico en α -hélices y un dominio de unión a nucleótidos. Tienen la habilidad de remodelar los sustratos proteicos usando un mecanismo dependiente de ATP. La proteína Hsp104 de eucariotas y ClpB bacteriana pertenecen a este grupo. Forman anillos de seis monómeros. La Hsp104 contiene una secuencia de 38 residuos en su extremo C-terminal, que no está presente en ClpB, el cual participa en el ensamblaje del hexámero y la termotolerancia.

HSP90. Están presentes en la mayoría de los compartimentos subcelulares, como el citosol, RE, mitocondrias, y cloroplastos (en plantas). Funcionan como homodímero, y cada monómero puede dividirse en tres dominios: N-terminal, medio, y C-terminal. La estructura del dominio N-terminal (primera en ser determinada), revela un bolsillo atípico para la unión a ATP. Habitualmente, funcionan como acompañantes en un complejo multi-proteico que incorpora a otras chaperonas y co-chaperonas.

HSP70. Integrada por varios miembros, tanto inducibles (HSP70) como expresados constitutivamente (HSC70). Están presentes en la mayoría de los compartimentos subcelulares, incluyendo citosol y núcleo (HSC70), mitocondria (mtHSP70), y retículo endoplásmico (Grp78/BIP). Tienen un dominio N-terminal (ATPasa) y otro dominio C-terminal (unión a sustrato, SBD). La hidrólisis de ATP está asociada a un cambio conformacional en el dominio SBD. Con una base de cadenas β , el dominio SBD tiene una tapa que cierra cuando sucede la hidrólisis de ATP, formando una estructura que se une a regiones hidrofóbicas presentes en el sustrato proteico, impidiendo la agregación. Las HSP70 también pueden unirse a proteínas aparentemente nativas.

HSP60. También conocidas como chaperoninas, ya que forman largos ensamblajes que asisten al plegamiento proteico. Como ya se describió anteriormente, existen dos clases de chaperoninas. Se encuentran en la mitocondria (HSP60) y el cloroplasto (Rubisco) de células eucariotas, y en el citosol de eubacterias (GroEL). Algunas pueden tener co-chaperonas, como el complejo formado por GroEL/GroES.

HSP40. Definidas por la presencia del dominio J, de 70 residuos muy conservados. En la proteínas DnaJ de *E. coli*, ese dominio se encuentra en el extremo N-terminal. El dominio J contiene dos α -hélices anti-paralelas unidas por una horquilla, que contiene el

motivo HDP (histidina, prolina, aspartato), y otras dos α -hélices que estabilizan la estructura. Es probablemente la familia más diversa y numerosa, con más de 50 proteínas diferentes, las cuales contienen una estructura similar al dominio J.

sHSP. Chaperonas con pesos moleculares bajos (15-30 KDa). Son monómeros que se unen para formar estructuras oligoméricas dinámicas. Las proteínas α -cristalinas son sHSP que comparten un dominio conservado, de aproximadamente 90 residuos, en el extremo C-terminal. Su función y oligomerización está regulada por fosforilación y la temperatura. Aunque, aparentemente, no están relacionadas con co-chaperonas, pueden funcionar en cooperación con otras chaperonas [Kosmaoglou, 2008].

1.4.2. Proteínas BIP/HSP70

La proteína de unión a inmunoglobulinas (BIP) es un miembro de la familia de las proteínas de choque térmico de 70 KDa (HSP70), también conocida como proteína que regula la glucosa de 78 KDa (Grp78). BIP/HSP70 es una proteína abundante y esencial, involucrada tanto en la translocación de polipéptidos a través de la membrana del RE como en el plegamiento de proteínas. BIP/HSP70 es una proteína que se une a las regiones hidrofóbicas de péptidos, hidroliza ATP, y dirige sus sustratos proteicos a una variedad de destinos. Estas funciones se llevan a cabo mediante su estructura compuesta por tres dominios (Figura 11): un dominio catalítico N-terminal, altamente conservado, de unión a nucleótido (NBD); un dominio de unión a sustrato (SBD); y un dominio C-terminal, α -helicoidal, que forma una tapa. Aún no está clara la preferencia de BIP por segmentos de aminoácidos hidrofóbicos [Abelson, 1998; Patury, 2009].

En células de mamífero, BIP/HSP70 participa en el plegamiento y translocación de proteínas a través de

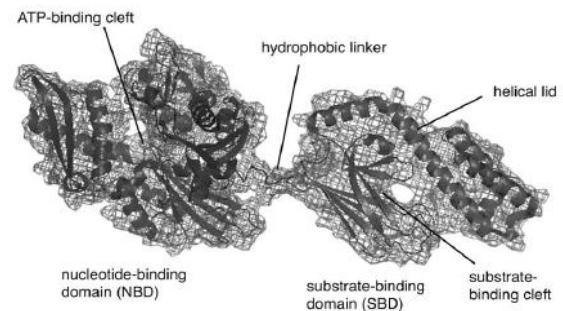


Figura 11. Estructura de la proteína HSP70 de humano.

El sitio N-terminal, cuenta con un dominio de unión a nucleótido (NBD) e hidrólisis. El dominio de unión a sustrato (SBD), se une a polipéptidos hidrofóbicos expuestos, está unido a través de un enlazador corto. El C-terminal o “tapa”, de SBD es un subdominio principalmente helicoidal, y la posición de esta región en relación con la hendidura de unión a sustrato, está regulada por la unión de nucleótidos en el NBD [Patury, 2009].

la membrana del RE (Figura 12), etiquetando proteínas mal plegadas para su degradación. Además, se sabe que BIP/HSP70 interactúa con el pliegue de β -barril de las inmunoglobulinas, presente en los dominios de algunas proteínas secretadas (*p.e.*, anticuerpos y receptores de células T) [Bonomo, 2010].

Bajo condiciones de estrés del RE, cuando las proteínas desplegadas se acumulan en el lumen del RE, BIP/HSP70 activa la

respuesta a proteínas desplegadas (UPR), lo cual alivia el estrés del RE mediante la disminución de la traducción de proteínas y el aumento de la capacidad de plegamiento (incluyendo la regulación positiva de BIP/HSP70). Es importante destacar que si la homeostasis del RE no puede ser restablecida, la UPR es capaz de inducir apoptosis.

Varios estudios han demostrado que diferentes procesos fisiológicos son capaces de inducir estrés del RE, y que la capacidad de responder a esta tensión es de vital importancia. La acción de la BIP/HSP70 se ha implicado como un mecanismo de adaptación a una gran variedad de procesos celulares. El envejecimiento es un factor de riesgo independiente para las enfermedades de Alzheimer, de Parkinson y el cáncer.

Está emergiendo evidencia de que el estrés del RE desempeña un papel importante en el proceso de envejecimiento, lo cual lleva a una disminución significativa en la expresión y actividad proteica de varias chaperonas del RE, incluyendo BIP/HSP70. En conjunto, los descensos en el nivel/actividad de las chaperonas y la UPR en relación con la edad pueden comprometer la capacidad de adaptación y conducir al estrés del RE [Pfaffenbach, 2011].

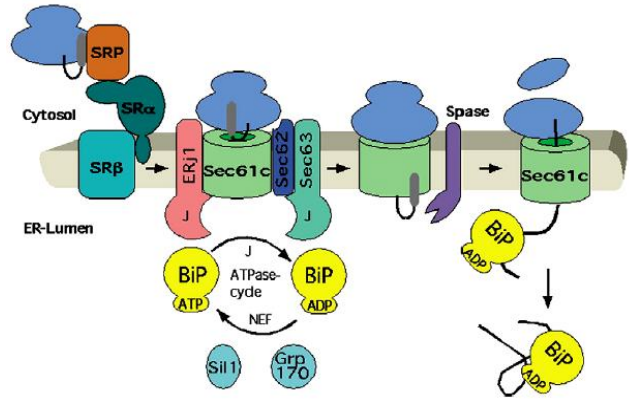


Figura 12. Modelo hipotético de la translocación de proteínas a través del RE.

Basándonos en experimentos *in vitro*, BIP se ha considerado una chaperona que cumple un papel importante y esencial; asociándose con el complejo Sec61 y sirviendo como una pieza molecular en la terminación de la translocación proteica a través del RE [Zimmermann, 2011].

1.4.3. BIP/HSP70 y patologías en humanos

La importancia de las chaperonas en la promoción y mantenimiento de la conformación nativa de los polipéptidos celulares destaca por las consecuencias tóxicas de mal plegamiento y la agregación de proteínas. En varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo Parkinson y Huntington, la acumulación de agregados acompaña a la muerte neuronal en regiones específicas del cerebro, lo cual conduce a los síntomas neurológicos irreversibles en estos trastornos. Las chaperonas moleculares son una defensa crucial contra la toxicidad celular natural. Por lo tanto, la comprensión de su función, tanto a nivel individual y como parte de un complejo, es esencial para abordar adecuadamente las causas de los trastornos del plegamiento de proteínas [Young, 2004].

Se ha reportado la expresión elevada de BIP/HSP70 en tumores malignos. En tumores de mama, la elevada expresión de BIP/HSP70 se ha relacionado a corto plazo con la persistencia de la enfermedad, la metástasis, y un mal pronóstico en pacientes tratados con la combinación de quimioterapia y radiación. Igualmente, se han detectado auto-anticuerpos anti-BIP/HSP70 en suero de pacientes con cáncer gástrico, melanoma, y cáncer de ovario, pero aun se desconoce relación entre el nivel de expresión y el estadio de la enfermedad. Estas observaciones sugieren su posible aplicación en la detección y pronóstico de algunos tipos de cáncer.

Se ha observado que la inducción de BIP/HSP70 participa en múltiples funciones y en la cito-protección contra la apoptosis; por lo tanto, sus altos niveles contrarrestan el estrés inducido que podría llevar a la muerte celular. Las caspasas existen como zimógenos inactivos (procaspasas), y la activación de éstas se organiza como cascada en diversas vías de apoptosis. Se ha demostrado que BIP/HSP70 inhibe la apoptosis mediante la prevención del reclutamiento de las pro-caspasas 9 y 3, con el complejo de apoptosoma, evitando de este modo la formación de un complejo funcional [Jolly, 2000; Sreedhar, 2004; Delie, 2012].

1.4.4. BIP/HSP70 como blanco farmacológico

Como se ha mencionado, BIP/HSP70 es capaz de interactuar con polipéptidos durante prácticamente todas las etapas de su vida útil: desde el plegamiento hasta la degradación. Debido a la diversidad y amplitud de sus funciones, BIP/HSP70 se considera un mediador central de la homeostasis proteica, y no es extraño el implicarla en muchas

enfermedades y considerarla como un blanco terapéutico potencial. Sin embargo, existen varias consideraciones que se deben tener en cuenta durante el diseño y desarrollo de agentes farmacológicos: (i) es una proteína abundante, $\pm 1-2\%$ del total de proteínas celulares; y (ii) es evolutivamente conservada, aproximadamente el 50% de la secuencia es idéntica entre los homólogos de procariotas y eucariotas. Además, la complejidad de sus funciones y su patrón de expresión ubicua crean un desafío adicional [Patury, 2009].

Varios tipos de compuestos de bajo peso molecular han sido utilizados para modular la expresión y función BIP/HSP70, incluyendo fármacos tales como anti-inflamatorios no esteroideos, flavonoides, e inhibidores de Serín/Treonin-fosfatasa. Sin embargo, han resultado relativamente inespecíficos, ya que aparentemente modulan la transcripción, pero interactúan muy poco con la chaperona. En contraste, algunos derivados de espergualina (antibiótico aislado de cultivos de *Bacillus laterosporus*) han demostrado interactuar selectivamente con isoformas de BIP/HSP70 y alterando su función. Posteriormente, se observó que el análogo semi-sintético 15-deoxi-espergualina (DSG) posee una potente actividad inmunosupresora *in vivo* [Smith, 1998].

1.5. Importancia del estudio de la proteína BIP/HSP70 de *E. histolytica*

Para el protozooario *E. histolytica*, es importante la acción de las chaperonas en el plegamiento de proteínas y factores implicados en su virulencia. Los organismos patógenos son conocidos por producir chaperonas. Por lo general, la entrada de un parásito a un organismo hospedero se lleva a cabo en condiciones de alto estrés, donde se expone a cambios bruscos de temperatura, pH, y fuerza iónica; además, se enfrenta a un sistema inmune hostil. Por lo tanto, es necesaria la sobre-expresión de proteínas de respuesta a estrés para garantizar su supervivencia [Boshoff, 2004].

Durante la infección intestinal, *E. histolytica* ha desarrollado diferentes mecanismos de resistencia y evasión del sistema inmune del hospedero. Sin embargo, se ha sugerido que durante la infección invasiva, el parásito activa mecanismos de respuestas a estrés [Santi-Rocca, 2012]. El papel del óxido nítrico (ON) en la inducción de proteínas de respuesta a choque térmico (específicamente BIP/HSP70), ha tenido de especial atención en los últimos años [Ankri, 2002]. Por otro lado, se ha observado que algunos pacientes con amibiasis

desarrollan anticuerpos (inmunoglobulinas) que reaccionan con diferentes antígenos amibianos, donde destaca la proteína BIP/HSP70. Estos antígenos podrían resultar potencialmente útiles en el desarrollo de vacunas orales o el diagnóstico de la amibiasis [Ortiz-Ortiz, 2007].

En consideración a que BIP/HSP70 es una chaperona molecular que aparentemente juega un papel importante en el plegamiento y degradación de proteínas amibianas, y que pudiera activarse como mecanismo de respuesta al estrés medioambiental, resulta interesante caracterizar sus actividades funcionales, las cuales representan la pauta inicial para la realización de ensayos y avances que conduzcan al desarrollo de fármacos potenciales dirigidos contra la amibiasis.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La proteína BIP/HSP70 de *Entamoeba histolytica* exhibe actividad como chaperona molecular capaz de asistir el replegamiento de GFP y evitar la agregación de la cadena B de insulina.

2.2. Objetivo general

Demostrar la actividad chaperona de la proteína BIP/HSP70 de *Entamoeba histolytica* (*EhBIP/HSP70*) mediante ensayos *in vitro* de protección a la agregación de insulina y de replegamiento de la proteína GFP (desnaturalizada) para comprobar su papel funcional en los mecanismos de desplegamiento/replegamiento de proteínas.

2.3. Objetivos específicos

1. Obtener la proteína recombinante *EhBIP/HSP70* mediante protocolos estándar de expresión y purificación (en condiciones nativas) a partir cultivos bacterianos.
2. Determinar la actividad chaperona de la proteína *EhBIP/HSP70* mediante un ensayo de protección de la agregación de insulina para comprobar su papel funcional en el mecanismo de desplegamiento de proteínas.
3. Determinar la actividad chaperona de la proteína *EhBIP/HSP70* mediante un ensayo de renaturalización GFP para comprobar su papel funcional en el mecanismo de replegamiento de proteínas.
4. Examinar el papel del ATP en el mecanismo de replegamiento de proteínas asistido por *EhBIP/HSP70* mediante un ensayo de renaturalización de GFP para determinar su dependencia a activadores de la actividad chaperona.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos biológicos y químicos

3.1.1. Células y medios de cultivo

Los ensayos de expresión fueron realizados utilizando cuatro cepas de *Escherichia coli* (Tabla 1). La transformación bacteriana, mediante choque térmico, se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar de laboratorio [Sambrook, 1989]. Los medios de cultivo, *Luria-Bertani* (LB) (1% de triptona; 0.5% de extracto de levadura, y 1% de NaCl) y 2X YT (1.6% de triptona, 1% de extracto de levadura, y 0.5% de NaCl) fueron utilizados rutinariamente para la proliferación bacteriana.

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas para la expresión de *EhBIP/HSP70*.

Cepa	Fuente	Genotipo
XL1-Blue MRF'	<i>Stratagene</i>	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lac}^{\prime}\text{Z}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^R\text{)]}$
BL21(DE3)	<i>Novagen</i>	$F^{\prime} ompT gal \text{ dcm lon hsdS}_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3) (lacI::PlacUV5::T7)$
SHuffle® Express	<i>New England Biolabs</i>	$huA2 [lon] ompT ahpC gal \lambda att::pNEB3-r1-cDsbC (Spec^R) \Delta trxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) \text{ endA1 } \Delta gor \Delta(mcrC-mrr)114::IS10$
M15	<i>Qiagen</i>	$Nal^S Str^S Rif^S Thi^- Lac^- Ara^+ Gal^+ Mtl^- F^- RecA^+ Uvr^+ Lon^+ [pREP4]$

3.1.2. Plásmidos

El plásmido pQHBIP (Figura 13), obtenido de la reserva de reactivos biológicos del Laboratorio de Biotecnología (FCQI, UABC), porta la secuencia codificante para el polipéptido maduro de la proteína BIP/HSP70 de *E. histolytica* bajo el control del promotor quimérico T5-lacO. Brevemente, la secuencia codificante para el gen BIP/HSP70 fue amplificado (mediante PCR) a partir del ADN genómico de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*. El producto fue subclonado en el plásmido bacteriano de expresión citosólica pQE30 (*Qiagen*), en fase con la secuencia codificante para un hexámero de histidinas, etiquetando así a la proteína recombinante en el extremo N-terminal. Cabe mencionar que la

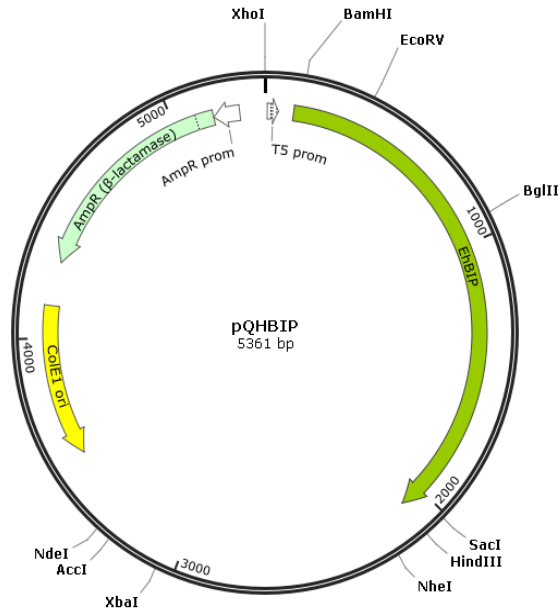


Figura 13. Representación esquemática del plásmido pQHBIP.

La secuencia codificante para *EhBIP/HSP70* (verde) se muestra bajo el control del promotor T5-lacO. Además, se muestra la secuencia codificante para β -lactamasa y el origen de replicación ColE1. Se identifican también algunos sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción.

etiqueta de histidinas permite la purificación de la proteína *EhBIP/HSP70* recombinante mediante cromatografía de afinidad a níquel. Además, pQHBIP posee como marcador de selección el gen codificante para la β -lactamasa, la cual confiere resistencia a ampicilina a las transformantes estables.

3.1.3. Anticuerpos

La inmuno-detección indirecta de la proteína recombinante *EhBIP/HSP70* fue realizada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-poli-histidina, producido en ratón (*Sigma*), siendo este el anticuerpo de reconocimiento primario; en tanto, el reconocimiento secundario fue realizado utilizando un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina, desarrollado en cabra (*Sigma*).

3.1.4. Reactivos químicos y bioquímicos

Los reactivos grado biotecnología o biología molecular fueron obtenidos de diferentes compañías. *Sigma*: reactivo de *Bradford*, ampicilina, insulina recombinante humana, *Tween*[®] 20, azul de bromofenol, N,N'-metilen-bis-acrilamida, trifosfato de adenosina (ATP), MgCl₂, NaCl, KCl, y NaH₂PO₄; *IBI Scientific*: glicerol, ácido etilendiamino tetra-acético di-sódico (EDTA), dodecilsulfato de sodio (SDS), tris-hidroxietyl-aminometano (Tris), y DL-ditiotreitol (DTT); Becton-Dickinson BBL/Difco: triptona y extracto de levadura; *Fisher Biotech*: imidazol, y persulfato de amonio; *Bio-Rad*: azul brillante de *Coomassie R-250*, y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED); *Invitrogen*: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG); *EMD*: acrilamida; *INC*: glicina; *JT Baker*: (NH₄)₂SO₄; y *EM Science*: 2-mercaptoetanol. Las soluciones concentradas de alcohol (metanol e isopropanol) y de ácido (clorhídrico y acético) fueron adquiridas de la compañía *Fermont*. La proteína verde fluorescente (GFP) recombinante fue obtenida de la reserva de material biológico del Laboratorio de Biotecnología (FCQI, UABC).

3.2. Estuches comerciales y sistemas de purificación

El estuche comercial *CellLytic™ B Plus Kit (Sigma)* fue utilizado para la lisis celular en condiciones nativas. El inmuno-reconocimiento mediado por conjugados a fosfatasa alcalina fue revelado usando el estuche comercial *AP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad)*. La proteína recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad a metales usando *agarosa-NTA-Ni⁺²* como fase estacionaria (*Qiagen*) y cromatografía de exclusión molecular usando *Sephadex[®] G-25* como fase estacionaria (columnas PD10, *GE Healthcare Life Sciences*).

3.3. Equipo y paquete computacional

El cultivo de células bacterianas se realizó bajo condiciones controladas usando la incubadora *Incubator Shaker Series 25 (New Brunswick Scientific Co.)*. Algunas incubaciones a temperatura controlada y agitación constante fueron realizada usando el equipo *Incubated Shaker MaxQ 4450 (Thermo Scientific)*. La precipitación celular y el

fraccionamiento subcelular fueron realizados usando las centrifugas *Allegra™ X-22R* (*Beckman Coulter*), *Biocentrifuge Fresco* (*Heraeus*), y *MiniSpin® Plus* (*Eppendorf*). Los registros de absorbancia VIS en formato de micro-ensayo fueron realizados el lector de microplacas *Microplate Reader Model 680* (*Sigma*). Los registros de absorbancia UV en formato de celda fueron realizados usando el espectrofotómetro *SmartSpec™ Plus Spectrophotometer* (*Bio-Rad*). Las determinaciones de fluorescencia en formato de micro-ensayo fueron realizadas usando el fluorómetro *Fluoroskan Ascenti® FL* (*Thermo Electron Co.*). Los datos obtenidos fueron analizados usando el paquete computacional *GraphPad Prism®* v4.03 (*GraphPad Software Inc*).

3.4. Protocolos generales de análisis de proteínas

3.4.1. Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 10%

Las muestras fueron diluidas 1:1 con solución amortiguadora de carga 2X desnaturalizante-reductora para proteínas (10% de glicerol; 2.5% de SDS; 5% de 2-mercaptoetanol; 0.002% de azul de bromofenol; 50 mM de Tris-HCl, pH 6.8). Las mezclas fueron incubadas durante 10 min a una temperatura > 90 °C. Las proteínas contenidas en 10 o 20 µL fueron separadas mediante electroforesis en gel SDS- poliacrilamida al 10% [Laemmli, 1970]. El gel fue preparado como se muestra en la siguiente tabla.

COMPONENTE	Separador (10%)	Concentrador (4%)
4X Lower buffer (mL)	1.5	-
4X Upper buffer (mL)	-	0.63
Solución de acrilamida (mL)	1.95	0.33
Agua desionizada (mL)	2.55	1.54
Persulfato de amonio al 25% (µL)	10	5
TEMED (µL)	5	2.5

La separación fue realizada a 80 V durante 15-20 min y, posteriormente, a 120 V durante 60-90 min. El gel fue teñido durante 1 h en solución de *Coomassie* (25% de isopropanol, 10% de ácido acético, 0.2% de azul de *Coomassie* R250), y desteñido durante la noche con solución de destinción (10% de isopropanol, 10% de ácido acético).

3.4.2. Inmuno-detección (*western blot*)

Después de la separación mediante electroforesis en SDS-poliacrilamida al 10%, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema *CriterionTM Blotter* (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, el gel fue equilibrado durante 15 min en amortiguador de transferencia (25 mM de Tris; 192 mM de glicina; 10% de metanol), enseguida fue empaquetado junto con la membrana de nitrocelulosa (tipo *emparedado*), y las proteínas fueron electro-transferidas durante 30 min a 100 V.

Una vez concluida la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue tratada durante la noche con solución de bloqueo (5% de leche *SveltyTM Nestle[®]*; 50 mM de NaCl; 0.05% de Tween[®] 20, y 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0). Al día siguiente, la membrana fue lavada 3 veces (10 min cada lavado) con solución de TBST (50 mM de NaCl; 0.05% de Tween[®] 20; 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0). Para el reconocimiento primario, la membrana fue tratada con una solución 1:5,000 del anticuerpo monoclonal anti-poli-histidinas (diluido en TBST). Después de una 1 h de incubación a temperatura ambiente (con agitación constante), la membrana fue lavada 3 veces (10 min cada lavado) con solución de TBST. Para el reconocimiento secundario, la membrana fue tratada con una solución 1:10,000 del anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (diluido en TBST). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente (con agitación constante), la membrana fue lavada 3 veces (10 min cada lavado) con solución de TBST.

La inmuno-detección fue revelada mediante tratamiento de la membrana con una solución de sustrato para fosfatasa alcalina, BCIP/NBT. A criterio del ensayo y del patrón de reconocimiento esperado, la reacción de revelado fue detenida mediante la adición de una solución de EDTA 5 mM, pH 8.0.

3.4.3. Determinación de proteínas mediante micro-ensayo de *Bradford*

Inicialmente, se preparó una solución 20 µg/mL de albúmina sérica bovina, BSA (*New England Biolabs*). En una micro-placa, simultáneamente se prepararon mezclas estándar (50 µL) conteniendo 0, 4, 8, 12, 16, y 20 µg/mL de BSA, y diluciones 1:10, 1:25, o 1:50 de las muestras proteicas. Posteriormente, se añadió 100 µL del reactivo Bradford a cada una de las mezclas de reacción. Después de 5 min de incubación a temperatura

ambiente, se registraron los valores de A_{595} y A_{450} . La concentración de proteína fue calculada mediante extrapolación con la curva estándar (A_{595}/A_{450} en relación con $\mu\text{g/mL}$ de BSA) [Zor, 1996]. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.5. Expresión de *EhBIP/HSP70*

3.5.1. Transformación bacteriana

Como ya se tenía una suspensión celular al 15% de glicerol de la cepa XL1-Blue MRF' de *E. coli* portadora del plásmido pQHBIP (reserva del Laboratorio de Biotecnología, FCQI-UABC), sólo las cepas BL21(DE3), SHuffle[®] Express, y M15 fueron transformadas.

Inicialmente, se preparó un cultivo nocturno de cada una de las cepas, considerando sus requerimientos de selección: LB suplementado con 50 $\mu\text{g/mL}$ de espectinomicina, para SHuffle[®] Express; 25 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina para M15; o en ausencia de antibiótico para BL21(DE3). Los medios fueron inoculados con una asada de la cepa correspondiente (proveniente de una suspensión celular en glicerol al 15%) e incubados durante la noche a 37 °C, con agitación constante (300 rpm).

Al día siguiente, se preparó un cultivo joven para cada cepa, inoculando 2 mL de medio con 40 μL del cultivo nocturno respectivo. Después de 3 h de incubación a 37 °C, con agitación constante (300 rpm), 1 mL de cultivo fue transferido a un microtubo y el paquete celular fue separado mediante centrifugación (2 min; 10,000 rpm). Posteriormente, las células fueron lavadas en dos ocasiones: 0.5 mL de agua destilada estéril y 0.5 mL de 50 mM de CaCl_2 estéril, ambos fríos. El sobrenadante de cada lavado (5 min; 5,000 rpm; 4 °C) fue descartado. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 0.1 mL de 50 mM CaCl_2 estéril frío y mantenidas durante 5 min en hielo.

A cada suspensión celular, se le agregó 1 μL de plásmido pQHBIP (± 100 ng) y se mantuvieron en hielo durante 30 min. El choque térmico fue realizado mediante 1.5 min de incubación a 42 °C seguida de 5 min en hielo (inmediatamente). Las células fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de medio 2X YT e incubadas durante 30-60 min a 37°C. 100 μL de cada suspensión celular transformada fueron inoculados en la superficie de medio LB sólido suplementado con 0.15 mg/mL de ampicilina. Los cultivos fueron

incubados a 37 °C durante la noche y las unidades formadoras de colonias resistentes al medio selectivo fueron consideradas como transformantes estables.

3.5.2. Análisis de expresión de *EhBIP/HSP70* a mini-escala

Tres mL de medio LB para cada cepa, suplementado con 0.15 mg/mL de ampicilina, fueron inoculados con 10 µL de una suspensión celular de *E. coli* (BL21 [DE3], XL1-Blue MRF', SHuffle® Express, y M15) portadora del plásmido pQHBIP. Los cultivos fueron incubados durante la noche a 37 °C, con agitación constante (300 rpm). Al día siguiente, 4 mL de medio selectivo para cada cepa, fueron inoculados (respectivamente) con 40 µL del cultivo nocturno de cada cepa. Después de 2 h de incubación a 37 °C, con agitación constante (300 rpm), 2 mL de cada cultivo fueron separados y rotulados como “SI” (sin inductor); por otro lado, los 2 mL restantes fueron inoculados con IPTG a una concentración final de 1 mM (2 µL de una solución 1 M de IPTG) y rotulados como “CI” (con inductor). Para permitir la expresión proteica, los cultivos fueron incubados durante 4 h a 37 °C, con agitación constante (300 rpm). A partir de 1 mL de cada cultivo, se obtuvo el paquete celular mediante centrifugación (2 min; 10,000 rpm) y se mantuvo en congelación hasta su análisis mediante electroforesis en SDS-poliacrilamida al 10% (cabe mencionar que la pastilla fue resuspendida en 0.2 mL de agua destilada estéril previo a su análisis).

3.5.3. Efecto de la concentración de inductor

Tres mL de medio LB selectivo para SHuffle® Express, suplementado con 0.15 mg/mL de ampicilina, fueron inoculados con 30 µL de una suspensión celular la cepa portadora del plásmido pQHBIP. El cultivo fue incubado durante la noche a 37 °C, con agitación constante (300 rpm). Al día siguiente, se prepararon 5 tubos de cultivo conteniendo 2 mL de medio selectivo y fueron inoculados con 40 µL del cultivo nocturno. Después de 2 h de incubación a 37 °C, con agitación constante (300 rpm), cada 1 de los 5 cultivos fue inoculado con IPTG a una concentración final de 0, 0.1, 0.2, 0.5, y 1 mM, respectivamente. Para permitir la expresión proteica, los cultivos fueron incubados durante 4 h a 37 °C, con agitación constante (300 rpm). A partir de 1 mL de cada cultivo, se obtuvo el paquete celular mediante centrifugación (2 min; 10,000 rpm) y se mantuvo en congelación hasta su análisis

mediante electroforesis en SDS-poliacrilamida al 10% (cabe mencionar que la pastilla fue resuspendida en 0.2 mL de agua destilada estéril previo a su análisis).

3.5.4. Expresión proteica de *EhBIP/HSP70* a mdi-escala

La expresión a escala media de la proteína *EhBIP/HSP70* se realizó en 10 lotes de 100 mL. Cada lote fue obtenido mediante un tratamiento estándar. Cuarenta µL de una suspensión celular de la cepa SHuffle[®] Express portadora del plásmido pQHBIP fueron inoculados en 2 mL de medio selectivo suplementado con ampicilina (0.15 mg/mL). El cultivo fue incubado durante la noche a 37 °C, con agitación constante (300 rpm). Al día siguiente, los 2 mL de cultivo joven fueron inoculados en 100 mL de medio LB suplementado con ampicilina (0.15 mg/mL). Después de 2 h de incubación a 37 °C, con agitación constante (300 rpm), la expresión proteica fue inducida con IPTG a una concentración final de 0.1 mM (10 µL de una solución 1 M de IPTG). El cultivo fue incubado durante 4 h a 37 °C, con agitación constante (300 rpm). Finalmente, la pastilla celular fue obtenida mediante centrifugación (15 min; 9,500 rpm; 10 °C) y conservada hasta su uso a -20 °C.

3.6. Purificación de *EhBIP/HSP70*

3.6.1. Obtención del lisado bacteriano soluble total en condiciones nativas

Cada pastilla celular fue descongelada a temperatura ambiente y resuspendida en 5 mL de solución amortiguadora de lisis CellLytic[™] B, suplementada con 100 µL de lisozima, 50 µL de una solución de inhibidores de proteasas y 1 µL de benzonasa (siguiendo las recomendaciones del proveedor). Para facilitar la lisis celular, la suspensión fue incubada durante 15 min a temperatura ambiente, con agitación constante. Inicialmente, la fracción soluble fue obtenida mediante centrifugación a 9,500 rpm (15 min; 10 °C) y, posteriormente, clarificada mediante centrifugación a 14,500 rpm (15 min; 4°C). El lisado bacteriano soluble total (LBST) fue conservado hasta su uso a 4 °C. La proteína recombinante *EhBIP/HSP70* pura obtenida mediante tres procesos de separación consecutivos: cromatografía de afinidad a níquel, precipitación con sulfato de amonio, y cromatografía de exclusión molecular.

3.6.2. Cromatografía de afinidad a níquel

La proteína recombinante *EhBIP/HSP70* contenida en el LBST proveniente de 100 mL de cultivo, fue obtenida de la manera siguiente: la columna de cromatografía, conteniendo 0.5 mL de agarosa-NTA-Ni⁺² (fase estacionaria), fue equilibrada con 2.5 mL de solución amortiguadora de pegado/lavado (300 mM de NaCl; 10 mM de imidazol, pH 8.0; 50 mM de NaH₂PO₄, pH 8.0). Enseguida, el LBST fue cargado lentamente en la columna (el efluente fue descartado, fracción no pegada). Después, la columna fue lavada con 10 mL de solución de pegado/lavado (el efluente fue descartado, fracción de lavado). Finalmente, la proteína recombinante fue separada mediante la adición de 3.5 mL de solución de elución (300 mM de NaCl; 250 mM de imidazol, pH 8.0; 50 mM de NaH₂PO₄, pH 8.0) y colectada en fracciones de 0.5 mL. Las fracciones con mayor concentración de *EhBIP/HSP70* fueron agrupadas y mezcladas perfectamente.

3.6.3. Precipitación con sulfato de amonio

La proteína recombinante *EhBIP/HSP70* contenida en la colección de fracciones enriquecidas fue precipitada con sulfato de amonio a una concentración final de 60%. Para un volumen de 11 mL, 4.4 g de (NH₄)₂SO₄ fueron agregados lentamente (en porciones pequeñas), con agitación leve y en condiciones de baja temperatura (hielo), verificando continuamente la disolución. Posteriormente, la suspensión se mantuvo en refrigeración durante la noche. Al día siguiente, la fracción proteica (insoluble) fue separada mediante centrifugación (30 min; 9,500 rpm) y redisuelta en 5 mL de 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 (estéril).

3.6.4. Cromatografía de exclusión molecular

La columna de cromatografía PD-10 conteniendo la resina *Sepharose*[®] G-25 (fase estacionaria) fue equilibrada con 25 mL de solución amortiguadora de estabilización (20 mM de Tris-HCl, pH 8.0). Enseguida, 2.5 mL de solución proteica fue cargada en la columna (el efluente fue descartado). Posteriormente, la proteína recombinante *EhBIP/HSP70* fue obtenida mediante elución con 3.5 mL de solución amortiguadora de estabilización. Este procedimiento fue realizado en dos ocasiones, considerando los 5 mL de solución proteica obtenidos mediante la precipitación con sulfato de amonio.

3.7. Análisis de la actividad chaperona de *EhBIP/HSP70*

3.7.1. Ensayo de protección de la agregación de insulina

La actividad como chaperona molecular de *EhBIP/HSP70* fue valorada mediante un micro-ensayo que calcula la habilidad de prevenir la agregación de insulina [Scheibel, 1998]. En una micro-placa, se prepararon mezclas como se muestra en la siguiente tabla (volúmenes en μL):

Componentes	B	0	0.5	1.0	2.0	4.0	Final
<i>NaH₂PO₄</i> (0.2 M, pH 7.0)	5	5	5	5	5	5	10 mM
<i>NaCl</i> (1 M)	10	10	10	10	10	10	100 mM
<i>Insulina</i> (782.66 μM)	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	100 μM
<i>EhBIP/HSP70</i> (30.4 μM)	0	0	1.6	3.3	6.6	13.2	0 - 4.0 μM
<i>H₂O</i> destilada estéril	72.2	68.2	66.6	64.9	61.6	55.0	cbp
<i>DTT</i> (0.5 mM)	0	4	4	4	4	4	20 mM

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 100 μL , a temperatura ambiente; sin embargo, el volumen de DTT se añadió al final (debido a que es el iniciador de la reacción). Inmediatamente, la micro-placa se colocó en un lector y se registraron los valores de A_{650} . La cinética fue registrada durante 60 min, con intervalos de lectura cada 5 min. La actividad chaperona fue valorada considerando el valor máximo de precipitación (saturación aparente), obtenida graficando la A_{650} en relación al tiempo. La actividad chaperona de *EhBIP/HSP70* fue determinada utilizando la fórmula: Protección (%) = $[(A_0 - A)/A_0] \times 100$, donde A_0 y A representan la absorbancia de saturación aparente en ausencia y presencia de la chaperona, respectivamente [Spinozzi, 2006].

3.7.2. Ensayo de renaturalización de GFP

Inicialmente, una solución 5 μM de GFP desnaturalizada (*daGFP*) fue preparada mediante una dilución 1:1 de una solución 10 μM de GFP (0.3 mM de EDTA, pH 8.0; 1 mM de DTT; 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5) y una solución 125 mM de HCl. La desnaturalización se realizó a temperatura ambiente y se completó en un lapso de 1-5 min [Wang, 2010]. La desnaturalización (baja señal fluorescente) fue confirmada mediante fluorimetría. En una micro-placa para fluorescencia, se prepararon mezclas como se muestra en la siguiente tabla (volúmenes en μL):

<i>Componentes</i>	B	0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	6.0	Final
2X Sol. de Renaturalización	100	100	100	100	100	100	100	100	1X
H ₂ O destilada estéril	100	98.0	94.7	93.4	84.8	78.3	71.7	58.5	cbp
<i>EhBIP/HSP70</i> (30.4 μM)	0	0	3.3	6.6	13.2	19.7	26.3	39.5	0 - 6.0 μM
<i>daGFP</i> (5 μM)	0	2	2	2	2	2	2	2	50 nM

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 200 μL (amortiguador de renaturalización 1X: 25 mM de MgCl₂; 100 mM de KCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) a temperatura ambiente; sin embargo, el volumen de *daGFP* se añadió al final (debido a que es el iniciador de la reacción). Inmediatamente, la micro-placa se colocó en un lector y se registraron los valores de fluorescencia a longitudes de onda de 485 y 538 nm (excitación y emisión, respectivamente). La fluorescencia fue continuamente registrada durante 15 min, con intervalos de 1 min. La cinética de renaturalización asistida por *EhBIP/HSP70* fue obtenida graficando la diferencia entre los incrementos de fluorescencia en presencia y ausencia de la chaperona ($\Delta F - \Delta F_0$) con respecto al tiempo. La actividad chaperona fue determinada considerando la dependencia de la constante de la velocidad (*k*) en función de la concentración (μM) de *EhBIP/HSP70*.

3.7.3. ATP como activador de la renaturalización de GFP

El papel del ATP como activador de la función chaperona de *EhBIP/HSP70* fue determinado mediante la repetición del ensayo la renaturalización de GFP en presencia de diferentes concentraciones del activador. Inicialmente, se preparó una solución 200 mM de ATP. Posteriormente, realizó una mezcla de estabilización ATP/Mg⁺² conteniendo 100 mM de ATP y 10 mM de MgCl₂. En una micro-placa para fluorescencia, se prepararon mezclas como se muestra en la siguiente tabla (volúmenes en μL):

<i>Componentes</i>	0		1		2		4		Final
	B0	0	B1	1	B2	2	B4	4	
2X Sol. de Renaturalización	100	100	100	100	100	100	100	100	1X
H ₂ O destilada estéril	98	88	96	86	94	84	90	80	cbp
<i>EhBIP/HSP70</i> (20 μM)	0	10	0	10	0	10	0	10	0 / 1 μM
ATP/MgCl ₂ (100/10 mM)	0	0	2	2	4	4	8	8	0 - 4 mM de ATP
<i>daGFP</i> (5 μM)	2	2	2	2	2	2	2	2	50 nM

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 200 μL (en amortiguador de renaturalización 1X) a temperatura ambiente; sin embargo, antes de agregar el volumen del

iniciador de la reacción (*daGFP*), la mezcla fue incubada durante 5 min. Inmediatamente, la micro-placa se colocó en un lector y se registraron los valores de fluorescencia a longitudes de onda de 485 y 538 nm (excitación y emisión, respectivamente). La fluorescencia fue continuamente registrada durante 15 min, con intervalos de 1 min. La cinética de renaturalización asistida por *EhBIP/HSP70* y activada por ATP fue obtenida graficando la diferencia entre los incrementos de fluorescencia en presencia y ausencia de chaperona ($\Delta F - \Delta F_0$) con respecto al tiempo. La actividad chaperona activada por ATP fue determinada considerando la dependencia de la constante de la velocidad (k) en función de la concentración (mM) de ATP.

3.7.4. Análisis estadístico

El tratamiento de datos y análisis estadísticos fueron realizados utilizando el paquete Prism[®] v 4.03 (*GraphPad Software, Inc.*). La media y el error estándar de la media, así como el análisis de varianza fueron calculados a partir de los datos de tres experimentos independientes. Los valores significativos ($p < 0.05$) fueron comparados con una prueba de Dunnett. Todos los ajustes fueron realizados mediante mínimos cuadrados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. La cepa SHuffle™ Express de *E. coli* exhibe un alto nivel de expresión de *EhBIP/HSP70*

El plásmido pQHBIP fue transfectado en las cepas BL21(DE3), XL1-Blue MRF', SHuffle® Express, y M15 de *E. coli*. Estas fueron elegidas por sus características genético-bioquímicas y su amplia aplicación en protocolos de expresión de proteínas:

- i. BL21(DE3) es fácil de inducir y desarrolla altos niveles de expresión;
- ii. XL1-Blue MRF' es utilizada principalmente para infección con el bacteriófago λ y amplificación de plásmidos; sin embargo, puede ser empleada para expresión controlada de proteínas;
- iii. SHuffle® Express posee una amplia capacidad de expresar y plegar proteínas en el citosol, específicamente aquellas con múltiples enlaces disulfuro; y
- iv. M15 es fácil de manipular y desarrolla altos niveles de expresión de proteínas potencialmente tóxicas.

A partir de cultivos jóvenes, se preparó un ensayo de expresión de *EhBIP/HSP70* a mini-escala. Para cada cepa, se prepararon pares de cultivos: inducido (1 mM de IPTG, CI; no inducido, SI), y se obtuvieron lisados bacterianos totales. Las proteínas presentes en cada lisado fueron separadas mediante SDS-PAGE al 10%. La expresión de *EhBIP/HSP70* fue verificada mediante tinción con azul de *coomassie* e inmunodetección (*western blot*). Como se observa en la Figura 14, es evidente la expresión de una proteína del tamaño esperado, tanto en el gel como en la inmunodetección.

La expresión relativa de la proteína *EhBIP*, de acuerdo a cada contexto celular, fue determinada mediante densitometría, utilizando la expresión en ausencia de inductor como basal. Interesantemente, la cepa SHuffle® Express mostró el mayor nivel de expresión relativa (1.73), seguida de la cepa M15 (1.32). Desafortunadamente, las cepas BL21(DE3) y XL1-Blue MRF' mostraron niveles bajos (1.02 y <1.0, respectivamente). Ante este resultado, se tomó la decisión de utilizar la cepa SHuffle® Express como la hospedera para la expresión proteica de *EhBIP/HSP70*.

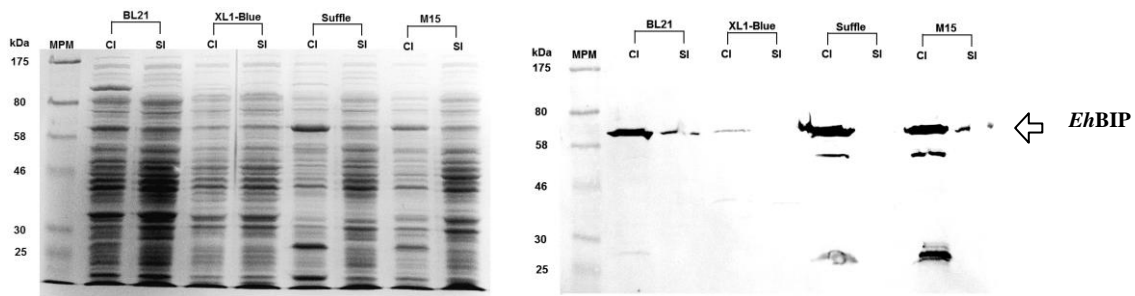


Figura 14. Expresión a mini-escala de *EhBIP* en 4 cepas de *E. coli*.

Panel Izquierdo. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE al 10%. El gel fue teñido con azul de *coomassie*.
Panel Derecho. Inmunodetección de *EhBIP/HSP70* con un anticuerpo anti-poli-histidinas.

La proteína de interés, con el PM esperado, se muestra en el lado derecho. El PM de los marcadores se encuentra al lado izquierdo de cada panel. El par de cada cepa y la condición de cultivo se muestra en la parte superior. CI (1 mM de IPTG) y SI (no inducido).

4.2. La expresión de *EhBIP/HSP70* se induce a baja concentración de IPTG

El efecto de la concentración de inductor sobre la expresión de *EhBIP/HSP70* fue analizado mediante un ensayo a mini-escala. Se prepararon cultivos inducidos con 0, 0.1, 0.2, 0.5, y 1.0 mM de IPTG y se obtuvieron lisados bacterianos totales. Las proteínas presentes en

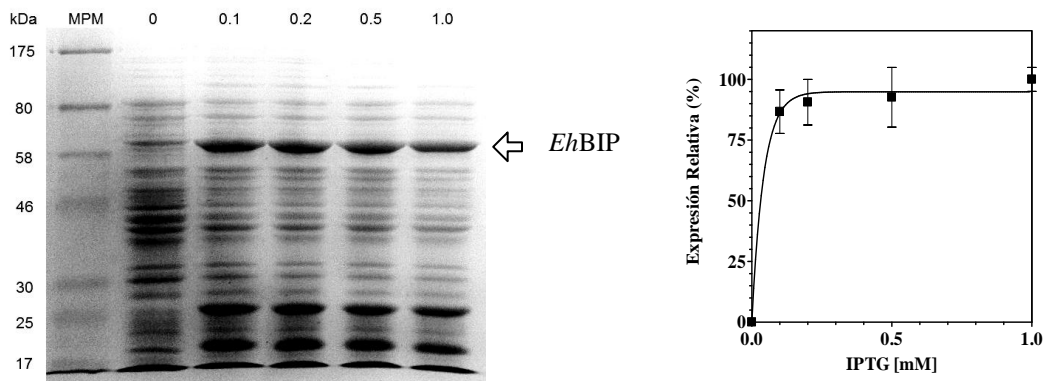


Figura 15. Expresión a mini-escala de *EhBIP* en diferentes concentraciones de IPTG.

Panel Izquierdo. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE al 10%. El gel fue teñido con azul de *coomassie*. La proteína de interés, con el PM esperado, se muestra en el lado derecho. El PM de los marcadores se encuentra al lado izquierdo. La concentración mM de IPTG se muestra en la parte superior.

Panel Derecho. Representación gráfica de la tendencia dosis-independiente de la expresión relativa de *EhBIP* en función de la concentración de IPTG.

cada lisado fueron separadas mediante SDS-PAGE al 10%. La expresión de *EhBIP/HSP70* fue verificada mediante tinción con azul de *coomassie* (Figura 15).

Como se realizó anteriormente, la expresión relativa fue determinada mediante densitometría, utilizando la expresión constitutiva de proteínas bacterianas como controles de normalización (Figura 15). Sorprendentemente, los niveles de expresión máximos se observan desde muy bajas concentraciones ($p < 0.05$). Considerando este resultado, se utilizó a 0.1 mM de IPTG como la concentración de inductor requerida para obtener los máximos niveles de expresión de *EhBIP/HSP70*.

4.3. *EhBIP/HSP70* se purifica en niveles aceptables

La expresión a midi-escala se realizó en 10 cultivos de 100 mL cada uno (1 L). La cepa SHuffle[®] Express portadora de pQHBIP fue cultivada durante 4 h a 37 °C (con agitación constante), en presencia de 0.1 mM de IPTG. El paquete celular de cada 100 mL de cultivo fue obtenido mediante centrifugación. La lisis celular fue realizada en condiciones nativas y el lisado bacteriano soluble total (LBST) fue obtenido mediante centrifugación. La concentración de proteína total fue determinada mediante un micro-ensayo de Bradford. A

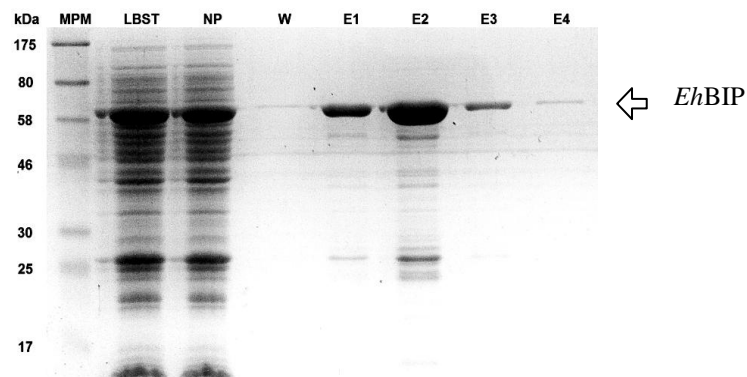


Figura 16. Separación de proteínas (SDS-PAGE al 10%) de las fracciones obtenidas durante la cromatografía de afinidad a níquel.

El gel fue teñido con azul de *coomassie*. La proteína de interés, con el PM esperado, se muestra en el lado derecho. El PM de los marcadores se encuentra al lado izquierdo.

partir 10 pastillas celulares, se obtuvieron 56.7 mL de LBST, con una concentración calculada de 8.65 mg/mL. Por lo tanto, el rendimiento proteico total fue de 490.46 mg por litro de cultivo, considerando las condiciones establecidas.

La purificación de *EhBIP/HSP70* fue llevada a cabo mediante un procedimiento consecutivo de tres procesos de separación independientes: cromatografía de afinidad a níquel, precipitación con sulfato de amonio, y cromatografía de permeación en gel.

Las proteínas presentes en las fracciones de la cromatografía de afinidad a níquel fueron separadas mediante SDS-PAGE al 10%. La presencia de *EhBIP/HSP70* fue verificada mediante tinción con azul de *coomassie* (Figura 16). Como se observa, la mayor concentración fue evidente en la fracción de elución 2 (E2), con una menor presencia en las fracciones de elución 1 y 3 (E1 y E3). Las eluciones enriquecidas con la proteína recombinante fueron recolectadas y la concentración proteica fue determinada mediante un micro-ensayo de *Bradford*. A partir de esas fracciones, se obtuvieron 11 mL de solución de proteína, con una concentración calculada de 1.26 mg/mL. Por lo tanto, el rendimiento proteico total fue de 13.86 mg por litro de cultivo; además, se determinó que *EhBIP/HSP70* corresponde al 2.8% del contenido total de las proteínas bacterianas.

Posteriormente, la proteína fue precipitada con sulfato de amonio al 60%, seguida una cromatografía de permeación en gel, rindiendo como producto a *EhBIP/HSP70* con una pureza mayor al 95%, a juicio enteramente visual (Figura 17). Además, mediante un micro-ensayo de *Bradford*, y considerando un PM teórico calculado (73,066 g/mol), se determinó una concentración de 30.4 μ M para la proteína *EhBIP/HSP70* pura.

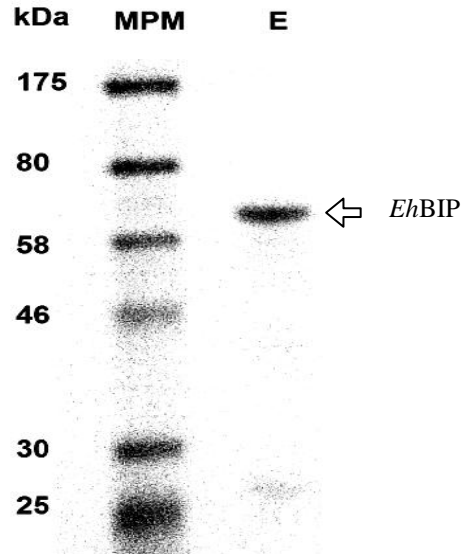


Figura 17. Análisis de la proteína *EhBIP/HSP70* (2 μ g) mediante SDS-PAGE al 10%.

El gel fue teñido con azul de *coomassie*. La proteína de interés, con el PM esperado, se muestra en el lado derecho. El PM de los marcadores se encuentra al lado izquierdo.

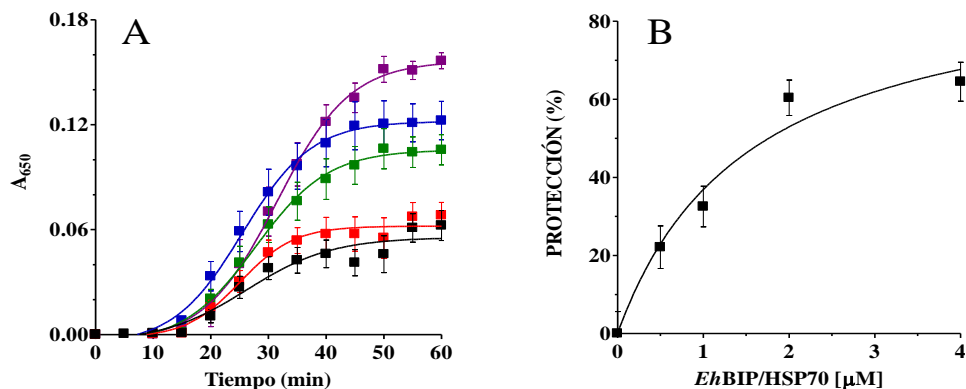


Figura 18. Representación gráfica de la actividad protectora de la agregación de insulina asistida por *EhBIP/HSP70*.

A. Cinética de agregación insulina a diferentes concentraciones de *EhBIP/HSP70* (μM : 0, púrpura; 0.5, azul; 1, verde; 2, rojo; 4, negro). B. Curva dosis-respuesta (hiperbólica) que muestra la dependencia no lineal del porcentaje de protección de la agregación de insulina en relación con la concentración de *EhBIP/HSP70*.

4.4. *EhBIP/HSP70* protege la agregación de insulina

La actividad chaperona de *EhBIP/HSP70*, evidenciada a través de su habilidad de prevenir la agregación de proteínas, fue analizada mediante un ensayo de protección de la agregación de insulina. Al ser reducida por DTT (20 mM), las cadenas A y B de insulina se separan, y la cadena B tiende a agregarse y precipitarse. Esta propiedad ha sido utilizada para estudiar la actividad muchas chaperonas, cuantificando la capacidad de prevenir la agregación.

Como se puede observar en la Figura 18A, la cinética de agregación de la cadena B de insulina muestra una tendencia sigmoidea típica, llegando a la saturación a los 40-50 min de reacción. A partir de los valores de saturación, obtenidos a diferentes concentraciones de *EhBIP/HSP70*, se determinó el porcentaje de protección de la agregación (Anexo, Tablas 2 y 3) para valorar la actividad chaperona de *EhBIP/HSP70* en función de su concentración. Como se observa en la Figura 18B, la actividad chaperona de *EhBIP/HSP70* exhibe un patrón dosis-dependiente no lineal con una tendencia hiperbólica típica; además, a partir del ajuste, se calculó una concentración efectiva media de $1.54 \pm 0.59 \mu\text{M}$ y un porcentaje de protección máximo de $93.8 \pm 15.2\%$.

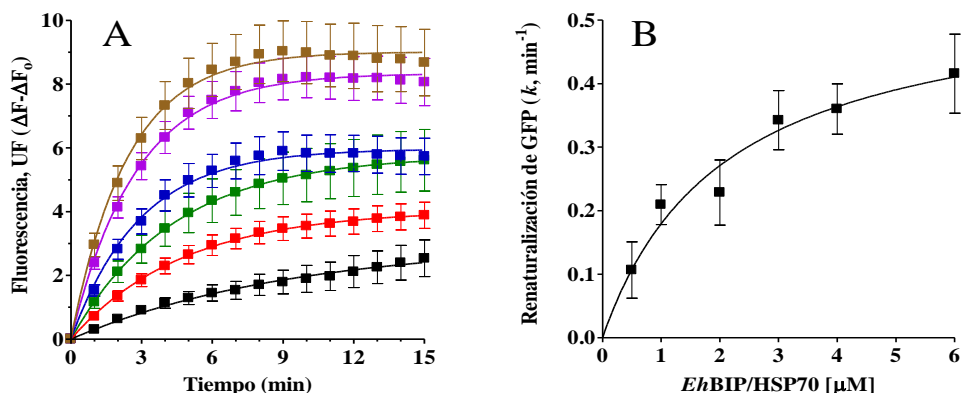


Figura 19. Representación gráfica del replegamiento de la proteína GFP asistido por *EhBIP/HSP70*.

A. Cinética de renaturalización de GFP a diferentes concentraciones de *EhBIP/HSP70* (μM : 0.5, negro; 1, rojo; 2, verde; 3, azul; 4, púrpura; 6, café). B. Curva dosis-respuesta (hiperbólica) que muestra la dependencia no lineal del replegamiento de GFP en relación con la concentración de *EhBIP/HSP70*.

4.5. *EhBIP/HSP70* asiste el replegamiento de GFP

La GFP es una proteína autofluorescente soluble que contiene un fluoróforo consistente de residuos de aminoácidos modificados post-traduccionamente (Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷) [Heim, 1994]. Interesantemente, GFP es resistente a la desnaturalización por 8 M de urea, 6 M de cloruro de guanidina, y 1% de SDS [Ward, 1982]. Sin embargo, una baja señal fluorescente ha sido observada después de una desnaturalización en medio ácido [Enoki, 2004]. La GFP desnaturalizada-ácida ha sido utilizada como sustrato modelo para estudiar el plegamiento de proteínas asistido por chaperonas bacterianas [Makino, 1997; Yoshida, 2002; Okochi, 2005; Wang, 2010], y por algunas PDI de organismos eucarióticos [Mares, 2011].

Como se muestra en la Figura 19A, la cinética de renaturalización de GFP exhibe una tendencia exponencial de asociación ligando-receptor de una sola fase. A partir de éstas, se obtuvieron las constantes de velocidad (k), como medida del replegamiento de GFP a diferentes concentraciones de *EhBIP/HSP70* (Anexo, Tablas 4 y 5). Como se describe en la Figura 19B, la actividad chaperona de *EhBIP/HSP70*, valorada mediante su habilidad de renaturalizar a GFP, presenta un patrón dosis-dependiente no lineal con una tendencia hiperbólica típica; además, se calculó una concentración efectiva media de $2.08 \pm 0.99 \mu\text{M}$ y una constante de velocidad máxima de $0.553 \pm 0.106 \text{ min}^{-1}$.

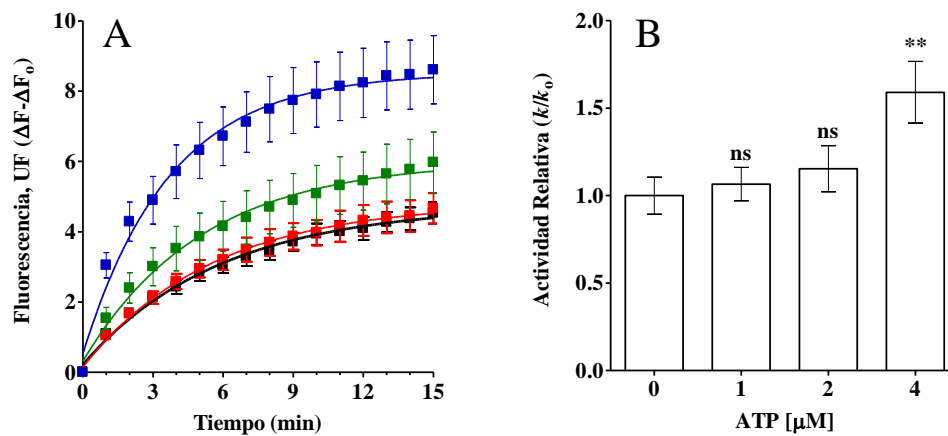


Figura 20. Representación gráfica del replegamiento de la proteína GFP asistido por *EhBIP/HSP70* y activado por ATP.

A. Cinética de renaturalización de GFP asistida *EhBIP/HSP70* (1 μ M) y activada por diferentes concentraciones de ATP (mM: 0, negro; 1, rojo; 2, verde; 4, azul). B. Gráfica de barras que muestra el efecto activador del ATP sobre el replegamiento de GFP asistido por *EhBIP/HSP70*. Notación: ns, no significativa; **, significativa ($p < 0.05$).

4.6. El ATP activa el replegamiento de GFP asistido por *EhBIP/HSP70*

Considerando que las proteínas BIP poseen un dominio de unión a ATP, el cual ha sido asociado a una actividad ATPasa que activa el replegamiento de proteínas, se realizó un ensayo preliminar para evidenciar el papel del ATP sobre la actividad chaperona de *EhBIP/HSP70*, usando como modelo el ensayo de replegamiento asistido de GFP.

Como se muestra en la Figura 20A, la cinética de renaturalización asistida de GFP, en ausencia y presencia de ATP, exhibe una tendencia exponencial de asociación ligando-receptor de una sola fase. A partir de éstas, se obtuvieron las constantes de velocidad (k), como medida del replegamiento asistido de GFP a diferentes concentraciones de ATP (Anexo, Tabla 6). Como se detalla en la Figura 20B, la actividad chaperona se activa en presencia de ATP (4 mM), sugiriendo que la unión a éste, y su posible hidrólisis, juegan un papel importante en el replegamiento de proteínas asistido por *EhBIP/HSP70*.

5. CONCLUSIONES

La proteína *EhBIP/HSP70* exhibe actividades funcionales características de las chaperonas moleculares: (1) se une a la cadena B de insulina, evitando que las regiones hidrofóbicas interaccionen, se agreguen y formen precipitados; y (2) favorece el replegamiento de proteínas desnaturalizadas químicamente, tal como GFP.

Algunos factores de virulencia amibianos dependen del correcto plegamiento para adquirir su estructura nativa; por lo tanto, es posible pensar en fármacos que alteren la estructura o función de *EhBIP/HSP70*, los cuales afectarían el mecanismo de plegamiento de proteínas en *E. histolytica*, y, en consecuencia, afectarían su estilo de vida parasitario.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, *et al.* Molecular biology of the cell. 4th Edition, Garland Science, 2007.
- Ankri S. Strategies of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* to evade the innate immune responses of intestinal epithelial cells. *J Biosci.* 2002; 27(3): 609–14.
- Bonomo J, Welsh JP, Manthiram K, Swartz JR. Comparing the functional properties of the Hsp70 chaperones, DnaK and BiP. *Biophys Chem.* 2010; 149(1-2): 58-66.
- Boshoff A, Nicoll WS, Hennessy F, Ludewig MH, Daniel S, Modisakeng KW, Shonhai A, McNamara C, Bradley G, Blatch GL. Molecular chaperones in biology, medicine and protein biotechnology. *S Afr J Sci.* 2004; 100(11-12): 665-77.
- Brodsky JL, Skach WR. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr Opin Cell Biol.* 2011; 23(4): 464-75.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention of U.S.A. Health information for international travel 2012. <http://wwwnc.cdc.gov/travel/page/yellowbook-2012-home.htm>. Consultada en Septiembre 2012.
- Chevalier M, King L, Blond S. Purification and properties of BiP. *Methods Enzymol.* 1998; 290: 384-409.
- Choi MH, Sajed D, Poole L, Hirata K, Herdman S, Torian BE, Reed SL. An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Mol Biochem Parasitol.* 2005; 143(1): 80-9.
- Creighton T. Disulphide-coupled protein folding pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1995; 348(1323): 5-10.
- Davis PH, Chen M, Zhang X, Clark CG, Townsend RR, Stanley SL Jr. Proteomic comparison of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* and the role of *E. histolytica* alcohol dehydrogenase 3 in virulence. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(4): e415.
- Delie F, Petignat P, Cohen M. GRP78 protein expression in ovarian cancer patients and perspectives for a drug-targeting approach. *J Oncol.* 2012; 468615.

- Enoki S, Saeki K, Maki K, Kuwajima K. Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein. *Biochemistry*. 2004; 43: 14238–48.
- Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(2): 318-31.
- Faust DM, Guillen N. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes Infect*. 2012 Jun 16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.013>.
- Feldman DE, Frydman J. Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones. *Curr Opin Struct Biol*. 2000; 10(1): 26-33.
- Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*. 1999; 79(2): 425-49.
- Gómez-Puertas P, Martín-Benito J, Carrascosa JL, Willison KR, Valpuesta JM. The substrate recognition mechanisms in chaperonins. *J Mol Recognit*. 2004; 17(2): 85-94.
- Gutiérrez A, Sánchez-López R, Ramos MA, Alagón A. Cloning of the *Entamoeba histolytica* STT3 gene, a subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *Arch Med Res*. 2000; 31(4): S162-4.
- Harris NJ, Booth PJ. Folding and stability of membrane transport proteins *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1818(4): 1055-66.
- Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 12501–4.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía de México (INEGI). Causas de morbilidad 2000-1009. <http://www.inegi.org.mx>. Consultada en Septiembre de 2012.
- Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(19): 1564-72.
- Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, Smith C. Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1816(2): 89-104.
- Kosmaoglou M, Schwarz N, Bett JS, Cheetham ME. Molecular chaperones and photoreceptor function. *Prog Retin Eye Res*. 2008; 27(4): 434-49.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(259): 680-5.
- Makino Y, Amada K, Taguchi H, Yoshida M. Chaperonin-mediated folding of green fluorescent protein. *J Biol Chem*. 1997; 272: 12468–74.

- Manning-Cela R, Marquez C, Franco E, Talamas-Rohana P, Meza I. BFA-sensitive and insensitive exocytic pathways in *Entamoeba histolytica* trophozoites: their relationship to pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2003; 5(12): 921-32.
- Mares RE, Magaña PD, Meléndez-López SG, Licea AF, Cornejo-Bravo JM, Ramos MA. Oxidative folding and reductive activities of *EhPDI*, a protein disulfide isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int.* 2009; 58(3): 311-3.
- Mares RE, Meléndez-López SG, Ramos MA. Acid-denatured green fluorescent protein (GFP) as model substrate to study the chaperone activity of protein disulfide isomerase. *Int J Mol Sci.* 2011;12(7): 4625-36.
- Müller-Esterl W. *Bioquímica: fundamentos para medicina y ciencias de la vida.* Editorial Reverté, 2008.
- Okochi M, Matsuzaki H, Nomura T, Ishii N, Yohda M. Molecular characterization of the group II chaperonin from the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Extremophiles.* 2005; 9: 127–34.
- Ortiz-Ortiz L, Rosales-Borjas DM. Amibiasis: Aspectos relevantes de la respuesta inmunitaria y del diagnóstico de laboratorio. *Rev Méd Ext Port ULA,* 2007; 1 (1): 45-54.
- Patury S, Miyata Y, Gestwicki JE. Pharmacological targeting of the Hsp70 chaperone. *Curr Top Med Chem.* 2009; 9(15):1337-51.
- Pfaffenbach KT, Lee AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Curr Opin Cell Biol.* 2011; 23(2): 150-6.
- Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, De León M del C, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C. High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(1): 87-91.
- Ramos MA, Mares RE, Magaña PD, Rivas ID, Meléndez-López SG. *Entamoeba histolytica*: biochemical characterization of a protein disulfide isomerase. *Exp Parasitol.* 2011; 128(1): 76-81.
- Ramos MA, Mercado GC, Salgado LM, Sanchez-Lopez R, Stock RP, Lizardi PM, Alagón A. *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 88 (1-2): 225-35.

- Ramos MA, Sanchez-Lopez R, Mares RE, Olvera F, Alagón A. Identification of an *Entamoeba histolytica* gene encoding a protein disulfide isomerase that functionally complements the *dsbA* mutation in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005; 143(2): 236-40.
- Rapoport TA. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science*. 1992; 258(5084): 931-6.
- Sadava D, Heller G, Orians G, Purves W, Hillis D. VIDA: la ciencia de la biología. Octava Edición, Editorial Médica Panamericana, 2009.
- Salgado M, Villagómez-Castro JC, Rocha-Rodríguez R, Sabanero-López M, Ramos MA, Alagón A, López-Romero E, Sánchez-López R. *Entamoeba histolytica*: biochemical and molecular insights into the activities within microsomal fractions. *Exp Parasitol*. 2005; 110(4): 363-73.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sánchez R, Saralegui A, Olivos-García A, Scapolla C, Damonte G, Sanchez-Lopez R, Alagón A, Stock RP. *Entamoeba histolytica*: intracellular distribution of the sec61alpha subunit of the secretory pathway and down-regulation by antisense peptide nucleic acids. *Exp Parasitol*. 2005; 109(4): 241-51.
- Sanchez-Lopez R, Gama-Castro S, Ramos MA, Merino E, Lizardi PM, Alagón A. Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. *Mol Biochem Parasitol*. 1998; 92(2): 355-9.
- Sánchez-López R, Gutiérrez A, Juárez P, Olvera A, Olvera F, Ramos MA, Sánchez R, Saralegui A, Stock RP, Alagón A. Molecular genetics of the secretory pathway in *Entamoeba histolytica*: an overview. *Arch Med Res*. 2000; 31(4): S151-2.
- Santi-Rocca J, Smith S, Weber C, Pineda E, Hon CC, Saavedra E, Olivos-García A, Rousseau S, Dillies MA, Coppée JY, Guillén N. Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanism is activated in *Entamoeba histolytica* upon treatment with nitric oxide. *PLoS One*. 2012; 7(2): e31777.
- Scheibel T, Weikl T, Buchner J. Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(4): 1495-9.

- Schlieker C, Bukau B, Mogk A. Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol.* 2002; 96(1): 13-21.
- Smith DF, Whitesell L, Katsanis E. Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol Rev.* 1998; 50(4): 493-514.
- Spinozzi F, Mariani P, Rustichelli F, Amenitsch H, Bennardini F, Mura GM, Coi A, Ganadu ML. Temperature dependence of chaperone-like activity and oligomeric state of alphaB-crystallin. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1764(4): 677-87.
- Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2004; 101(3): 227-57.
- Stanley SL Jr, Reed SL. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 280(6): G1049-54.
- Turner MD, Rennison ME, Handel SE, Wilde CJ, Burgoyne RD. Proteins are secreted by both constitutive and regulated secretory pathways in lactating mouse mammary epithelial cells. *J Cell Biol.* 1992; 117(2): 269-78.
- Wang L, Hu ZJ, Luo YM, Huo YW, Ma Q, He YZ, Zhang YY, Sun F, Dong ZY. Distinct symmetry and limited peptide refolding activity of the thermosomes from the acidothermophilic archaea *Acidianus tengchongensis* S5(T). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 393: 228–34.
- Ward WW, Bokman SH. Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry.* 1982; 21: 4535–40.
- Wiser MF. Protozoa and Human Disease. Garland Publishing, 2010.
- Ximénez C, Morán P, Ramon F, Ramiro M. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Med Int Mex* 2007; 23(5): 398-407.
- Yon JM, Betton JM. Protein folding in vitro and in the cellular environment. *Biol Cell.* 1991; 71(1-2): 17-23.
- Yoshida T, Kawaguchi R, Taguchi H, Yoshida M, Yasunaga T, Wakabayashi T, Yohda M, Maruyama T. Archaeal group II chaperonin mediates protein folding in the cis-cavity without a detachable GroES-like co-chaperonin. *J. Mol. Biol.* 2002; 315: 73–85.

- Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(10): 781-91.
- Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, Stanley SL Jr. Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infect Immun.* 2004; 72(2): 678-83.
- Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996; 236(2): 302-8.

ANEXO. Tablas de resultados

Tabla 2. Valores obtenidos (A_{650}) del análisis protección a la agregación de la cadena B de insulina.

Tiempo (min)	EhBIP [μ M]									
	0.0		0.5		1.0		2.0		4.0	
	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000	0.000	0.000	0.001	-0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001
10	0.000	0.001	-0.001	0.001	-0.002	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001
15	0.003	0.003	0.008	0.003	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001
20	0.015	0.011	0.033	0.008	0.021	0.005	0.016	0.004	0.011	0.004
25	0.040	0.014	0.059	0.012	0.041	0.009	0.030	0.006	0.027	0.006
30	0.070	0.014	0.081	0.013	0.063	0.010	0.047	0.007	0.038	0.007
35	0.097	0.012	0.096	0.013	0.076	0.011	0.054	0.007	0.043	0.007
40	0.122	0.010	0.109	0.013	0.089	0.012	0.058	0.010	0.046	0.008
45	0.135	0.008	0.119	0.014	0.097	0.011	0.058	0.010	0.041	0.007
50	0.152	0.007	0.121	0.013	0.106	0.011	0.055	0.012	0.046	0.011
55	0.151	0.005	0.121	0.011	0.104	0.009	0.067	0.008	0.061	0.008
60	0.157	0.005	0.122	0.011	0.106	0.009	0.068	0.007	0.062	0.009

Tabla 3. Porcentaje de protección a la agregación de la cadena B de insulina.

EhBIP [μ M]	Media	E.E.M.	% Protección (\pm E.E.M.)
0	0.157	0.006	0.0 \pm 5.6
0.5	0.122	0.006	22.1 \pm 5.4
1.0	0.106	0.005	32.5 \pm 5.2
2.0	0.062	0.003	60.4 \pm 4.5
4.0	0.056	0.005	64.5 \pm 5.0

Tabla 4. Valores obtenidos (UF) del análisis de renaturalización de GFP.

Tiempo (min)	EhBIP [μM]											
	0.5		1.0		2.0		3.0		4.0		6.0	
	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.304	0.046	1.161	0.194	2.384	0.188	0.714	0.093	1.526	0.174	2.957	0.369
2	0.635	0.087	2.116	0.338	4.133	0.332	1.355	0.158	2.820	0.310	4.895	0.539
3	0.908	0.116	2.824	0.438	5.426	0.423	1.849	0.200	3.692	0.392	6.294	0.665
4	1.132	0.161	3.470	0.554	6.325	0.501	2.295	0.249	4.507	0.486	7.325	0.749
5	1.288	0.204	3.958	0.618	7.100	0.516	2.650	0.290	4.983	0.521	8.023	0.791
6	1.446	0.252	4.343	0.686	7.500	0.580	2.945	0.321	5.276	0.521	8.443	0.834
7	1.533	0.281	4.603	0.714	7.774	0.613	3.153	0.325	5.588	0.561	8.693	0.864
8	1.704	0.332	4.870	0.777	8.042	0.624	3.340	0.352	5.753	0.593	8.932	0.916
9	1.791	0.371	5.041	0.823	8.154	0.652	3.466	0.370	5.897	0.602	9.027	0.953
10	1.893	0.423	5.145	0.839	8.217	0.648	3.547	0.375	5.829	0.569	8.987	0.973
11	1.971	0.446	5.268	0.866	8.200	0.670	3.623	0.391	5.823	0.586	8.896	0.982
12	2.116	0.503	5.368	0.895	8.173	0.685	3.687	0.394	5.826	0.569	8.884	1.026
13	2.256	0.513	5.471	0.929	8.191	0.687	3.778	0.404	5.788	0.578	8.795	1.036
14	2.399	0.547	5.559	0.949	8.119	0.721	3.834	0.406	5.742	0.572	8.781	1.017
15	2.534	0.574	5.613	0.966	8.064	0.743	3.886	0.411	5.729	0.571	8.674	1.043

Tabla 5. Valores de la constante de reacción (k , min^{-1}) de las cinéticas de renaturalización de GFP.

EhBIP [μM]	k	E.E.M.
0.5	0.107	0.044
1.0	0.210	0.031
2.0	0.229	0.051
3.0	0.342	0.047
4.0	0.360	0.040
6.0	0.416	0.062

Tabla 6. Valores obtenidos (UF) del análisis de renaturalización asistida de GFP en presencia de ATP.

Tiempo (min)	ATP [mM]							
	0.0		1.0		2.0		4.0	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	1.097	0.092	1.043	0.054	1.540	0.307	3.047	0.361
2	1.683	0.126	1.667	0.131	2.400	0.430	4.287	0.561
3	2.120	0.143	2.123	0.178	3.007	0.541	4.897	0.676
4	2.437	0.201	2.587	0.217	3.520	0.631	5.707	0.764
5	2.810	0.207	2.950	0.251	3.857	0.676	6.313	0.799
6	3.053	0.226	3.203	0.289	4.153	0.712	6.717	0.834
7	3.303	0.279	3.493	0.341	4.407	0.762	7.120	0.861
8	3.473	0.280	3.693	0.375	4.703	0.762	7.487	0.926
9	3.713	0.258	3.867	0.377	4.893	0.761	7.733	0.939
10	3.933	0.302	3.973	0.365	5.080	0.807	7.907	0.928
11	4.007	0.304	4.160	0.441	5.317	0.817	8.137	0.972
12	4.097	0.326	4.320	0.436	5.443	0.827	8.233	0.985
13	4.273	0.289	4.407	0.451	5.643	0.850	8.433	0.966
14	4.373	0.320	4.447	0.447	5.773	0.856	8.470	0.981
15	4.533	0.307	4.667	0.430	5.973	0.862	8.607	0.972