



---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

**La proteína disulfuro isomerasa amibiana  
de 38 kDa (*EhPDI p38*) facilita el  
plegamiento oxidativo de proteínas  
en el periplasma de *Escherichia coli***

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A

**Alexis Zarahy Minchaca Acosta**

Tijuana, B. C.

Septiembre de 2013.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Tijuana, Baja California  
Septiembre/13

**C. ALEXIS ZARAHY MINCHACA ACOSTA**

Pasante de Químico Farmacobiólogo

Presente

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

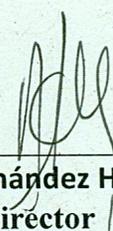
TESIS

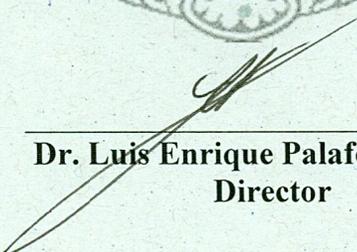
Es propuesto por el **DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA** quién será responsable de la calidad de trabajo que usted presenta, referido al tema:

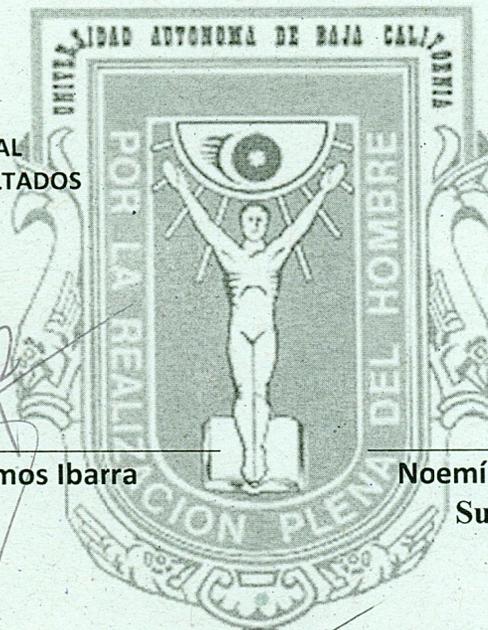
***“La proteína disulfuro isomerasa amibiana de 38 kDa (EhPDI p38) facilita el plegamiento oxidativo de proteínas en el periplasma de Escherichia coli”***, el cual deberá desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- 1.- INTRODUCCION
- 11.- ANTECEDENTES
- 111.- PARTE EXPERIMENTAL
- 1V.- DISCUSION DE RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFIA

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Noemí Hernández Hernández  
Sub- Director

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Enrique Palafox Maestre  
Director



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

Bajo la Dirección y Tutoría del  
DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento de  
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
(Financiamiento 155714, Fondo Sectorial SEP-CONACYT 2010 para Ciencia Básica)  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
(Financiamiento 3868, 15a. Convocatoria de Apoyo a Proyectos de Investigación)

## **Dedicatoria**

### *A mis abuelitos Minchaca*

Abuelita Martha, con todo mi cariño desde aquí hasta en donde quiera que te encuentres. Abuelito Toño, porque eres un ejemplo de perseverancia y dedicación, porque eres cómplice en todas mis locuras.

### *A mis abuelitos Acosta*

Abuelita Oli y abuelito Enrique, porque no recuerdo una sola ocasión en la que hayan dejado de demostrar su interés en mi formación. Este logro también es suyo, gracias!

### *A mi profe Marco*

Porque sus consejos, enseñanzas, regaños, avisos y todo el tiempo invertido hicieron este sueño posible. Por alentarme, con su ejemplo, a seguir en el camino de la ciencia, tener sed de conocimiento y buscar siempre la superación.

## Agradecimientos

Después de todo el trabajo y jalones de cabello para terminar esta tesis, por fin ha quedado completa.

Primeramente, agradezco a **Diosito** por todas las bendiciones con las que me llena día a día.

Al **Dr. Marco**, por ser mi padre en la investigación, por haber creído en mí hace 3 años y por la confianza brindada para ser parte de sus proyectos. Gracias por todo el tiempo invertido en esta tesis.

A **mi papá, Alejandro**, gracias por ser mi mejor ejemplo de perseverancia y tenacidad y por dejarme la mejor herencia: mi educación (obviamente, gracias por todo lo que le has invertido, jijiji!!). A **mi mamita hermosa, Selene**, gracias por ser siempre un apoyo para mí y por regañarme cuando no me ponía a escribir. **Ambos**, gracias por la confianza que depositan en mí, por dejarme soñar e impulsarme a cumplir esos sueños.

A **mi familia: Pax**, por toda la presión que me diste para escribir y la foto que publicaste cuando me dormí “haciendo la tesis”; **Gusana**, por ser mi hermana, por tu confianza y por escucharme horas y horas hablar de este proyecto; **Abuelito precioso**, gracias por TODO, te amo con todo mi corazón; “**Los Feres**”, porque su apoyo ha sido muy importante para mí y mi sanidad mental jaja, gracias por ser como unos segundos padres; **Abuelita Oli**, por recordarme la importancia de culminar esta etapa cada que tienes oportunidad; y, **tía Dalila**, por estar siempre lista con la matraca para echarme porras.

A **mis amigos de toda la vida: Gemis**, tantos años y sigues soportándome, gracias por tu amistad incondicional y por estar segura de que algún día ganaré un Nobel, jajaja, te amo! GNT4E. **Carlitos, Toshiro, Smith, Eusebi, Mini, Macho, Camisa Abierta, Ruly, Marina, Lorena, BALSS, Robertito, Kallen**, por estar siempre ahí, por dejarme parlotear sobre mi tesis muchísimas veces, por las ocasiones que me perdonaron no salir con ustedes el fin, y por las otras que me obligaron a salir (para mantenerme cuerda, jaja). **Ricardo**, mil gracias por el café!!.

A **Jonathan, Paola, Rose de mi vida y Luis Angel**... jajaja, definitivamente GRACIAS, saben lo que significan para mí.

A **Andrea, Ale, Chava, Rivas, Roger, Laura, y Ramón**, por todos los momentos que hemos compartido como familia de biotecnólogos y por permitirme aprender de ustedes.

A **los bichiparties**, por el mejor verano de mi vida, dos meses haciendo ciencia. **Héctor S. y Diego**, por todos sus consejos y apoyo para esta tesis.

A **la familia Ramos Mares**, por permitirme ser parte de ellos, por todas las experiencias vividas y los consejos, tanto profesionales como personales que me han dado. **Dra. Rosy**, muchas gracias por su apoyo incondicional.

A mis sinodales, **Dr. Marco, Dra. Rosy, Dr. Sam y M.C. Ale**, por el tiempo invertido para la revisión de este documento y sus acertados consejos.

Gracias infinitas a **TODOS** los que compartieron esta experiencia conmigo, jamás terminaría de enlistarlos, pero están siempre en mi corazón.

## Tabla de Contenido

Índice de Figuras.....	8
Índice de Tablas .....	9
Abreviaturas.....	10
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. <i>Entamoeba histolytica</i> y amibiasis .....</b>	<b>12</b>
1.1.1. Amibiasis como problema de salud pública.....	12
1.1.2. <i>E. histolytica</i> y ciclo biológico.....	13
1.1.3. Patogenia celular y molecular de la amibiasis.....	16
1.1.4. Diagnóstico y tratamiento de la amibiasis.....	18
<b>1.2. Biosíntesis, plegamiento y secreción de proteínas en eucariotas.....</b>	<b>20</b>
1.2.1. Expresión y biosíntesis de proteínas .....	20
1.2.2. Plegamiento de proteínas .....	21
1.2.3. Plegasas y chaperonas moleculares.....	22
1.2.4. Secreción de proteínas .....	23
1.2.5. Plegamiento de proteínas y patologías en humanos .....	25
<b>1.3. PDI como proteína multifuncional .....</b>	<b>26</b>
1.3.1. PDI de mamíferos como modelo.....	26
1.3.2. PDI como ditiol/disulfuro oxidoreductasa .....	27
1.3.3. PDI como chaperona molecular .....	29
1.3.4. PDI de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	30
<b>1.4. <i>Escherichia coli</i> como modelo para el estudio del plegamiento de proteínas.....</b>	<b>31</b>
1.4.1. <i>E. coli</i> : un procariota modelo .....	31
1.4.2. Compartimientos celulares y el plegamiento de proteínas .....	32
1.4.3. Maquinaria de plegamiento de proteínas .....	33
1.4.4. DsbA como disulfuro oxidasa.....	34
1.4.5. DsbC como disulfuro isomerasa .....	36
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>2.1. Hipótesis.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2. Objetivo general .....</b>	<b>39</b>
<b>2.3. Objetivos específicos .....</b>	<b>39</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Reactivos biológicos y químicos .....</b>	<b>41</b>
3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos.....	41
3.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos .....	41
3.1.3. Estuches comerciales .....	42

3.1.4. Células y medios de cultivo .....	42
3.1.5. Plásmidos .....	43
<b>3.2. Equipo y programas computacionales .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3. Protocolos generales.....</b>	<b>45</b>
3.3.1. Mantenimiento y preservación de las células bacterianas .....	45
3.3.2. Preparación de células competentes para choque térmico .....	45
3.3.3. Transfección bacteriana mediante choque térmico .....	46
3.3.4. Amplificación de genes mediante la técnica de PCR.....	46
3.3.5. Expresión de proteínas a mini-escala .....	47
3.3.6. Mini-preparación de proteínas totales solubles en condiciones nativas .....	47
3.3.7. Cuantificación de proteínas.....	48
<b>3.4. Actividad isomerasa de <i>EhPDI</i> p38 usando AppA como sustrato.....</b>	<b>49</b>
3.4.1. Transfección de las cepas BW25113 y JW2861-1 con pBAD:AppA .....	49
3.4.2. Transfección de la cepa JW2861-1 con pBPelB: <i>EhPDI</i> .....	49
3.4.3. Ensayo de actividad de fosfatasa ácida .....	50
<b>3.5. Actividad oxidoreductasa de <i>EhPDI</i> p38 usando <i>EhCHIT</i> como sustrato .....</b>	<b>51</b>
3.5.1. Transfección de las cepas BW25113, MRB10, MRB20 y MRB13 con pBAD:PeI <i>EhCHIT</i> 84.....	51
3.5.2. Transfección de la cepa MRB10 con pBPelB: <i>EhPDI</i> .....	51
3.5.3. Ensayo de actividad quitinolítica .....	52
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. <i>EhPDI</i> p38 exhibe las características estructurales de una proteína activa .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2. AppA es dependiente de la actividad isomerasa de DsbC .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3. <i>EhPDI</i> p38 exhibe actividad isomerasa en el periplasma de la mutante dsbC de <i>E. coli</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4. La actividad isomerasa es atribuible principalmente al dominio N- tiorredoxina de <i>EhPDI</i> p38 .....</b>	<b>58</b>
<b>4.5. La quitinasa amibiana se expresa activa en el periplasma de <i>E. coli</i> .....</b>	<b>61</b>
<b>4.6. La quitinasa amibiana (<i>EhCHIT</i>) es dependiente del plegamiento oxidativo en el periplasma de <i>E. coli</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>4.7. La enzima <i>EhCHIT</i> es dependiente de la actividad oxidasa de <i>EhPDI</i> p38 .....</b>	<b>65</b>
<b>4.8. El dominio tiorredoxina N-terminal de <i>EhPDI</i> p38 es importante para la actividad oxidasa .....</b>	<b>66</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>71</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	15
Figura 2. Esquematación de la vía de secreción de proteínas.....	23
Figura 3. Representación esquemática de la proteína <i>EhPDI</i> p38.....	30
Figura 4. Mecanismo propuesto de oxidación por DsbA para la formación de enlaces disulfuro.....	35
Figura 5. Mecanismo de acción de DsbC para el rearreglo de enlaces disulfuro en sustratos mal plegados.....	37
Figura 6. Análisis de expresión de la proteína AppA (fosfatasa ácida) en la cepa BW25113 ( <i>dsbA</i> <sup>+</sup> <i>dsbC</i> <sup>+</sup> ) portadora de pBAD:AppA.....	54
Figura 7. Análisis de expresión de la proteína AppA (fosfatasa ácida) en las cepas BW25113 ( <i>dsbC</i> <sup>+</sup> ) y JW2861-1 ( <i>dsbC</i> <sup>-</sup> ) portadoras de pBAD:AppA.....	55
Figura 8. Análisis de expresión de la proteína AppA (fosfatasa ácida) en las cepas BW25113 ( <i>dsbC</i> <sup>+</sup> ) y JW2861-1 ( <i>dsbC</i> <sup>-</sup> ) portadoras de pBAD:AppA. Adicionalmente, la cepa JW2861-1 ( <i>dsbC</i> <sup>-</sup> ) fue co-transfectada con pBPelB: <i>EhPDI</i> ( <i>EhPDI</i> p38) o pBluescript SK- (vector).....	57
Figura 9. Análisis de expresión de la proteína AppA (fosfatasa ácida) en la cepa JW2861-1 ( <i>dsbC</i> <sup>-</sup> ) portadora de pBAD:AppA y co-transfectada con pBluescript SK- (vector), pBPelB: <i>EhPDI</i> (wt) o sus variantes pRMXX (05-10, y 15).....	59
Figura 10. Análisis de expresión de la proteína <i>EhCHIT</i> (quitinasa amibiana) en la cepa BW25113 (silvestre, <i>dsbA</i> <sup>+</sup> <i>dsbC</i> <sup>+</sup> ) portadora de pBAD33 (vector) o pBAD:PeI <i>EhCHIT</i> 84 ( <i>EhCHIT</i> ).....	62
Figura 11. Análisis de expresión de la proteína <i>EhCHIT</i> (quitinasa amibiana) en la cepa BW25113 (silvestre), MRB10 ( <i>dsbA</i> <sup>-</sup> ), MRB20 ( <i>dsbC</i> <sup>-</sup> ) y MRB13 ( <i>dsbA</i> <sup>-</sup> <i>dsbC</i> <sup>-</sup> ) portadoras de pBAD:PeI <i>EhCHIT</i> 84.....	63
Figura 12. Análisis de expresión de la proteína <i>EhCHIT</i> (quitinasa amibiana) en la cepa MRB10 ( <i>dsbA</i> <sup>-</sup> ) portadora de pBAD:PeI <i>EhCHIT</i> 84 y co-transfectada con pBPelB: <i>EhPDI</i> ( <i>EhPDI</i> p38).....	65
Figura 13. Análisis de expresión de la proteína <i>EhCHIT</i> (quitinasa amibiana) en la cepa MRB10 ( <i>dsbA</i> <sup>-</sup> ) portadora de pBAD:PeI <i>EhCHIT</i> 84 y co-transfectada con pBPelB: <i>EhPDI</i> (wt) o sus variantes pRMXX (05-10, y 15).....	67

## Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en este estudio. ....	42
Tabla 2. Plásmidos utilizados. ....	44

## Abreviaturas

°C	Grados Celsius o centígrados
4-MUF-TAQ	4-metil-umberilferona triacetil-quitotriósido
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A <sub>nm</sub>	Absorbancia a X nanómetros
AppA	Fosfatasa ácida - Fitasa
AQE	Actividad quitinolítica específica
Ara	Arabinosa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica de bovino
CAT	Cloramfenicol acetiltransferasa
CHIT	Quitinasa
CP	Cisteína proteinasa
C-terminal	Carboxilo-terminal
C-Trx	Carboxilo-tiorredoxina
Cys	Cisteína
DO	Densidad óptica
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Ed</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>Eh</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Eh</i> CHIT	Quitinasa de <i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Eh</i> PDI	PDI de <i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Em</i>	<i>Entamoeba moshkovskii</i>
FSLBT	Fracción soluble del lisado bacteriano total
g, mg, µg, ng	Gramos, miligramos, microgramos, nanogramos

Gal/GalNAc	Galactosa/N-Acetilgalactosamina
Gly	Glicina
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactósido
kDa	Kilodaltones
L, mL, $\mu$ L	Litros, mililitro, microlitros
LB	Luria-Bertani
M, mM, $\mu$ M, nM	Molar, milimolar, micromolar, nanomolar
MCS	Sitio de clonaciones multiples
min	Minutos
N	Normal
nm	Nanómetros
N-terminal	Amino-terminal
N-Trx	Amino-tiorredoxina
p.e.	Por ejemplo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
pH	Potencial de hidrógeno
pNP	<i>p</i> -Nitrofenol
pNPP	Fosfato de <i>p</i> -nitrofenol
PPI	Peptidil prolil-( <i>cis/trans</i> )-isomerasa
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
Ser	Serina
TAC	Tomografía axial computarizada
Trx	Tiorredoxina
UF	Unidades de fluorescencia
uPA	Urocinasa
wt	Silvestre

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Entamoeba histolytica* y amibiasis

### 1.1.1. Amibiasis como problema de salud pública

Las enfermedades gastrointestinales siguen representando un problema de salud pública en todo el mundo. Los problemas causados por la amibiasis son un ejemplo de ello. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la amibiasis se define como una situación en la que el parásito *Entamoeba histolytica* se encuentra presente en un hospedero, con o sin manifestaciones clínicas. Albergado en el intestino grueso, el parásito tiene la capacidad de afectar a su portador, causándole desde molestias gastrointestinales, distensión abdominal, pérdida de peso y diarreas acuosas, hasta una disentería fulminante (caracterizada por evacuaciones líquidas muco-sanguinolentas), una colitis amibiana y, en el peor de los casos, un absceso hepático amibiano (que puede conducir a la muerte).

Aunque la amibiasis tiene una distribución cosmopolita, predomina en regiones tropicales, como el Oeste y Sudeste de África, el Centro y Sur de América, y el Centro de Asia. Especialmente en países en vías de desarrollo, donde los servicios públicos y las condiciones de higiene son carentes. A nivel mundial, la amibiasis se ubica el tercer lugar de las parasitosis más importantes. Algunos reportes indican que el 10% de la población mundial es portador de alguna especie de *Entamoeba*; sin embargo, se estima que sólo el 1% pudiera estar infectado con *E. histolytica*, ya que 9 de cada 10 portadores no

presentan síntomas, haciendo más difícil su detección y tratamiento [Ximénez, *et al.*, 2007].

México se considera un país endémico de amibiasis, estimándose que más del 5% de la población se infecta con el parásito cada dos años; además, estudios sero-epidemiológicos indicaron que el 8.4% de la población mexicana ha desarrollado anticuerpos anti-amibianos, evidenciando la prevalencia de la infección [Ximénez, *et al.*, 2007]. A pesar del descenso en la tasa de morbi-mortalidad de las enfermedades diarreicas en países subdesarrollados, en nuestro país la amibiasis sigue ubicándose dentro de las primeras veinte causas de morbilidad en la población.

Interesantemente, la amibiasis y su agente causal siguen siendo objeto de estudio en países desarrollados y en vías de desarrollo. Además de la inquietud científica que despierta el parásito como modelo de célula eucariota no convencional, la obtención de conocimiento que permita comprender su estilo de vida parasitario y sus mecanismos de infección orientará los esfuerzos hacia la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. Por otro lado, en países como el nuestro es imperante un cambio en el panorama socioeconómico, el cual conlleva a una mejora en las condiciones de salud y hábitos de higiene de la población más desfavorecida y susceptible a la infección.

#### 1.1.2. *E. histolytica* y ciclo biológico

El género *Entamoeba* está formado por organismos eucariotas unicelulares, conocidos coloquialmente como amibas. Como agentes causales de amibiasis en humanos se consideran las especies *histolytica*, *dispar* y *moshkovskii*. Morfológicamente, las tres especies son indistinguibles y, aunque pueden colonizar el intestino humano,

únicamente *E. histolytica* tiene capacidad de producir daño a su hospedero. Cabe resaltar que el humano es el único hospedero conocido para *E. histolytica* y *E. dispar*; además, se han reportado pocos casos de infecciones con *E. moshkovskii* (amiba de vida libre) [Ximénez, *et al.*, 2007].

*E. histolytica* es un organismo eucariótico unicelular atípico, caracterizado por presentar un citoplasma simple, carente de organelos y de algunas estructuras subcelulares típicas. Se han reportado genes mitocondriales y la presencia de mitosomas; sin embargo, no hay evidencia de la presencia del organelo como tal [Morf y Singh, 2012]. Además, a pesar de ser un organismo con una gran actividad secretora, tampoco se ha reportado la presencia de compartimientos endo-membranosos típicos, tales como el retículo endoplásmico y aparato de Golgi.

Durante su ciclo de vida, el parásito adopta dos estadios estables: quiste (forma infecciosa) y trofozoíto (forma invasiva). El quiste tetra-nucleado (8-20  $\mu\text{m}$ ) tiene una estructura circular, inmóvil, con una pared muy rígida, compuesta principalmente por quitina. Este estadio es eliminado en las heces de individuos con la parasitosis y es la forma transmisible (a través de bebidas y alimentos contaminados). Los quistes son sumamente resistentes a las condiciones del medio ambiente, ya que pueden sobrevivir durante 8 días en las heces a temperatura de congelación y soportar bajas concentraciones de cloro [Ximénez, *et al.*, 2007]. El trofozoíto mono-nucleado (15 y 20  $\mu\text{m}$ ) es pleomórfico y móvil, con proyecciones citoplásmicas denominadas pseudópodos. Este estadio se establece principalmente en el colon; sin embargo, en infecciones severas puede perforar el intestino e invadir otros órganos, siendo el hígado el más afectado.

Algunas veces pueden ser eliminados en las heces, pero resisten viables durante pocas horas fuera del hospedero, lo que dificulta su observación microscópica.

Como se esquematiza en la Figura 1, el ciclo de vida del parásito comienza con la ingestión del quiste tetra-nucleado a través de alimentos o bebidas contaminados; enseguida, éste recorre el tracto digestivo hasta llegar al intestino delgado, donde (por acción del pH alcalino) inicia el proceso de desenquistamiento. Interesantemente,

después de una división nuclear y una segregación citoplásmica, se liberan ocho trofozoítos mono-nucleares al íleon. Casi inmediatamente, los trofozoítos se adhieren al epitelio intestinal (mediante el reconocimiento de residuos de carbohidratos, presentes en la pared del colon), se empiezan a multiplicar (por fisión binaria), y se alimentan de restos celulares y bacterias (mediante fagocitosis), ocasionando la amibiasis intestinal [Willson, *et al.* 2012]. En aproximadamente 10 a 25 % de los casos, los trofozoítos erosionan la pared intestinal, ocasionando colitis amibiana, aumentando el riesgo de convertirse en amibiasis extra-intestinal [Ralston y Petri, 2011].

El ciclo de vida se cierra cuando los trofozoítos inician el proceso de enquistamiento, pasando por el estadio de metaquiste y, finalmente, apareciendo como

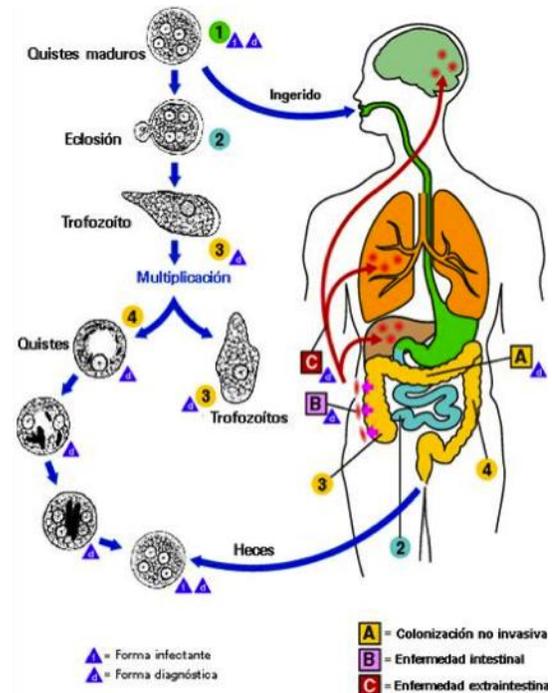


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

[Tomado de la página web del centro para el control y prevención de enfermedades de E.U.A, 2009.]

quistes inmóviles en las heces, permaneciendo viables hasta 8 días a 25 °C o hasta 30 días a 10 °C [Ximénez, *et al.* 2007].

### 1.1.3. Patogenia celular y molecular de la amibiasis

En su mayoría, los pacientes infectados con *E. histolytica* permanecen asintomáticos. Sin embargo, cuando la amibiasis es invasiva, es responsable de síntomas entéricos que van desde una disentería hasta una grave colitis [Salles, *et al.*, 2007]; en los casos de amibiasis extra-intestinal, el cuadro clínico empeora y puede ser fatal cuando no se detecta a tiempo. Algunos estudios han sugerido la existencia de factores genéticos, tanto del hospedero como del parásito, y medioambientales que condicionan las diferencias clínicas inter-individuales [Morf y Singh, 2012].

La patogenicidad de *E. histolytica* es atribuida a su capacidad de producir distintos factores de virulencia, algunos de los cuales están ausentes en *E. dispar*, entre los que figuran: la lectina de unión a galactosa y N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc), los amibaporos, las cisteína proteinasas (CP), y la peroxirredoxina.

*Lectina de unión a galactosa y N-acetilgalactosamina.* Es un heterodímero consistente de una cadena pesada (*hgl*, 170 kDa) y una ligera (*lgl*, 31-35 kDa) unidas por un enlace disulfuro [Ralston y Petri, 2011]. La lectina Gal/GalNAc está involucrada en el primer contacto de la amiba con el hospedero, pues participa en la unión entre el trofozoíto y la mucosa del colon [Vats, *et al.* 2005]. La cadena *hgl* reconoce residuos de carbohidratos, específicamente galactosa y N-acetilgalactosamina, presentes en la superficie de las células del colon, permitiéndole el anclaje [Huston, 2004]. También participa en la adhesión a bacterias, permitiendo que se lleve a cabo la citólisis [Wilson,

*et al.*, 2012]. Aún más, esta lectina tiene similitud con el antígeno CD59 humano, lo que permite a la amiba inhibir la formación del complejo C5b-C9 del complemento [Ximénez, *et al.*, 2007].

*Amibaporos.* Son péptidos que participan en la formación de poros en membranas de bacterias ingeridas o en las células del hospedero, lo que eventualmente llevará a una citólisis osmótica [Huston, 2004]. Para que se lleve a cabo la formación del poro, no es necesario un contacto célula-célula, es suficiente la cercanía del trofozoíto con su célula blanco [Wilson, *et al.*, 2012]. Además, se ha observado que muestran acción bactericida sobre gram positivas y efectos citotóxicos en células eucariotas [Ralston y Petri, 2011].

*Cisteína proteinasas.* Una vez establecidos en colon, el trofozoíto se abre paso desde la mucina hasta las células epiteliales y el torrente sanguíneo. Para tal propósito, el parásito cuenta con una familia de cisteína proteinasas (CP) que poseen la capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular, tal como la elastina, el colágeno, y la fibronectina [Salles, *et al.*, 2007]. Cuando las CP son secretadas se bloquea la polimerización de MUC2, el principal componente de la mucina del colon humano, facilitando el acceso de la amiba al epitelio del hospedero [Wilson, *et al.*, 2012]. Se han identificado más de 40 genes codificantes para CP en el genoma de *E. histolytica*, aunque su virulencia ha sido asociada principalmente a dos proteinasas: *EhCP1* y *EhCP5* [Huston, 2004]. Además, se ha observado que las CP pueden degradar tanto las anafilotoxinas C3a y C5a como las inmunoglobulinas IgA e IgG humanas, impidiendo la opsonización del trofozoíto [Ximénez, *et al.*, 2007].

*Peroxiirredoxina.* Al incorporarse a la circulación sanguínea, el ambiente rico en oxígeno somete al trofozoíto a un estrés oxidativo; además, algunas células del sistema

inmunológico responden a la invasión de *E. histolytica* mediante la liberación de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno [Wilson, *et al.*, 2012]. Para sobrevivir, la amiba ha desarrollado algunos mecanismos de evasión del estrés oxidativo, donde figura la producción de una peroxirredoxina de 29 kDa (*Ehp29*), la cual se localiza en la superficie celular, co-localizada con la lectina Gal/GalNAc, y es capaz de reducir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O [Nandi, *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2012].

#### 1.1.4. Diagnóstico y tratamiento de la amibiasis

En países no desarrollados, la búsqueda de quistes (mediante el examen microscópico) ha sido el método más rápido, sencillo y económico para la detección de *E. histolytica* en heces de humanos. Desafortunadamente, el método microscópico presenta muchas limitaciones: (i) no permite discernir entre quistes de *E. histolytica* y *dispar*, (ii) sólo detecta infecciones intestinales, y (iii) se requiere de personal altamente capacitado. Por lo tanto, estas limitaciones pueden conducir a una prescripción y un tratamiento inadecuado, los cuales podrían comprometer el estado de salud del paciente. Actualmente, el desarrollo y los avances científico-tecnológicos permiten distinguir entre *E. histolytica* y *E. dispar* mediante técnicas inmunoquímicas o moleculares.

1. *Técnicas inmunoquímicas.* Se ha reportado que el 70-90 % de los pacientes con una infección sintomática desarrolla anticuerpos anti-amibianos; sin embargo, en regiones donde la amibiasis es prevalente, se ha observado que los anticuerpos pueden permanecer en circulación hasta 5 años post-infección, siendo ésta la principal limitación de las técnicas inmunoquímicas [Haque, *et al.*, 2003]. Por tal motivo, la identificación puede ser muy específica y estrictamente de infecciones recientes sí se detectan

anticuerpos IgM anti-amibianos [Pritt y Clark, 2008]. Por otro lado, el inmunoensayo (ELISA) para la detección de la lectina Gal/GalNac es una prueba diagnóstica confiable, con una especificidad y sensibilidad reportada de 95 y 100%, respectivamente [Ximénez, *et al.*, 2007]. Además, la detección del antígeno solamente es posible cuando la infección es reciente [Pritt y Clark, 2008].

2. *Técnicas moleculares.* Sin lugar a duda, la prueba de PCR es la más sensible y específica de todas las técnicas moleculares. Actualmente, es ampliamente utilizada en la mayoría de los grupos de investigación y laboratorios de referencia [Pritt y Clark, 2008].

3. *Otras técnicas.* Para la detección del absceso hepático amibiano, la imagenología avanzada (como la tomografía axial computarizada, TAC) es el acercamiento más favorable para el diagnóstico; sin embargo, el ultrasonido ha sido el procedimiento de mayor elección (como resultado de su bajo costo), a pesar de que su nivel de detección específica es limitada [Ximénez, *et al.*, 2007]. Es importante destacar que estos procedimientos deben acompañarse de técnicas inmunoquímicas (ELISA) y moleculares (PCR) para confirmar el origen amibiano.

Una vez confirmada la infección es necesario iniciar el tratamiento, incluso en pacientes asintomáticos, ya que éstos representan un riesgo sanitario y la posibilidad de desarrollar síntomas posteriormente [WHO/PAHO/UNESCO report, 1997; Ximénez, *et al.*, 2007]. En casos donde se detecte sólo la presencia de *E. dispar*, no debe emplearse tratamiento farmacológico [Pritt y Clark, 2008].

La elección del tratamiento varía dependiendo el tipo de infección: (i) en casos de amibiasis intestinal no sintomática, se recomienda un anti-amibiano luminal, como la paromomicina, el furoato de diloxanida, o el yodoquinol (diyodohidroxiquinoleína)

[Ximénez *et al.*, 2007]; en tanto, (ii) para la amibiasis intestinal sintomática y extra-intestinal, el medicamento de elección es el metronidazol (por su eficiente absorción intestinal, excelente biodisponibilidad, y buena penetración a abscesos) [Pritt y Clark, 2008]. Aunque el 90 % de los pacientes reaccionan positivamente a metronidazol, entre 40 y 60 % no elimina por completo la infección intestinal, por lo que es recomendable continuar el tratamiento con un anti-amibiano luminal [Haque, *et al.*, 2003; Pritt y Clark, 2008].

## **1.2. Biosíntesis, plegamiento y secreción de proteínas en eucariotas**

### 1.2.1. Expresión y biosíntesis de proteínas

De forma general, el dogma central de la biología molecular sigue un flujo de información: ADN  $\rightarrow$  ARN  $\rightarrow$  Proteína. La biosíntesis de una proteína inicia con la transcripción de una secuencia de ADN codificante (en el núcleo), lo cual rendirá una molécula de ARN mensajero (ARNm). Posteriormente, el ARNm será transportado (hacia el citosol) y reconocido por el ribosoma. Finalmente, El ARNm será decodificado para obtener una proteína (traducción).

La biosíntesis de proteínas es un mecanismo bioquímico mediante el cual se incorpora un residuo de aminoácido a un polipéptido naciente, cada vez que se reconoce un codón (tres nucleótidos) en el ARNm que se está traduciendo. Esta elongación continúa hasta que se reconoce un codón de paro (señal de terminación). Para mayores detalles en el mecanismo de biosíntesis de proteínas, se recomienda una lectura altamente especializada [Watson, *et al.*, 2013].

### 1.2.2. Plegamiento de proteínas

Después de que la cadena polipeptídica ha sido obtenida (estructura primaria), ésta sufre un procesamiento bioquímico (plegamiento) hasta adoptar su estructura tridimensional nativa (estructura terciaria), la cual es importante para realizar su función biológica. Durante el plegamiento, el polipéptido puede experimentar un gran número de conformaciones estructurales; sin embargo, solamente una de ellas es correcta. Algunas proteínas tienen la capacidad de plegarse por sí mismas, incluso durante el proceso de biosíntesis. Sin embargo, la gran mayoría no cumple con este supuesto y requieren la ayuda de chaperonas moleculares (proteínas encargadas de facilitar el plegamiento nativo).

*1. Plegamiento en el citosol.* A pesar de ser un ambiente complejo, el citosol favorece en gran medida el plegamiento de las proteínas. Una proteína producida en el citosol debe ser protegida por chaperonas moleculares para evitar su degradación (por proteasas circundantes). En algunos casos, las chaperonas moleculares participan en el plegamiento a través de ciclos de unión y liberación [Young, *et al.*, 2004]. Además, el ambiente reductor del citosol dificulta la formación de enlaces disulfuro; en consecuencia, la mayoría de las proteínas citosólicas no los contienen.

*2. Plegamiento en el retículo endoplásmico.* Cuando un polipéptido requiere ser transportado a través de la vía de secreción, los ribosomas citosólicos son dirigidos hacia la membrana del RE y el polipéptido nascente es translocado hacia el lumen de este compartimiento. Este mecanismo es favorecido por el reconocimiento de un péptido señal, consistente de 15-60 residuos de aminoácidos (con al menos 8 aa. hidrofóbicos), en el extremo amino-terminal del polipéptido nascente [Park y Rapoport, 2012]. En el lumen

del RE, el polipéptido no plegado es recibido por la chaperona molecular BiP (de la familia de proteínas Hsp70), la cual evita la agregación y favorece el plegamiento de proteínas. Adicionalmente, el polipéptido puede sufrir dos modificaciones bioquímicas importantes para su función: (i) la formación de enlaces disulfuro, la cual es favorecida por el ambiente altamente oxidativo y la acción catalítica de la oxidoreductasa PDI (proteína disulfuro isomerasa) [Feige y Hendershot, 2011], y (ii) la adición de un bloque de azúcares (N-glicosilación), catalizada por el complejo oligosacaryltransferasa, lo cual aumenta la solubilidad de la proteína y funciona como sitio de unión para otras dos chaperonas moleculares: calnexina y calreticulina [Brodsky y Skach, 2011]. Habitualmente, el RE es un compartimiento temporal, ya que muchas proteínas serán transportadas hacia otros compartimientos o destinos finales (*p.e.* el aparato de Golgi o el ambiente extracelular).

### 1.2.3. Plegasas y chaperonas moleculares

Como es conocido, la mayoría de los polipéptidos no tienen la capacidad de adquirir su conformación nativa de forma espontánea y, por lo tanto, requieren la asistencia de otras proteínas, conocidas como plegasas y chaperonas moleculares [Gupta y Tuteja, 2011].

En el grupo de las plegasas se encuentran la PDI (proteína disulfuro isomerasa) y la PPI (peptidil prolil isomerasa), ambas son residentes del RE y encargadas de la formación/isomerización de enlaces disulfuro y la isomerización *cis/trans* de los enlaces peptídicos donde participan residuos de prolina, respectivamente, facilitando el

plegamiento y la estabilidad de la proteína [Maattanen, *et al.*, 2010; Gupta y Tuteja, 2011].

Las chaperonas son un grupo diverso de proteínas que se pueden localizar en diferentes compartimientos celulares, tales como el citosol, el RE o, incluso, el medio extracelular [Yerbury, *et al.*, 2005]. Las proteínas HSP (del inglés *Heat-Shock Proteins*, expresadas como respuesta al estrés térmico) representan al subgrupo más ampliamente estudiado [Hartl, 1996]. BiP (Hsp70), Hsp90 y Hsp104 regulan la síntesis proteica y evitan que las proteínas correctamente plegadas pierdan su estructura terciaria [Smith, *et al.*, 1998; Young *et al.*, 2004]. Otro subgrupo lo integran calnexina y calreticulina, ambas lectinas, que se unen a residuos de oligosacáridos presentes en polipéptidos no plegados, reteniéndolos en el RE hasta su plegamiento correcto [Young, *et al.*, 2004].

#### 1.2.4. Secreción de proteínas

El plegamiento de una proteína se inicia desde su producción en el citosol y finaliza cuando sale empaquetada del RE [Brodsky y Skach, 2011]. El tráfico de proteínas, de forma general, ocurre en el siguiente orden: retículo endoplásmico →

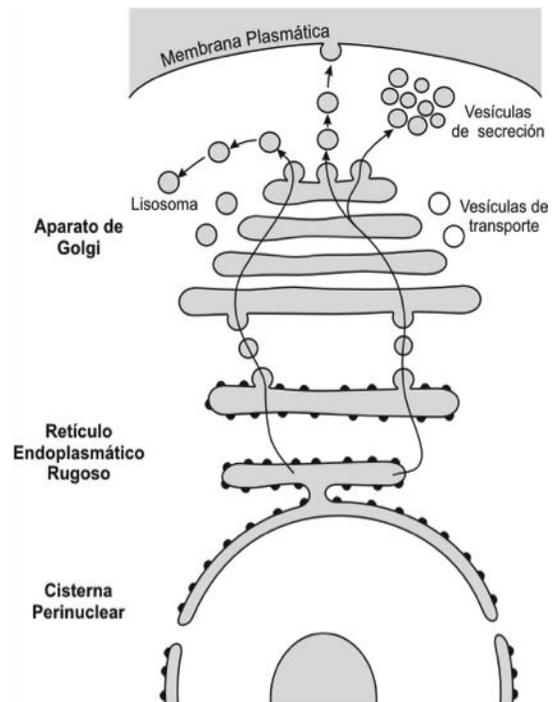


Figura 2. Esquematación de la vía de secreción de proteínas.

Iniciando en el RE hacia el *cis*-golgi, dentro de una vesícula; posteriormente, se fusiona con este compartimiento y comienza su maduración, avanzando hacia el *trans*-golgi, donde se distribuye hacia la membrana plasmática (secreción constitutiva), a vesículas de secreción (secreción regulada) o a formar parte de los lisosomas. [Tomado de Alberts, *et al.*, 2007]

aparato de Golgi → vesículas de secreción → medio extracelular (Figura 2).

En la primera etapa, el polipéptido nascente es translocado hacia el lumen del RE. En este compartimiento debe ser procesado y plegado; por lo tanto, sólo lo pueden abandonar aquellas que cumplen con los estándares de calidad (procesamiento y plegamiento correcto) [Alberts, *et al.*, 2007]. Para abandonar el RE, las proteínas son encapsuladas en vesículas cubiertas por la proteína COPII y transportadas hacia el aparato de Golgi (compartimiento subcelular consistente de sacos aplanados –cisternas–, clasificados como *cis*, *medial* y *trans*, en orden creciente de maduración): las vesículas salientes pueden fusionarse entre sí o con cisternas *cis* [Lodish, *et al.*, 2007].

En el complejo de Golgi, las proteínas residentes del RE (que fueron transportadas en el movimiento vesicular anterógrado) son reconocidas por el receptor ERD2, encapsuladas en vesículas cubiertas por la proteína COPI, y mediante un transporte vesicular retrógrado, se asegura de su retorno al RE [Majoul, *et al.*, 2001]. Por otro lado, cuando las proteínas siguen la vía de secreción (es decir, en tránsito por el complejo de Golgi), éstas pueden sufrir algunas modificaciones post-traduccionales: O-glicosilación y sulfatación.

Finalmente, una proteína madura que abandona el aparato de Golgi dentro de una vesícula, puede ser: (i) transportada de manera continua hacia la membrana plasmática y ser liberada hacia el espacio extracelular mediante exocitosis (secreción constitutiva); o (ii) almacenada y conservada en una vesícula intracelular en espera de una señal de liberación (secreción regulada). Además, algunas proteínas con actividad lítica (que participan en el sistema digestivo celular) se agrupan en una sección del Golgi y se

encapsulan en vesículas altamente especializadas, las cuales posteriormente se fusionarán y madurarán para formar lisosomas [Lodish, *et al.*, 2007].

#### 1.2.5. Plegamiento de proteínas y patologías en humanos

Existen factores que condicionan el correcto plegamiento de proteínas, algunos intrínsecos (errores de la transcripción o traducción) y otros extrínsecos (condiciones medioambientales). Las proteínas no plegadas son reconocidas por mecanismos intracelulares de control de calidad y generalmente son degradadas, ya sea por proteasas del RE o por el proteasoma (en el citosol). Sin embargo, cuando la velocidad de degradación de una proteína no plegada es superada por su velocidad de formación, se favorece la agregación y formación de depósitos proteicos [Yerbury, *et al.*, 2005].

La patología de muchas enfermedades en humanos se desarrolla por el efecto que tienen los agregados proteicos en la función celular: se consideran tóxicos y estimulan la apoptosis [Brodsky y Skach, 2001; Yerbury, *et al.*, 2005]. Por ejemplo, la osteogénesis imperfecta es causada por defectos en el plegamiento de la triple  $\alpha$ -hélice del colágeno tipo I, originando fragilidad y deformaciones óseas [Makareeva y Leikin, 2007]. En enfermedades neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer y Huntington, la acumulación de agregados proteicos lleva a la muerte neuronal en regiones específicas del cerebro [Smith, *et al.* 1998; Young, *et al.*, 2004]. Interesantemente, se ha observado una disminución en la producción de chaperonas moleculares activas, lo cual se ha asociado a estas condiciones [Merlini, *et al.*, 2011]. Por otro lado, en patologías como el cáncer también se ha observado un aumento en la expresión de chaperonas moleculares

(BiP) y plegasas (PDI), relacionando la expresión acelerada y excesiva de proteínas con la capacidad de adhesión y migración de la célula tumoral [Benham, 2012].

### **1.3. PDI como proteína multifuncional**

#### 1.3.1. PDI de mamíferos como modelo

La proteína disulfuro isomerasa de humano PDI es una enzima de 508 residuos de aminoácidos, perteneciente a la superfamilia de proteínas parecidas a tiorredoxina (Trx). Hasta la fecha, la familia PDI de humano está conformada por 21 polipéptidos, todos ellos relacionados por contener un dominio estructuralmente parecido a la proteína bacteriana tiorredoxina (el cual contiene el motivo CXXC, donde XX generalmente corresponden a residuos de glicina e histidina, respectivamente) [Galligan y Petersen, 2012].

Desde su descubrimiento, las PDI de mamíferos, incluyendo la homóloga de humano, han sido ampliamente estudiadas, tanto por su multifuncionalidad como por su relación con distintas patologías humanas. Estructuralmente, las PDI de mamíferos están conformadas por cuatro dominios Trx (dos dominios funcionalmente activos, a y a'; y dos inactivos, b y b') y un dominio c (localizado en el extremo C-terminal), rico en residuos ácidos seguidos de la secuencia KDEL (para la retención en el RE) [Kersteen y Raines, 2003; Galligan y Petersen 2012]. En su estructura tridimensional, la organización de los dominios (a, b, b', a' y c) forman una estructura tipo U, donde los dominios activos se ubican uno frente al otro [Heras, *et al.*, 2007].

Las PDI de mamíferos participan en el plegamiento de proteínas mediante la formación, ruptura y rearreglo de enlaces disulfuro, esto es posible gracias a su participación como oxidorreductasa en la oxidación de grupos tiol y la isomerización de enlaces disulfuro. Además, algunas enzimas PDI exhiben actividad como chaperona molecular independiente de su actividad oxidorreductasa [Fu y Zhu, 2010]; o bien, pueden participar como subunidades estructurales de complejos proteicos (*p.e.*, la proteína microsomal para transferencia de triglicéridos – MTP, la prolil 4-hidroxilasa – P4H, o la proteína de unión a hormonas tiroideas y estrógenos) [Fu, *et al.*, 2011; Hashida, *et al.*, 2011; Galligan y Petersen, 2012]. Por otro lado, PDI ha sido relacionada con los mecanismos de respuesta a proteínas no plegadas (*UPR*, *Unfolded Protein Response*) [Toldo, *et al.*, 2011] y de degradación proteica asociada al retículo endoplásmico (*ERAD*, *ER-Associated Protein Degradation*) [Maattanen, *et al.*, 2010].

### 1.3.2. PDI como ditiol/disulfuro oxidorreductasa

Se estima que una tercera parte de las proteínas eucarióticas requieren la formación de enlaces disulfuro para adquirir su conformación nativa [Galligan y Petersen, 2012], lo cual sugiere que éstos juegan un papel importante en la función proteica. Aunque algunas proteínas pueden adquirir su forma nativa de manera espontánea, en condiciones oxidorreductoras favorables, la mayoría requiere de la asistencia de una enzima para acelerar la formación y rearreglo de enlaces disulfuro: la PDI [Hatahet y Ruddock, 2009]. Dependiendo de las condiciones oxidorreductoras del medio ambiente, la PDI puede actuar como oxidasa o como isomerasa.

*Actividad Oxidasa.* La formación de enlaces disulfuro es un proceso que puede llevarse a cabo de forma espontánea, ya sea correcta o incorrectamente, aunque de forma muy lenta. Por su naturaleza covalente, tienen un efecto importante en la reducción de la entropía de la proteína no plegada [Feige y Hendershot, 2011]. En su función como oxidasa, la PDI se encarga de acelerar la velocidad de formación de los enlaces disulfuro en el ambiente oxidante del RE (tanto intra- como inter-moleculares); esta catálisis depende de la presencia del motivo CXXC en los dominios Trx activos [Ferrari y Söling, 1999]; donde los residuos de cisteína alternan entre la forma reducida y oxidada durante su ciclo catalítico [Hatahet y Ruddock, 2009]. Además, la mutación del residuo de cisteína localizado en el N-terminal del motivo catalítico conduce a una pérdida de la actividad oxidasa, debido primordialmente a que este residuo es altamente reactivo al pH fisiológico [Kersteen y Raines, 2003].

*Actividad Isomerasa.* Usualmente, una proteína posee una sola combinación de enlaces disulfuro y tioles libres en su conformación nativa [Hatahet y Ruddock, 2009]. Se ha observado que la oxidación de los grupos tiol de los residuos de cisteína ocurre conforme el polipéptido naciente ingresa al lumen del RE, tanto de forma espontánea como por la actividad oxidasa de la PDI [Feige y Hendershot, 2011]. Esto es, sí conformacionalmente un par de residuos de cisteína se ubican uno cercano al otro, la probabilidad de formar un enlace disulfuro incorrecto aumenta, favoreciendo una conformación terciaria alterada. Ante esta posibilidad, la PDI exhibe una actividad isomerasa (una combinación de sus actividades reductasa y oxidasa), la cual cataliza el rearrreglo de los enlaces disulfuro incorrectos y, por ende, asiste a la adopción de la estructura nativa de la proteína.

Existen dos posibles mecanismos de isomerización de enlaces disulfuro. Uno establece que la isomerización se lleva a cabo mediante dos reacciones acopladas de reducción y reoxidación independientes [Mamathambika y Bardwell, 2008]. Otro apoya un proceso de isomerización directa, donde se requiere de la formación un ión tiolato, en el grupo R del residuo de cisteína localizado en la posición N-terminal del motivo CXXC, el cual (mediante un ataque nucleofílico) forma un intermediario S-S con el sustrato, desencadenando una serie de cambios conformacionales que permiten al sustrato adoptar su conformación nativa [Kresteen y Raines, 2003].

Por otra parte, cabe mencionar que los dominios Trx no activos también participan en la isomerización, presumiblemente mediante el reconocimiento del sustrato no plegado correctamente [Byrne, *et al.*, 2009].

### 1.3.3. PDI como chaperona molecular

Adicionalmente a su función como oxidorreductasa, la PDI exhibe actividad como chaperona molecular. Como se comentó anteriormente, los dominios Trx inactivos participan en la unión a sustratos; además, cabe destacar que esta actividad es independiente de la función enzimática [Quan, *et al.*, 1995] y que los sustratos pueden o no contener enlaces disulfuro [Cai, *et al.*, 1994].

Una de las evidencias más claras de la función de PDI como chaperona molecular es su capacidad de asociarse con otras chaperonas, tal como calreticulina, calnexina, y BiP [Benham, 2012]. Además, está bien documentado que funciona adecuadamente como subunidad de otros complejos, como la prolil-4-hidroxilasa, donde es requerida para evitar la agregación de las subunidades  $\alpha$  de la enzima [Vuori *et al.*, 1992].

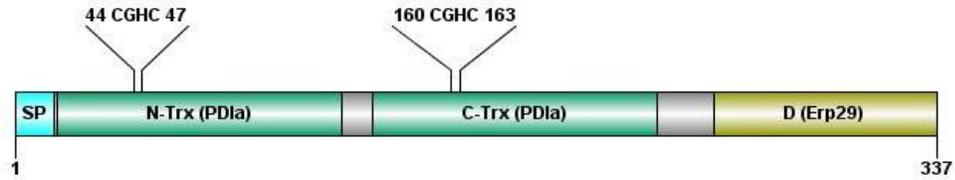


Figura 3. Representación esquemática de la proteína *EhPDI* p38.

Se muestran los dominios tiorredoxina (Trx) N- y C-terminal, señalando la posición específica de los motivos CGHC en cada dominio. Además en el extremo N-terminal aparece el péptido señal y en el C-terminal el dominio D. Esquema realizado utilizando el software DOG 1.0.

#### 1.3.4. PDI de *Entamoeba histolytica*

La primera evidencia molecular de una proteína PDI de *E. histolytica* fue reportada en el año 2000 [Ramos y Alagón, 2000]. Posteriormente, se demostró que el homólogo amibiano exhibe actividad oxidasa *in vivo*, utilizando a la bacteria *E. coli* como un modelo heterólogo [Ramos, *et al.*, 2005]. En otro estudio, basado en un análisis *in silico*, se demostró que *E. histolytica* contiene una familia PDI compuesta de 11 miembros, de los cuales al menos seis deberían exhibir actividad de oxidorreductora [Ramos, *et al.*, 2008]. Aunque el tamaño y la composición de dominios es variable, todos los homólogos PDI amibianos contienen al menos un dominio Trx activo [Ramos, *et al.*, 2008].

Por su alto nivel de expresión en el estadio de trofozoíto, la proteína amibiana PDI de 38 kDa (*EhPDI* p38) ha sido objeto de estudio tanto para la actividad oxidorreductasa como para la función como chaperona molecular [Ramos, *et al.*, 2005; Mares, *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2011]. *EhPDI* p38 posee dos dominios Trx activos (N- y C-Trx) y un dominio D (Erp29c) (Figura 3). Intrigantemente, no posee la señal de retención en el RE (K/HDEL), sugiriendo la existencia de un mecanismo alternativo de retención [Ramos, *et al.*, 2005].

Los estudios *in vivo* han demostrado que el residuo de cisteína localizado en el N-terminal del motivo CXXC de cada dominio Trx es importante para el repliegamiento oxidativo de la fosfatasa alcalina [Mares *et al.*, 2009]. Por otro lado, estudios de complementación funcional de la mutante letal  $\Delta$ PDI1 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* demostraron que *EhPDI* p38 tiene la capacidad de rescatar el fenotipo letal [Mares RE, Tesis Doctoral, 2009]. También se ha demostrado en distintos estudios *in vitro* que la enzima *EhPDI* p38 exhibe las actividades reductasa, oxidasa e isomerasa utilizando a insulina, lisozima y ribonucleasa como sustratos; de igual manera se determinó su función como chaperona molecular [Ramos, *et al.*, 2011].

Hasta el momento, poco se conoce sobre la actividad isomerasa *in vivo* de la enzima *EhPDI* p38 y su papel frente a sustratos homólogos (amibianos). Además, esta proteína ha sido considerada como un blanco farmacológico prometedor, principalmente por su importancia en el plegamiento de proteínas y su participación en la formación y rearreglo de los enlaces disulfuro. Esto es, si se priva al parásito de algunas proteínas o factores de virulencia esenciales, que dependan del correcto plegamiento oxidativo para adoptar adecuadamente su conformación nativa, se logrará alterar el estilo de vida del patógeno y se evitará la infección [Mares, *et al.*, 2009; Ramos, *et al.*, 2011].

#### **1.4. *Escherichia coli* como modelo para el estudio del plegamiento de proteínas**

##### 1.4.1. *E. coli*: un procarionta modelo

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y es un habitante natural del intestino humano. Probablemente es el

organismo mejor conocido, tanto a nivel genético-molecular como bioquímico-funcional [Mori, 2001]. Además, su genoma ( $4.6 \times 10^6$  pb) ha sido secuenciado completamente [Blattner, *et al.*, 1997].

Por otra parte, *E. coli* es fácil de mantener en cultivo, es capaz de crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y se duplica en aproximadamente 20 min (a 37 °C). Asimismo, su manipulación genética es sencilla, por lo que la selección, aislamiento y mantenimiento de mutantes es simple; aún más, muchos protocolos de laboratorio han sido establecidos utilizándola como referencia. En consecuencia, la bacteria *E. coli* es considerada como un organismo modelo para el estudio de diferentes procesos biológicos, tal como la expresión, plegamiento y secreción de proteínas [Choi y Lee, 2004; De Marco, 2009].

#### 1.4.2. Compartimientos celulares y el plegamiento de proteínas

A diferencia de una célula eucariota, las procariotas poseen un citoplasma mucho más simple. La biosíntesis de proteínas sucede principalmente en el citosol, único compartimiento bacteriano; sin embargo, su ambiente reductor dificulta el plegamiento oxidativo que algunas proteínas. *E. coli* soluciona este problema exportando esas proteínas al periplasma (compartimiento localizado entre las membranas interna y externa de bacterias gram negativas), donde predomina un ambiente oxidante [Choi y Lee, 2004; De Marco, 2009].

Por sus características como procariota modelo, *E. coli* es ampliamente utilizada en la producción de distintas proteínas, incluidas proteínas de organismos eucariotas que requieren de un ambiente oxidante para su plegamiento correcto. Cuando esto es

requerido, se debe colocar una señal de exportación en la proteína recombinante para asegurar su localización periplásmica y favorecer su plegamiento oxidativo [De Marco, 2009]. En algunos casos, se ha observado que la co-expresión de chaperonas y plegasas, tanto periplásmicas como citosólicas, contribuyen al plegamiento exitoso de la proteína recombinante [Fahnert, 2012].

#### 1.4.3. Maquinaria de plegamiento de proteínas

*Citosol.* Cuatro chaperonas son indispensables para el plegamiento de proteínas en el citosol: DnaK, DnaJ, GroEL y GroES [Houry, 2001]. Cuando se han sintetizado aproximadamente 50 aminoácidos de la proteína, las chaperonas DnaK y DnaJ son las primeras en unirse a ella impidiendo que se pliegue abruptamente [Kim, *et al.*, 2002]. Si el complejo DnaK/DnaJ no logra plegarla completamente, el polipéptido recién sintetizado es enviado al complejo GroEL/GroES [Madan *et al.*, 2008]. Se estima que aproximadamente 85 proteínas son sustratos obligados del complejo GroEL/GroES, de las cuales 13 son esenciales para la bacteria [Kerner, *et al.*, 2005].

Existen otras chaperonas moleculares (tipo Hsp) que permiten el replegamiento de proteínas que, en respuesta a estrés, han sido desplegadas. Un ejemplo de éstas es la proteína ClpB, homóloga de Hsp100 [Schlieker, *et al.*, 2002].

*Periplasma.* En bacterias gram negativas, como *E. coli*, varias proteínas tienen actividad en el espacio periplásmico, por lo que deben ser translocadas a través de la membrana interna para llegar a este compartimiento. La translocación proteica es un proceso co-traducciona l que requiere de la asistencia de chaperonas y plegasas periplásmicas [Sklar, *et al.*, 2007]. Proteínas como SurA, Skp y DegP son chaperonas

periplásmicas relacionadas con el plegamiento y ensamblaje de proteínas de membrana externa, evitando la formación de agregados y promoviendo el plegamiento proteico [Sklar, *et al.*, 2007; Weski y Ehrmann, 2012].

Adicionalmente, se han identificado algunas plegasas periplásmicas que aceleran la velocidad de plegamiento. El grupo de plegasas periplásmicas más abundante es la familia de proteínas Dsb, que participan en la oxidación y rearreglo de enlaces disulfuro [Weski y Ehrmann, 2012]. En *E. coli*, aproximadamente 300 proteínas que contienen múltiples residuos de cisteína son secretadas al periplasma, todas ellas son sustratos potenciales para la enzimas Dsb. A pesar de su importancia funcional, éstas no son esenciales para la viabilidad; sin embargo, las mutantes exhiben una diversa variedad de fenotipos [Kadokura y Beckwith, 2010]. A diferencia de la familia PDI, las proteínas Dsb bacterianas (denominadas DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, DsbG) son oxidoreductasas que participan independientemente en reacciones de oxidación, reducción e isomerización; inclusive algunas con actividad chaperona [Inaba, 2009; Kadokura y Beckwith, 2010].

#### 1.4.4. DsbA como disulfuro oxidasa

DsbA es una proteína periplásmica, monomérica y soluble, de 21 kDa [Mamathambika y Bardwell, 2008]. Pertenece a la superfamilia de las tiorredoxinas y posee un dominio activo caracterizado por el motivo estructural CPHC [Kadokura y Beckwith, 2010]. Estructuralmente, el dominio Trx contiene un motivo 'β $\alpha$ β' (N-terminal) ligado a otro 'β $\alpha$ β' (C-terminal) por un dominio  $\alpha$ -helicoidal (cuatro  $\alpha$ -hélices), el cuál protege a los residuos de cisteína del sitio activo (evitando su reducción) [Kadokura y Beckwith, 2010].

La principal actividad enzimática de DsbA es actuar como oxidasa; esto es, cataliza la formación de enlaces disulfuro entre los grupos tioles libres de dos residuos de cisteína consecutivos en una proteína. Para llevar a cabo esta función requiere que el motivo CPHC se encuentre en su estado oxidado. Durante la oxidación, el sitio activo se reduce; sin embargo, éste se regenera gracias a la transferencia de electrones a la proteína integral de DsbB, la cual a su vez los cede a la cadena respiratoria [De Marco, 2009]. A pesar de ser un mecanismo eficiente, DsbA comete errores durante la formación de enlaces disulfuro (apareamiento incorrecto de residuos de cisteína); además, es ineficiente como isomerasa, lo cual le impide corregir esos errores [Bessette, *et al.*, 2001].

Aunque habitualmente los enlaces disulfuro favorecen la estabilidad de proteínas, la forma oxidada de DsbA es más inestable que la forma reducida, lo que le

permite reaccionar rápidamente con proteínas no plegadas y reducidas. La reacción inicia con el reconocimiento del sustrato: DsbA se une a éstos mediante interacciones hidrofóbicas, específicamente de proteínas parcialmente plegadas, de manera similar a la función de las chaperonas, lo cual explica por qué es un mejor oxidante que moléculas pequeñas (como el glutatión oxidado) [Raina y Missiakas, 1997]. Además, el pKa del residuo N-terminal de cisteína es cercano a 3.0 y su potencial redox es aproximadamente -120 mV [Mamathambika y Bardwell, 2008; Kadokura y Beckwith, 2010].

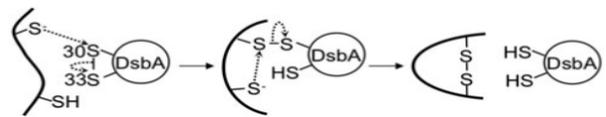


Figura 4. Mecanismo propuesto de oxidación por DsbA para la formación de enlaces disulfuro.

Inicialmente se forma un intermediario entre la oxidasa y la proteína reducida. Una cisteína libre de la proteína ataca al complejo, formando un nuevo enlace disulfuro en el sustrato y liberando a DsbA en su forma reducida [Kadokura y Beckwith, 2010].

Como se observa en la Figura 4, la catálisis del enlace disulfuro se lleva a cabo en dos pasos: Primero, se forma un enlace disulfuro intermediario inestable entre DsbA y el sustrato [Kadokura y Beckwith, 2010]; después, un grupo tiol (-SH) libre del sustrato ataca al enlace intermediario inestable, formando un enlace disulfuro estable y liberando a DsbA en su forma reducida [De Marco, 2009]. Cuando los genes *dsbA* o *dsbB* sufren mutaciones se observan errores en el plegamiento de proteínas y en la formación de enlaces disulfuro, por ejemplo de la  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa ácida o enterotoxinas, por mencionar algunas [Bardwell, *et al.*, 1991; Missiakas, *et al.*, 1993; Tan, *et al.*, 2005].

#### 1.4.5. DsbC como disulfuro isomerasa

Cuando un polipéptido naciente ingresa al periplasma, la proteína DsbA cataliza la formación rápida de los enlaces disulfuro, pero limitándose a residuos de cisteína consecutivos. Sin embargo, algunas proteínas requieren de la formación de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína que no son consecutivos y, por ende, es necesario hidrolizar los enlaces disulfuro oxidados incorrectamente y re-oxidarlos adecuadamente para lograr la conformación nativa [Rietsch, *et al.*, 1996].

En *E. coli*, la proteína encargada de esa isomerización de enlaces disulfuro es DsbC. Estructuralmente, DsbC es un homodímero en forma de 'Y' con dos enlaces disulfuro en cada monómero (de 20 kDa). El enlace disulfuro C-terminal (Cys140-Cys163) es requerido para su correcto plegamiento y la estabilidad, en tanto el N-terminal (Cys98-Cys101, catalítico) es requerido para la actividad isomerasa y mantenido en su forma reducida por la proteína integral DsbD [Berkmen, *et al.*, 2005].

Se ha propuesto que la estructura de DsbC presenta una superficie hidrofóbica en la cara interna, ideal para la unión al sustrato. A pesar de la flexibilidad que su estructura le confiere, la unión a sustrato es más específica, en comparación con DsbA, pues le permite distinguir sustratos con enlaces disulfuro incorrectos [Raina y Missiakas, 1997]. Al menos tres proteínas bacterianas periplásmicas han sido identificadas como dependientes de la actividad isomerasa DsbC: AppA (una fosfatasa ácida y fitasa), MepA (una mureína, o peptidoglicano, hidrolasa) y la RNAsa I (una ribonucleasa) [Hiniker y Bardwell, 2004; Beckmen, *et al.*, 2005; Heras, *et al.*, 2007].

Para la isomerización, los residuos de cisteína del sitio activo deben permanecer en un estado reducido, aún en el ambiente oxidante del periplasma [Bessette, *et al.*, 2001]. Además, su estructura le favorece, evitando (mediante impedimento estérico) la oxidación de su sitio activo [Kadokura y Beckwith, 2010]. Dos mecanismos han sido propuestos para explicar la isomerización. Como se observa en la Figura 5, ambos inician mediante el ataque nucleofílico

del residuo de Cys98 al enlace disulfuro incorrecto del sustrato, formando un enlace disulfuro intermediario inestable entre DsbC y el sustrato. Posteriormente, (A) el enlace intermediario es atacado por un residuo de cisteína del sustrato, formando un nuevo enlace

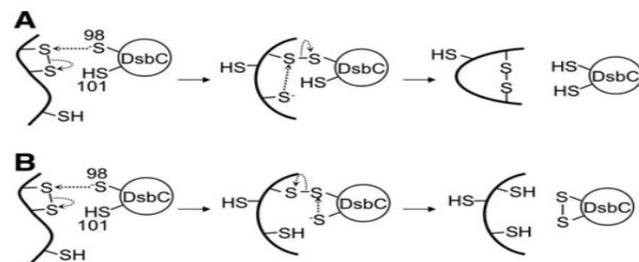


Figura 5. Mecanismo de acción de DsbC para el reordenamiento de enlaces disulfuro en sustratos mal plegados.

Aparecen esquematizadas las dos propuestas donde se forma un intermediario DsbC-sustrato una vez que la Cys98 del sitio activo de DsbC ataca el enlace disulfuro del sustrato. Posteriormente, en A, una tercer cisteína del sustrato libera a DsbC en su forma reducida y forma un nuevo enlace disulfuro. En caso de B, la Cys101 de DsbC es la encargada de liberar a la enzima en su forma oxidada y dejar al sustrato reducido, en espera de ser reoxidado por DsbA [Kadokura y Beckwith, 2010].

disulfuro estable y liberando a DsbC en su forma reducida; o bien, (B) el enlace intermediario es atacado por el residuo de Cys101 de DsbC, reduciendo al sustrato (el cual puede ser re-oxidado por DsbA) y liberando a DsbC en su forma oxidada (la cual es reducida por acción de la proteína DsbD). Cabe destacar que en el primer mecanismo funciona como isomerasa, en tanto que en el segundo actúa como una reductasa [Mamathambika y Bardwell, 2008; Kadokura y Beckwith, 2010]. Por otro lado, se ha observado que DsbC posee actividad como chaperona, independientemente de su actividad isomerasa/reductasa, lo cual explica la alta afinidad que muestra por sustratos incorrectamente plegados [Kadokura y Beckwith, 2010].

Interesantemente, la co-expresión de DsbC ofrece una ventaja en el plegamiento de proteínas recombinantes en *E. coli*. por ejemplo, la producción de la urocinasa murina activa (12 enlaces disulfuro) se ve afectada en mutantes que carecen de DsbC; Así mismo, el activador tisular de plasminógeno humano (17 enlaces disulfuro) no se produce a menos que DsbC también se sobre-exprese [Bessette, *et al.*, 2001].

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

La proteína disulfuro isomerasa de 38 kDa de *Entamoeba histolytica* (EhPDI p38) exhibe actividad oxidorreductasa y participa en el plegamiento oxidativo de proteínas sustrato de origen bacteriano (AppA, fosfatasa ácida) y amibiano (EhCHIT, quitinasa) en el periplasma de la bacteria *Escherichia coli*.

### **2.2. Objetivo general**

Demostrar la actividad oxidorreductasa de la proteína disulfuro isomerasa de 38 kDa de *Entamoeba histolytica* (EhPDI p38) mediante ensayos de complementación en mutantes de la bacteria *Escherichia coli* y análisis de actividad enzimática de proteínas sustrato para comprobar su papel funcional en mecanismos de plegamiento oxidativo.

### **2.3. Objetivos específicos**

1. Analizar la dependencia de la proteína AppA a la actividad isomerasa de la proteína DsbC mediante ensayos de expresión en el periplasma de una mutante *dsbC* de *E. coli* y la evaluación de su actividad enzimática.

2. Examinar la actividad isomerasa de la proteína *EhPDI* p38 mediante ensayos de complementación funcional de la mutante *dsbC*<sup>-</sup> de *E. coli* y recuperación de la actividad enzimática de la proteína AppA.
3. Valorar el papel funcional de los residuos de cisteína presentes en los dominios Trx de la proteína *EhPDI* p38 mediante un análisis mutagénico, ensayos de complementación funcional de la mutante *dsbC*<sup>-</sup> de *E. coli* y evaluación de la actividad enzimática de la proteína AppA.
4. Analizar la dependencia de la proteína *EhCHIT* a la actividad oxidasa o isomerasa de las proteínas DsbA y DsbC, respectivamente, mediante ensayos de expresión en el periplasma de mutantes *dsbA*<sup>-</sup> y/o *dsbC*<sup>-</sup> de *E. coli* y la evaluación de su actividad enzimática.
5. Examinar la actividad oxidasa o isomerasa de la proteína *EhPDI* p38 mediante ensayos de complementación funcional de la mutante *dsbA*<sup>-</sup> o *dsbC*<sup>-</sup> de *E. coli* y recuperación de la actividad enzimática de la proteína *EhCHIT*.
6. Valorar el papel funcional de los residuos de cisteína presentes en los dominios Trx de la proteína *EhPDI* p38 mediante un análisis mutagénico, ensayos de complementación funcional de la mutante *dsbA*<sup>-</sup> o *dsbC*<sup>-</sup> de *E. coli* y evaluación de la actividad enzimática de la proteína *EhCHIT*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos biológicos y químicos

##### 3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Los reactivos grado BM fueron adquiridos de distintos proveedores. *p*-Nitrofenol fosfato (*Calbiochem*). Agarosa y otros reactivos para electroforesis (*Biorad*). Ácido etilendiamino tetra-acético, Tris-base, e isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (*IBI*).

Ampicilina, acetato de sodio, L-arabinosa, bromuro de etidio, cloramfenicol, cloruro de calcio, cloruro de sodio, kanamicina, 4-metil-umbeliferil-( $\beta$ )-D-N,N',N''-tri-acetil-quitotriósido, reactivo de *Bradford* (*Sigma*).

Glicina (*MP Biomedicals*). Ácido clorhídrico y alcohol etílico (*Productos Químicos Monterrey*). Componentes de los medios de cultivo para bacterias: agar bacteriológico, extracto de levadura, y triptona (*Becton Dickinson*).

##### 3.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos

La enzima *Taq* ADN polimerasa (5 U/ $\mu$ L) y sus soluciones (amortiguador 10X y solución-Q 5X) fueron adquiridas de *Qiagen*.

La endonucleasa *HindIII* fue obtenida de *Fermentas*, en tanto *SacII* y la ADN ligasa del bacteriófago T<sub>4</sub> fueron de *New England Biolabs*.

### 3.1.3. Estuches comerciales

La purificación de productos de PCR fue realizada utilizando el estuche *QIAprep™ PCR Purification Kit*, la purificación de ADN plasmídico fue realizada usando el estuche *QIAprep™ Spin Miniprep Kit*, ambos de *Qiagen*. El estuche *CellLytic® B Plus Kit*, utilizado para la lisis celular y extracción soluble de proteínas totales en condiciones nativas, y el estuche *BCA Kit for Protein Determination*, usado para la cuantificación de proteínas, fueron obtenidos de *Sigma*.

### 3.1.4. Células y medios de cultivo

Durante el desarrollo del proyecto, se utilizaron diferentes cepas de *Escherichia coli*: (i) TOP10F', como hospedera en los ensayos rutinarios de clonación molecular, y (ii) BW25113 y sus derivadas, como hospederas en los ensayos de complementación funcional. Los genotipos, nomenclatura, fuente y referencia se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo	Nomenclatura oxidorreductora	Fuente [Referencia]
Top10F'	<i>F'</i> [ <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>Tn10</i> ( <i>Tet</i> <sup>R</sup> )] <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> ( <i>Str</i> <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> $\lambda$ <sup>-</sup>	-	Invitrogen
BW 25113	$\Delta$ ( <i>araD-araB</i> )567 $\Delta$ <i>lacZ</i> 4787( <i>::rrnB-3</i> ) $\lambda$ <sup>-</sup> <i>rph-1</i> $\Delta$ ( <i>rhaD-rhaB</i> )568 <i>hsdR</i> 514	<i>dsbA</i> <sup>+</sup> <i>dsbC</i> <sup>+</sup> ( <i>silvestre</i> )	CGSC <sup>1</sup> [Baba, <i>et al.</i> , 2006]
JW3832-2	BW25113 <i>AdsB</i> A723:: <i>kan</i>	<i>dsbA</i> <sup>-</sup>	CGSC <sup>1</sup> [Baba, <i>et al.</i> , 2006]
JW2861-1	BW25113 <i>AdsB</i> C744:: <i>kan</i>	<i>dsbC</i> <sup>-</sup>	CGSC <sup>1</sup> [Baba, <i>et al.</i> , 2006]
MRB10	BW25113 <i>AdsB</i> A723:: <i>frt</i> (derivada de JW3832-2)	<i>dsbA</i> <sup>-</sup>	LB-FCQI <sup>2</sup> [Ramos, 2013 <sup>*</sup> ]
MRB13	BW25113 <i>AdsB</i> A723:: <i>frt AdsB</i> C744:: <i>frt</i> (derivada de MRB10)	<i>dsbA</i> <sup>-</sup> <i>dsbC</i> <sup>-</sup>	LB-FCQI <sup>2</sup> [Ramos, 2013 <sup>*</sup> ]
MRB20	BW25113 <i>AdsB</i> C744:: <i>frt</i> (derivada de JW2861-1)	<i>dsbC</i> <sup>-</sup>	LB-FCQI <sup>2</sup> [Ramos, 2013 <sup>*</sup> ]

<sup>1</sup>CGSC, *Coli Genetic Stock Center* (Centro de Reserva Genética de *E. coli*, Universidad de Yale, EUA)

<sup>2</sup>LB-FCQI, Laboratorio de Biotecnología de la FCQI (UABC)

\*Datos no publicados, manuscrito en preparación.

Las cepas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB líquido: 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl; LB agar: LB líquido suplementado con 17 g/L de agar bacteriológico). Adicionalmente, para la selección de resistencia a antibióticos, las cepas fueron cultivadas en medio LB suplementado con ampicilina (0.150 mg/mL), cloramfenicol (0.015 mg/mL), kanamicina (0.025 mg/mL), o tetraciclina (0.015 mg/mL), en consideración de los requerimientos selectivos de la experimentación. La transformación bacteriana se realizó siguiendo un protocolo estándar de choque térmico [Sambrook, *et al.*, 1989]. Posteriormente, las células fueron recuperadas en medio enriquecido 2X YT (16 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl). Los medios de cultivo LB y 2X YT fueron preparados de acuerdo a los procedimientos estándar de laboratorio [Sambrook, *et al.*, 1989].

#### 3.1.5. Plásmidos

Los plásmidos utilizados, y sus características moleculares, se muestran en la Tabla 2. Todos los plásmidos fueron obtenidos de la reserva de productos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

### **3.2. Equipo y programas computacionales**

Las células bacterianas fueron cultivadas a 37° C y 300 rpm en una incubadora de ambiente y agitación controlada (*Incubator Shaker Series 25* de *New Brunswick Scientific Co.*). Las incubaciones en microtubos fueron realizadas utilizando un termobloque (VWR). Las fracciones celulares fueron separadas mediante centrifugación en una

microcentrífuga *MiniSpin<sup>®</sup> Plus* (Eppendorf). Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un equipo termociclador *Gradient Thermal Cycler Multigene* (Labnet International, Inc.). La visualización y digitalización de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se realizó con el fotodocumentador *Gel Doc<sup>TM</sup> 2000* (Biorad).

Tabla 2. Plásmidos utilizados.

Nombre	Características moleculares	Fuente
pBluescript SK(-)	Plásmido de clonación y expresión en bacteria. Contiene los orígenes de replicación f1 (bacteriófago) y ColE1 (bacteria). Expresa el gen que confiere resistencia a ampicilina ( $\beta$ -lactamasa). Contiene el promotor inducible por lactosa (Lac) y un sitio de clonaciones múltiples (MCS) que se encuentra interrumpiendo el gen <i>LacZ</i> (codificante para $\beta$ -galactosidasa).	<i>Stratagene</i>
pBPelB: <i>EhPDI</i>	Plásmido de expresión en bacteria. Derivado de pBluescript SK-. Contiene la secuencia codificante para el péptido maduro <i>EhPDI</i> fusionado al péptido señal de la proteína bacteriana PelB bajo el control del promotor Lac, lo que permite la expresión periplásmica inducida de la proteína disulfuro isomerasa de 38 KDa de <i>E. histolytica</i> ( <i>EhPDI</i> p38).	Ramos, <i>et al.</i> , 2005
pRMXX	Plásmidos de expresión en bacteria. Derivados de pBPelB: <i>EhPDI</i> . pRM05 contiene la variante SS/CC (C43S, C47S). pRM06 contiene la variante CC/SS (C160S, C163S). pRM07 contiene la variante SC/SC (C43S, C160S). pRM08 contiene la variante SC/CS (C43S, C163S). pRM09 contiene la variante CS/SC (C47S, C160S). pRM10 contiene la variante CS/CS (C47S, C163S). pRM15 contiene la variante SS/SS (C43S, C47S, C160S, C163S).	Mares, <i>et al.</i> , 2009
pBAD33	Plásmido de expresión en bacteria. Contiene el origen de replicación p15A (bacteria) y M13 (bacteriófago). Expresa el gen que confiere resistencia a cloramfenicol (CAT, cloramfenicol acetiltransferasa). Contiene el promotor inducible por arabinosa (araBAD) y el gen regulador <i>arac</i> y un sitio de clonaciones múltiples.	Guzmán, <i>et al.</i> , 1995.
pBAD:AppA	Plásmido de expresión en bacteria. Derivado de pBAD33. Contiene la secuencia codificante para el precursor de la proteína AppA bajo el control del promotor araBAD, lo que permite la expresión inducida y localización periplásmica de la proteína fitasa/fosfatasa ácida de <i>E. coli</i> .	Ramos, <i>et al.</i> , 2013. (Este estudio)
pBAD:PelB: <i>EhCHIT84</i>	Plásmido de expresión en bacteria. Derivado de pBAD33. Contiene la secuencia codificante para el péptido maduro <i>EhCHIT</i> fusionado al péptido señal de la proteína bacteriana PelB bajo el control del promotor araBAD, lo que permite la expresión inducida y localización periplásmica de la quitinasa de <i>E. histolytica</i> .	Ramos, <i>et al.</i> , 2013. (Este estudio)

Las lecturas de absorbancia en los micro-ensayos fueron registradas usando un lector de microplacas *Microplate Reader Model 680 (Sigma)*. Los ensayos colorimétricos fueron analizados utilizando el espectrofotómetro *SmartSpect™ Plus (Biorad)*. Los registros de fluorescencia en microplacas de titulación se realizaron usando el fluorómetro/luminómetro *Fluoroskan™ Ascent FL (Thermo Scientific)* controlado por el programa computacional *Ascent Software*. El programa de análisis bioestadístico *Graphpad™ Prism® v4.0* fue utilizado para el tratamiento de los datos. Además, hojas de cálculo de los paquetes computacionales *MS Office* y *Open Office* fueron utilizadas para el agrupamiento y análisis básico de los resultados.

### **3.3. Protocolos generales**

#### **3.3.1. Mantenimiento y preservación de las células bacterianas**

Todas las cepas se mantienen criopreservadas (-80 °C) en suspensión de glicerol al 15%. Los cultivos son amplificados en medio LB líquido suplementado con el antibiótico de selección (cloramfenicol a 0.015 mg/mL, ampicilina a 0.150 mg/mL, o kanamicina a 0.025 mg/mL).

#### **3.3.2. Preparación de células competentes para choque térmico**

La preparación de células competentes se realizó mediante una técnica estándar de laboratorio [Sambrook, *et. al.*, 2001]. La pastilla bacteriana de 1 mL de cultivo (DO<sub>600</sub> 0.4-0.5) fue obtenida mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 2 min. Inicialmente, la pastilla fue lavada con 0.5 mL de agua destilada estéril fría (para remover los restos de

medio de cultivo) y, posteriormente, con 0.5 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM estéril frío. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 0.1 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM estéril frío. Después de 5 min en hielo, las células están listas para la transfección mediante choque térmico.

### 3.3.3. Transfección bacteriana mediante choque térmico

1-5 µL de plásmido (0.1-10 ng) fueron mezclados con 0.1 mL de la suspensión de células competentes (en CaCl<sub>2</sub> 50 mM ) e incubados en hielo durante 30 min. El choque térmico fue realizado mediante dos cambios súbitos de temperatura: del hielo a 42 °C (1.5 min) y nuevamente al hielo (5 min). Las células fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de medio 2X YT e incubadas durante 1 h a 37 °C. Las transformantes estables fueron seleccionadas mediante sembrado en medio LB sólido suplementado con el antibiótico de selección. Típicamente, se sembró 1/10 de la suspensión celular en una caja de cultivo y el resto en otra.

### 3.3.4. Amplificación de genes mediante la técnica de PCR

Habitualmente, los genes fueron amplificados en una mezcla de reacción (50 µL) con la siguiente composición: solución amortiguadora 1X, solución-Q 1X, 0.2 mM de dNTPs, 20 pmoles de cada oligonucleótido (*forward* y *reverse*), 0.1-10 ng de ADN (plasmídico o genómico), y 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa. Las condiciones típicas de termociclado fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial (94 °C durante 2 min), seguido de 35 ciclos de amplificación exponencial (94 °C durante 15 seg, 55 °C durante 15 seg, 72 °C durante 1-2 min), y, finalmente, 1 ciclo de extensión final (72 °C durante 7 min).

Al finalizar, el producto de la amplificación fue mantenido a 12 °C hasta retirarlo del equipo.

### 3.3.5. Expresión de proteínas a mini-escala

Inicialmente, se preparó un cultivo joven (que será utilizado como semilla) inoculando 10 µL de una suspensión celular de bacterias, que portan el plásmido de interés, en 2 mL de medio líquido LB (suplementado con el antibiótico de selección) y el cultivo fue incubado durante la noche a 37 °C y 300 rpm. A la mañana siguiente, 2 mL de medio LB líquido (suplementado con el antibiótico de selección) fueron inoculados con 20 µL de cultivo joven (dilución 1:100) e incubados durante 2 h a 37 °C y 300 rpm. Enseguida, se añadió el inductor (IPTG 1 mM y/o arabinosa 0.2%: concentración final) y la expresión inducida fue promovida durante 4 h a 37 °C y 300 rpm. Finalmente, se prepararon pastillas celulares a partir de 1 mL del cultivo inducido mediante centrifugación (2 min a 10,000 rpm). El sobrenadante fue removido y la pastilla celular fue conservada en congelación hasta su análisis de expresión de proteínas.

### 3.3.6. Mini-preparación de proteínas totales solubles en condiciones nativas

La pastilla celular de 1 mL de cultivo fue descongelada a temperatura ambiente y resuspendida (mediante 15 s de agitación tipo vórtex) en 0.4 mL del reactivo *CellLytic*<sup>TM</sup> B. Enseguida, la extracción fue promovida mediante agitación orbital (moderada) durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la fracción insoluble fue separada mediante centrifugación (14,500 rpm durante 10 min). El sobrenadante (fracción soluble de proteínas totales) fue transferido a un microtubo estéril y conservado en refrigeración

hasta su análisis (concentración total de proteínas y evaluación de la actividad enzimática).

### 3.3.7. Cuantificación de proteínas

*Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA).* A partir de una solución concentrada (cuantificada) de BSA (*New England Biolabs*), se preparó una solución acuosa conteniendo 50 µg/mL de proteína.

*Curva estándar.* En 6 pocillos de una placa de micro-titulación, se prepararon diluciones acuosas (50 µL final) conteniendo 0, 10, 20, 30, 40, y 50 µg/mL de BSA.

*Muestra (proteínas solubles totales).* En 2 pocillos de una placa de micro-titulación, se prepararon diluciones acuosas (1:50 para Bradford y 1:25 para BCA) de las fracciones proteicas solubles totales (50 µL final).

*Micro-ensayo modificado de Bradford.* A cada pocillo, conteniendo solución estándar o muestra, se le agregaron 100 µL del reactivo de Bradford (*Sigma*) y se mezclaron inmediatamente (mediante pipeteo). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y posteriormente se registró la  $A_{595}$  y  $A_{450}$ . A partir de estos valores, la curva estándar fue obtenida graficando la relación  $A_{595}/A_{450}$  contra la concentración de BSA (µg/mL) [Zor y Selinger, 1996]. Típicamente, esta modificación permite obtener coeficientes de correlación ( $r^2$ ) mayores a 0.99. La concentración de proteína en las muestras se obtiene intrapolando el resultado de la relación  $A_{595}/A_{450}$  correspondiente en el intervalo lineal de la curva estándar.

*Micro-ensayo del ácido bicinonínico (BCA).* Inicialmente, se preparó una solución fresca de reactivo de BCA (*Sigma*), mezclando 25 partes de solución A, 25

partes de solución B, y 1 parte de solución de  $\text{Cu}^{2+}$ . Posteriormente, a cada pocillo, conteniendo solución estándar o muestra, se le agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución de BCA. Después de una hora de incubación a 37 °C, la  $A_{560}$  fue registrada. A partir de estos valores, la curva estándar fue obtenida graficando la relación  $A_{560}$  contra la concentración de BSA ( $\mu\text{g/mL}$ ). Típicamente, esta determinación permite obtener coeficientes de correlación ( $r^2$ ) mayores a 0.999. La concentración de proteína en las muestras se obtiene intrapoliando el resultado de  $A_{560}$  correspondiente en el intervalo lineal de la curva estándar.

### **3.4. Actividad isomerasa de *EhPDI* p38 usando AppA como sustrato**

#### 3.4.1. Transfección de las cepas BW25113 y JW2861-1 con pBAD:AppA

Las cepas de *E. coli* BW25113 (*dsbC*<sup>+</sup>) y JW2861-1 (*dsbC*<sup>-</sup>) fueron transfectadas (mediante choque térmico) con los plásmidos pBAD:AppA y pBAD33 (como control). Las transformantes estables fueron seleccionadas en medio LB sólido suplementado con 0.015 mg/mL de cloramfenicol. A partir de tres unidades formadoras de colonias, se prepararon pastillas celulares provenientes de 1 mL de cultivo inducido con arabinosa 0.2% .

#### 3.4.2. Transfección de la cepa JW2861-1 con pBPelB:*EhPDI*

La cepa de *E. coli* JW2861-1 (*dsbC*<sup>-</sup>) portadora del plásmido pBAD:AppA fue transfectada (mediante choque térmico) con los plásmidos pBPelB:*EhPDI*, o sus variantes (pRMXX), y pBluescript SK- (como control). Las transformantes estables

fueron seleccionadas en medio LB sólido suplementado con 0.015 mg/mL de cloramfenicol y 0.15 mg/mL de ampicilina. A partir de tres unidades formadoras de colonias, se prepararon pastillas celulares provenientes de 1 mL de cultivo inducido con arabinosa 0.2% y IPTG 1 mM.

### 3.4.3. Ensayo de actividad de fosfatasa ácida

Las pastillas celulares fueron descongeladas a temperatura ambiente y resuspendidas en 1 mL de una solución amortiguadora ácida de glicina (Gly-HCl 0.25 mM, pH 2.5). La  $A_{600}$  fue registrada y se preparó una dilución de trabajo en un rango de  $A_{600} = 0.3 - 0.6$ . En microtubos limpios, se prepararon diluciones de las suspensiones celulares (1:10 para BW25113 y 1:5 para JW2861-1; 100  $\mu$ L volumen final), usando la solución amortiguadora ácida de glicina como diluyente. La dilución fue incubada durante 2 min a 37 °C y después agregó 100  $\mu$ L de una solución de *p*NPP 50 mM (en solución amortiguadora ácida de glicina). Después de 15 min de incubación (a 37 °C), la reacción fue detenida mediante la adición de 1 mL de una solución de NaOH 1.2 N. Inmediatamente, la fracción celular fue separada mediante centrifugación (14,500 rpm durante 5 min), el sobrenadante (1 mL) fue transferido a una celda de espectrofotómetro y se registraron las  $A_{420}$  y  $A_{550}$ . Los resultados obtenidos fueron utilizados para calcular la actividad de fosfatasa ácida usando la fórmula de Miller (1992):

$$U_{Miller} = \frac{A_{420} - (1.75 \cdot A_{550})}{t \cdot v \cdot A_{600}} \cdot 1000$$

Donde,  $A_{420}$  es la absorbancia del *p*-nitrofenol,  $A_{550}$  es la dispersión ocasionada por los restos celulares (la cual debe ser multiplicada por 1.75, para ajustar la dispersión

observada a 420 nm),  $t$  es el tiempo de reacción (en min),  $v$  es el volumen del cultivo ensayado (en mL), y  $A_{600}$  es la absorbancia de la densidad celular.

### **3.5. Actividad oxidorreductasa de *EhPDI* p38 usando *EhCHIT* como sustrato**

#### **3.5.1. Transfección de las cepas BW25113, MRB10, MRB20 y MRB13 con pBAD:PeI*EhCHIT*84**

Las cepas de *E. coli* BW25113 (*dsbA*<sup>+</sup> *dsbC*<sup>+</sup>), MRB10 (*dsbA*<sup>-</sup>), MRB20 (*dsbC*<sup>-</sup>) y MRB13 (*dsbA*<sup>-</sup> *dsbC*<sup>-</sup>) fueron transfectadas (mediante choque térmico) con los plásmidos pBAD:PeI*EhCHIT*84 y pBAD33 (como control). Las transformantes estables fueron seleccionadas en medio LB sólido suplementado con 0.015 mg/mL de cloramfenicol. A partir de tres unidades formadoras de colonias, se prepararon pastillas celulares provenientes de 1 mL de cultivo inducido con arabinosa 0.2% .

#### **3.5.2. Transfección de la cepa MRB10 con pBPelB:*EhPDI***

La cepa de *E. coli* MRB10 (*dsbA*<sup>-</sup>) portadora del plásmido pBAD:PeI*EhCHIT*84 fue transfectada (mediante choque térmico) con los plásmidos pBPelB:*EhPDI*, o sus variantes (pRMXX), y pBluescript SK- (como control). Las transformantes estables fueron seleccionadas en medio LB sólido suplementado con 0.015 mg/mL de cloramfenicol y 0.15 mg/mL de ampicilina. A partir de tres unidades formadoras de colonias, se prepararon pastillas celulares provenientes de 1 mL de cultivo inducido con arabinosa 0.2% e IPTG 1 mM.

### 3.5.3. Ensayo de actividad quitinolítica

Las pastillas celulares fueron descongeladas a temperatura ambiente y se prepararon extractos proteicos solubles totales utilizando el reactivo *CellLytic™ B*. El contenido de proteína fue determinado mediante el micro-ensayo de BCA. La actividad quitinolítica fue determinada mediante un micro-ensayo fluorogénico, usando el sustrato 4-metil-umbeliferil-(β)-D-N,N',N''-tri-acetil-quitotriósido (4MUF-TAQT). Las mezclas de reacción (100 μL volumen final) fueron preparadas en los pocillos de una micro-placa para fluorescencia, conteniendo 10 μg de proteína y 1 nmol de sustrato en una solución amortiguadora de citratos-fosfatos 50 mM, pH 5.0. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, la reacción fue detenida mediante la adición de 100 μL de una solución amortiguadora alcalina de glicina (Gly-NaOH 1 M, pH 10.3). Inmediatamente, se registró la fluorescencia emitida por la 4MUF liberada, a longitudes de onda de excitación y emisión de 355 y 460 nm, respectivamente. La actividad quitinolítica específica (AQE) fue calculada dividiendo el valor obtenido de las unidades de fluorescencia (UF) entre 50 (producto de 5 min de reacción multiplicados por 10 μg de proteína presente en la reacción); por lo tanto, una unidad de actividad enzimática corresponde al incremento de 1.0 UF por min por μg. Cabe mencionar, que los valores de AQE calculados en la cepa MRB portadora de los plásmidos derivados de pBluescript SK- fueron normalizados restando el valor basal de la AQE observada en la cepa que porta el vector vacío.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. *EhPDI* p38 exhibe las características estructurales de una proteína activa

La proteína *EhPDI* p38 posee dos dominios tiorredoxina (N-Trx y C-Trx, respectivamente), caracterizados por la presencia de la firma estructural CGHC en su sitio activo [Ramos, *et al.*, 2005]; además, se considera que las cisteínas de cada sitio activo ciclan entre los estados ditiol/disulfuro durante su actividad oxidorreductora. La predicción de la estructura secundaria infiere que ambos dominios se pliegan de manera similar a dominios tiorredoxina funcionales [Ramos, *et al.*, 2008]. Por otro lado, los estudios funcionales mostraron que la enzima exhibe actividad oxidasa *in vivo* [Ramos, *et al.*, 2005; Mares, *et al.*, 2009] y las actividades de reductasa, oxidasa e isomerasa *in vitro* [Mares, *et al.*, 2009; Ramos, *et al.*, 2011]. Inclusive, se ha demostrado que es funcionalmente activa en el modelo de levadura, ya que fue capaz de rescatar el fenotipo letal de la mutante  $\Delta$ PDI1 de *Saccharomyces cerevisiae* (carente del gen esencial PDI1p) [Mares, Tesis Doctoral, 2009].

### 4.2. AppA es dependiente de la actividad isomerasa de DsbC

Con los antecedentes descritos en la sección anterior, se planteó una de las interrogantes que fundamentan el presente proyecto, ¿exhibe la enzima *EhPDI* p38 actividad isomerasa *in vivo*? Considerando que los resultados observados en el modelo de levadura pueden ser el producto de la complementación de la actividad oxidasa, ya que es la principal función de la enzima PDI1p de *S. cerevisiae* [Solovyov, *et al.*, 2004; Xiao, *et*

*al.*, 2004], se propuso el modelo en bacteria, ya que posee una maquinaria de formación e isomerización de enlaces disulfuro claramente separada: DsbA actúa como oxidasa, en tanto DsbC como isomerasa [Stafford and Lund, 2000; Denoncin and Collet, 2012].

Inicialmente, se pensó en un sustrato eucariótico, la urocinasa de ratón (uPA), la cual posee 12 enlaces disulfuro y depende de la actividad de DsbC para su plegamiento en el periplasma bacteriano [Stafford and Lund, 2000]. Sin embargo, los resultados obtenidos en estudios preliminares no fueron reproducibles, con respecto a los reportados (datos no mostrados). Ante esto, se planteó como segunda alternativa un sustrato bacteriano. Muy pocas son las proteínas de *E. coli* que se exportan al periplasma y exhiben dependencia a DsbC para su plegamiento; sin embargo, la enzima AppA (proteína con una actividad dual: fosfatasa ácida y fitasa) cumple con ambos requisitos [Berkmen, *et al.*, 2005]. Por lo tanto, se decidió utilizar a AppA como sustrato modelo en ensayos de complementación funcional de la mutante *dsbC* de *E. coli*.

Primeramente, se construyó el plásmido pBAD:AppA, derivado de pBAD33, el cual contiene el gen codificante para el precursor de la proteína AppA bajo el control del promotor de arabinosa. El plásmido recombinante fue obtenido y exitosamente caracterizado, mediante un análisis de restricción y secuenciación de

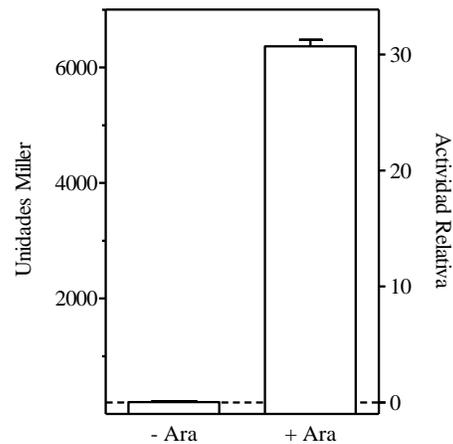


Figura 6. Análisis de expresión de la proteína AppA (fosfatasa ácida) en la cepa BW25113 (*dsbA*<sup>+</sup> *dsbC*<sup>+</sup>) portadora de pBAD:AppA.

Cultivos no inducidos (- Ara) o inducidos con 0.2% de arabinosa (+ Ara).

ADN. El plásmido pBAD:AppA ahora es parte de la reserva de reactivos biológicos del Laboratorio de Biotecnología, FCQI-UABC. Posteriormente, la cepa de *E. coli* BW25113 (*dsbA*<sup>+</sup> *dsbC*<sup>+</sup>) fue transfectada con el plásmido pBAD:AppA. Las transformantes estables fueron sometidas a un análisis de expresión de la proteína AppA utilizando un ensayo de evaluación de la actividad fosfatasa ácida. Los resultados iniciales comprobaron que la cepa BW25113 expresa eficientemente a la proteína AppA activa; esto es, se observó un aumento significativo de la actividad de fosfatasa ácida en cultivos inducidos con 0.2% de arabinosa (30 veces), en relación con aquellos no inducidos. Los resultados de un análisis crudo se muestran en la Figura 6.

En seguida, se realizó el análisis comparativo de expresión de AppA y su dependencia a la proteína DsbC; para lo cual, la mutante JW2861-1 (*dsbC*<sup>-</sup>) fue transfectada con el plásmido pBAD:AppA y comparada con la cepa silvestre BW25113, en igualdad de condiciones experimentales.

Como se puede notar en la Figura 7, existe una clara diferencia en los niveles de expresión de fosfatasa ácida entre BW25113 y JW2861-1 ( $p < 0.0001$ ); esto es, se observa una decremento superior al 80% de la actividad enzimática en la cepa *dsbC*<sup>-</sup>.

Es pertinente mencionar que ambas cepas son singénicas y la única variable en su fondo genético es la presencia o ausencia del gen codificante para la proteína DsbC. Por lo

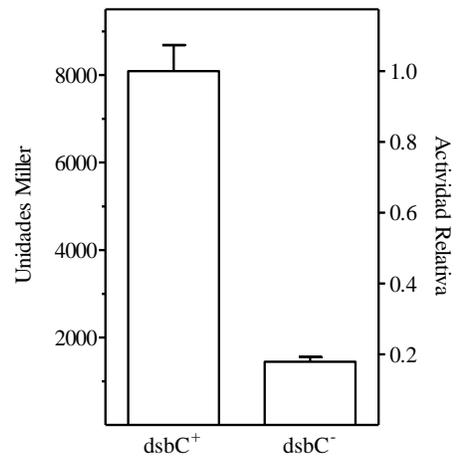


Figura 7. Análisis de expresión de la proteína AppA (fosfatasa ácida) en las cepas BW25113 (*dsbC*<sup>+</sup>) y JW2861-1 (*dsbC*<sup>-</sup>) portadoras de pBAD:AppA.

Cultivos inducidos con 0.2% de arabinosa.

tanto, se corrobora que el plegamiento de la proteína AppA es dependiente de la actividad isomerasa de la proteína DsbC bacteriana.

En conjunto, los resultados exponen el potencial de la dupla AppA/DsbC en *E. coli* como modelo *in vivo* para el estudio de la actividad isomerasa de proteínas con actividad oxido-reductora, del tipo DsbC/PDI, ofreciendo como ventaja una alta sobre-expresión de AppA y una clara dependencia al plegamiento asistido por DsbC.

#### **4.3. *EhPDI* p38 exhibe actividad isomerasa en el periplasma de la mutante *dsbC* de *E. coli***

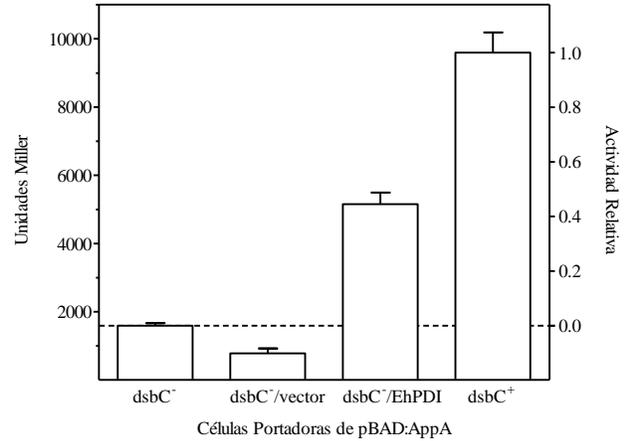
Con el fin de evaluar la actividad isomerasa de la proteína *EhPDI* p38 *in vivo*, se realizó un ensayo de complementación funcional de la mutante *dsbC*<sup>-</sup>, utilizando el modelo de expresión anteriormente descrito. Para este ensayo, se utilizó el plásmido pBPelB:*EhPDI*, descrito y utilizado en el estudio de la actividad oxidasa de la enzima *EhPDI* p38 [Ramos, *et al.*, 2005; Mares, *et al.*, 2009].

Es importante mencionar que para el mantenimiento episomal de los plásmidos pBAD:AppA y pBPelB:*EhPDI* en *E. coli*, y la consecuente co-expresión de proteínas (AppA y *EhPDI* p38), se consideró la utilización de plásmidos con orígenes de replicación diferentes y compatibles (para evitar la segregación) [Skowronek and Kasprzak, 2002]; esto es, los plásmidos portadores de AppA (pBAD33, origen p15A) y *EhPDI* p38 (pBluescript SK-, origen ColE1) son genéticamente compatibles.

La cepa JW2681-1 portadora de pBAD:AppA fue transfectada con los plásmidos pBPelB:*EhPDI* y pBluescript SK- (parental, como control). Las transformantes estables fueron sometidas a un análisis de expresión de la proteína AppA utilizando un ensayo de

Figura 8. Análisis de expresión de la proteína AppA (fosfatasa ácida) en las cepas BW25113 (*dsbC*<sup>+</sup>) y JW2861-1 (*dsbC*<sup>-</sup>) portadoras de pBAD:AppA. Adicionalmente, la cepa JW2861-1 (*dsbC*<sup>-</sup>) fue co-transfectada con pBPelB:*EhPDI* (*EhPDI* p38) o pBluescript SK- (vector).

JW2861-1 (*dsbC*<sup>-</sup>) fue co-transfectada con pBPelB:*EhPDI*. Los cultivos fueron inducidos con arabinosa 0.2% y IPTG 1 mM (cuando la estrategia de expresión lo demandó).



evaluación de la actividad de fosfatasa ácida. Sí se considera que *EhPDI* p38 exhibe las características estructurales de una oxidoreductasa activa, es de esperarse que asista el plegamiento de AppA y favorezca la isomerización correcta de sus enlaces disulfuro, restableciendo su actividad enzimática en el ambiente periplásmico de *E. coli*.

Como se puede observar en la Figura 8, la expresión de AppA aumenta en presencia de *EhPDI* p38, cuando ambas proteínas son co-expresadas en la cepa mutante *dsbC*<sup>-</sup>. Aún más, el análisis comparativo mostró un aumento significativo (3.2 veces) de la actividad de fosfatasa ácida favorecido por la expresión de la enzima *EhPDI* p38 ( $p < 0.001$ ). Cabe mencionar que la presencia del vector vacío no alteró significativamente los niveles de expresión de AppA.

A pesar que no se recuperaron los niveles de expresión observados en la cepa silvestre, los resultados sugieren que la enzima AppA adoptó su plegamiento nativo y su estado oxidativo correcto gracias a la actividad isomerasa de la proteína *EhPDI* p38.

#### **4.4. La actividad isomerasa es atribuible principalmente al dominio N-tiorredoxina de *EhPDI* p38**

Considerando que la actividad isomerasa de la proteína *EhPDI* p38 puede ser analizada usando el modelo bacteriano AppA/DsbC, y que el nivel de expresión de la proteína AppA puede ser considerado como un rasgo cuantitativo, se valoró la contribución de los dominios tiorredoxina y la posible participación de los residuos de cisteína. Como ya es conocido, los residuos de cisteína del motivo CXXC, presente en los dominios tiorredoxina de proteínas DsbA, DsbC y PDI, desempeñan un papel importante tanto en el estado redox del sitio activo como en la actividad oxidorreductora [Kadokura, *et al.*, 2010; Karala, *et al.*, 2010]. Además, ya se ha demostrado que la sustitución Cys>Ser en los sitios activos de los dominios tiorredoxina altera la actividad (la disminuye) oxidasa de la proteína *EhPDI* p38 [Mares, *et al.*, 2009]. Por lo tanto, es factible pensar que esos residuos pudieran ser importantes para la actividad isomerasa.

Para el análisis de la contribución funcional de los residuos de cisteína, y su efecto sobre la actividad isomerasa de cada dominio tiorredoxina, se utilizaron los plásmidos que portan las variantes del gen codificante para *EhPDI* p38 (denominados de manera simple como pRMXX, obtenidos de la reserva de reactivos biológicos del Laboratorio de Biotecnología, FCQI-UABC) [Mares, *et al.*, 2009]. Cabe mencionar que los plásmidos portan sustituciones Cys>Ser en diferentes posiciones de los sitios activos CXXC [Mares, *et al.*, 2009], incluidas principalmente como mutantes dobles y una cuádruple. La cepa de *E. coli* JW2861-1 (*dsbC*<sup>-</sup>) portadora del plásmido pBAD:AppA fue transfectada con los plásmidos pRMXX y pBluescript SK- (parental, como control). Las transformantes

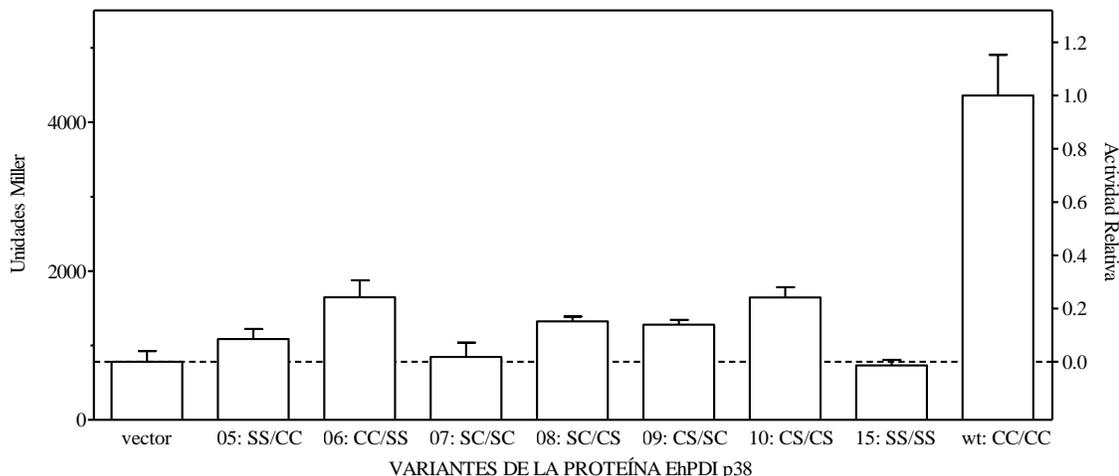


Figura 9. Análisis de expresión de la proteína AppA (fosfatasa ácida) en la cepa JW2861-1 (*dsbC*) portadora de pBAD:AppA y co-transfectada con pBluescript SK- (vector), pBPelB:*EhPDI* (wt) o sus variantes pRMXX (05-10, y 15).

Los cultivos fueron inducidos con arabinosa 0.2% e IPTG. 1 mM En cada variante, los residuos modificados se indican después de los dos puntos.

estables fueron sometidas a un análisis de expresión de la proteína AppA utilizando un ensayo de evaluación de la actividad fosfatasa ácida.

Los datos mostrados en la Figura 9 demuestran que, a excepción de la versión silvestre (wt: CC/CC), ninguna de las variantes de la proteína *EhPDI* p38 exhibe una expresión relativa significativamente superior a la basal. Además, el análisis de varianza seguido de la prueba de *Tuckey (a posteriori)*, con el cual se realizó un comparativo binario de expresión relativa entre todas las variantes (incluyendo el vector y la versión silvestre), indicó que la dispersión observada entre las cepas que portan las variantes y el vector no es estadísticamente significativa y, sobretodo, ni remotamente alcanzarían los niveles observados en la versión silvestre ( $p < 0.01$ ). Estos resultados revelan que la sustitución de Cys>Ser en la secuencia CXXC del sitio activo, en cualquier posición y en cualquiera de los dominios tiorredoxina, perturba la actividad isomerasa de la enzima *EhPDI* p38, presumiblemente por alteración del estado redox y del pKa del sitio activo,

tal como se observó para la PDI de humano [Stafford y Lund, 2000]. Inclusive, es claramente evidente que se requieren los cuatro residuos de cisteína para realizar eficientemente la actividad isomerasa (dos presentes en cada dominio tiorredoxina).

Sin embargo, existen dos consideraciones que deben ser tomadas en cuenta: (1) la actividad isomerasa es producto de la acción conjunta y consecutiva de los actividades reductasa y oxidasa, y (2) se ha demostrado que ambos dominios tiorredoxina exhiben actividad oxidasa *in vivo* y son capaces de mantener esta actividad al 100% de manera independiente [Mares, *et al.*, 2009]; por lo tanto, la pérdida total de la actividad isomerasa observada en todas las variantes analizadas (Figura 9) puede radicar en la actividad reductasa y, además, puede ser atribuible a un solo dominio.

Desafortunadamente, la actividad reductasa *in vivo* no puede ser analizada mediante el modelo adoptado; no obstante, los resultados de un proyecto colateral (donde se analizó la actividad reductasa *in vitro* de *EhPDI* p38 y sus variantes) mostraron que la variante 05: SS/CC exhibe una baja actividad ( $\pm 20\%$ ) en tanto la variante 06: CC/SS muestra una actividad alta ( $\pm 60\%$ ), ambos en comparación con el valor observado en la variante silvestre (wt: CC/CC) [Resultados no mostrados, manuscrito en preparación]. Interesantemente, ninguno de los dominios mantiene el 100% de la actividad reductasa, por lo que es posible pensar que ésta no sea su función principal y, por ende, esté asociada primordialmente a la actividad isomerasa.

En conjunto, los datos experimentales sugieren que la actividad isomerasa de la proteína *EhPDI* p38 está asociada principalmente al dominio N-tiorredoxina, con mínima participación del dominio C-tiorredoxina.

#### **4.5. La quitinasa amibiana se expresa activa en el periplasma de *E. coli***

Muchas proteínas amibianas, incluidos algunos factores de virulencia (tales como las cisteína proteinasas y las proteínas formadoras de poros), son transportadas a través de la vía secretora y exportadas al ambiente extracelular. Gracias a este mecanismo celular, *E. histolytica* obtuvo su reconocimiento como organismo patógeno para humanos [Olivos-García, *et al.*, 2009]. Muy poco se conoce de la estructura terciaria de las proteínas amibianas asociadas a la virulencia, esto principalmente a obstáculos técnico-metodológicos asociados a los procedimientos de expresión, purificación y cristalización [Hecht, *et al.*, 2004]. Sin embargo, los conocimientos asociados tanto a la estructura y el plegamiento como a las modificaciones post-traduccionales se han obtenido (primordialmente) mediante estrategias de predicción basada en homología de secuencias (usando modelos de proteínas ortólogas cuya estructura tridimensional ya fue resuelta) [Kundu and Roy, 2007].

Una de las proteínas más importantes para el ciclo de vida de *E. histolytica* es la quitinasa (*EhCHIT*), ya que participa tanto en el enquistamiento como desenquistamiento. El análisis de la estructura primaria de *EhCHIT* predice un péptido señal, seguido de un dominio de unión a quitina, rico en residuos de cisteína (8 *Cys*), dos secuencias repetidas y un dominio de actividad glicosidasa (*Glyco-18*), el cual contiene 4 residuos de *Cys*. Desafortunadamente, la estructura tridimensional de *EhCHIT* no ha sido resuelta; no obstante, mediante un análisis de predicción de la estructura terciaria, se observó que sus cisteínas pudieran estar comprometidas en la formación de 2-3 enlaces disulfuro. Esto último sugiere que *EhCHIT* depende de la formación correcta de los enlaces disulfuro para adquirir su estructura nativa y que, además, pudiera ser un posible

sustrato para las actividades oxidorreductoras de la enzima *EhPDI* p38. Por lo tanto, considerando que la enzima *EhPDI* p38 exhibe actividad oxidasa e isomerasa *in vivo* (en el modelo bacteriano), se planteó una segunda interrogante, ¿es posible que *EhPDI* p38 exhiba actividad oxidorreductora ante el sustrato amibiano *EhCHIT*?

Para la expresión de la proteína *EhCHIT* en el periplasma bacteriano, se construyó el plásmido pBAD:PeI*B**EhCHIT*84, derivado de pBAD33, el cual contiene la secuencia codificante para el péptido maduro de la quitinasa amibiana (*EhCHIT*) en fase con los codones del péptido señal de la proteína PeI*B* bacteriana, bajo el control del promotor de arabinosa. El plásmido recombinante fue obtenido y exitosamente caracterizado, mediante un análisis de restricción y secuenciación de ADN. El plásmido pBAD:PeI*B**EhCHIT*84 ahora es parte de la reserva de reactivos biológicos del Laboratorio de Biotecnología, FCQI-UABC. Inicialmente, la cepa de *E. coli* BW25113 (silvestre *dsbA*<sup>+</sup> *dsbC*<sup>+</sup>) fue transfectada con los plásmidos pBAD:PeI*B**EhCHIT*84 y pBAD33 (parental, como control). Las transformantes estables fueron sometidas a un análisis de expresión de la proteína *EhCHIT* utilizando un ensayo de evaluación de la actividad quitinolítica. Los resultados demostraron que la cepa BW25113 expresa eficientemente a la proteína *EhCHIT* activa; esto es, se observó un aumento significativo

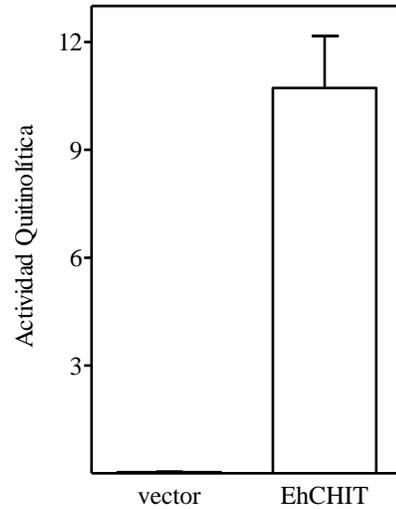


Figura 10. Análisis de expresión de la proteína *EhCHIT* (quitinasa amibiana) en la cepa BW25113 (silvestre, *dsbA*<sup>+</sup> *dsbC*<sup>+</sup>) portadora de pBAD33 (vector) o pBAD:PeI*B**EhCHIT*84 (*EhCHIT*).

Cultivos inducidos con arabinosa 0.2%.

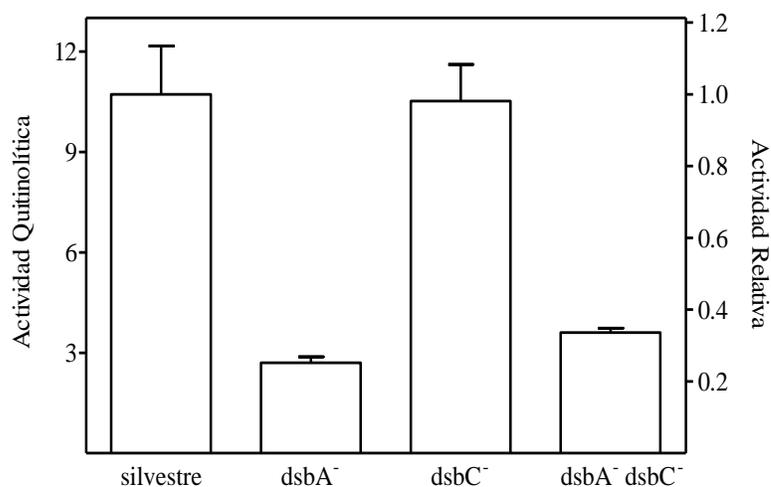


Figura 11. Análisis de expresión de la proteína *EhCHIT* (quitinasa amibiana) en la cepa BW25113 (silvestre), MRB10 (*dsbA*<sup>-</sup>), MRB20 (*dsbC*<sup>-</sup>) y MRB13 (*dsbA*<sup>-</sup> *dsbC*<sup>-</sup>) portadoras de pBAD:Pe*EhCHIT*84.

Cultivos inducidos con arabinosa 0.2%.

( $p < 0.0001$ ) de la actividad quitinolítica en los cultivos inducidos con 0.2% de arabinosa que portaban el plásmido recombinante, en relación con aquellos que portaban el plásmido parental (Figura 10). Estos resultados demuestran que *EhCHIT* se exporta al periplasma y, además, exhibe su función, indicando que las condiciones medioambientales favorecen su plegamiento correcto.

#### **4.6. La quitinasa amibiana (*EhCHIT*) es dependiente del plegamiento oxidativo en el periplasma de *E. coli***

Para el análisis de la expresión de *EhCHIT* y su dependencia al ambiente redox del periplasma bacteriano, proporcionado por las proteínas *dsbA* y *dsbC*, se utilizaron las cepas mutantes MRB (Tabla 1). Brevemente, éstas portan mutaciones simples (*dsbA*<sup>-</sup> o *dsbC*<sup>+</sup>) o doble (*dsbA*<sup>-</sup> *dsbC*<sup>-</sup>), pero carentes del gen de resistencia a kanamicina que fue utilizado para la disrupción génica (removido con el objetivo de reducir el estrés durante

la selección), las cuales fueron obtenidas en el Laboratorio de Biotecnología de la FCQI-UABC mediante una estrategia recombinación (datos no publicados, manuscrito en preparación). Las mutantes MRB10 (*dsbA*<sup>-</sup>), MRB20 (*dsbC*<sup>-</sup>) y MRB13 (*dsbA*<sup>-</sup> *dsbC*<sup>-</sup>) fueron transfectadas con el plásmido pBAD:PeI*EhCHIT*84 y analizadas en igualdad de condiciones experimentales. Como se puede observar en la Figura 11, existe una clara diferencia en los niveles de expresión de *EhCHIT* en las variantes que contienen la mutación *dsbA* ( $p < 0.01$ ), en relación a la cepa silvestre, observándose un decremento cercano al 70% de la actividad quitinolítica. Además, es pertinente mencionar que las cepas BW25113 y MRB son singénicas y la única variable en su fondo genético es la presencia o ausencia del gen codificante para las proteínas DsbA o DsbC. Por lo tanto, estos resultados indican que el plegamiento de la proteína *EhCHIT* es dependiente de la actividad oxidasa de la DsbA bacteriana.

Por otro lado, es importante recordar que *EhCHIT* posee 12 residuos de cisteína, los cuales pudieran estar formando 2-3 enlaces disulfuro; con base a esta inferencia, se pensó en la posibilidad de que alguno de los enlaces estuviera formado por cisteínas no consecutivas (las cuales han sido identificadas como sustratos para la actividad isomerasa de proteínas dsbC [Berkmen, *et al.*, 2005]). Con esto en mente, los resultados de la Figura 11 indican que la ausencia de la *dsbC* no tiene repercusión significativa sobre la expresión de la proteína *EhCHIT*, sugiriendo que la conformación nativa depende primordialmente de la correcta oxidación de sus enlaces disulfuro y de la actividad oxidasa de la DsbA bacteriana.

Considerando los resultados obtenidos, es posible interpretar que la dependencia de la enzima *EhCHIT* por la actividad oxidasa sugiere que carece de enlaces disulfuro

entre residuos de cisteína no consecutivos, o que de existir alguno, la formación de ese enlace no es crítico para su conformación funcional activa.

#### 4.7. La enzima *EhCHIT* es dependiente de la actividad oxidasa de *EhPDI* p38

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína *EhPDI* p38 exhibe actividad oxidasa, tanto *in vivo* como *in vitro* [Ramos, *et al.*, 2005; Mares, *et al.*, 2009]. Sin embargo, hasta el momento, sólo se habían utilizado sustratos no amibianos (*p.e.* fosfatasa alcalina bacteriana, lisozima de clara de huevo de gallina, y ribonucleasa de bovino). Por tal motivo, se realizó un ensayo de replegamiento oxidativo y recuperación de la actividad quitinolítica de la

enzima *EhCHIT* asistido por la proteína

*EhPDI* p38 en el periplasma de la cepa

MRB10 (*dsbA*<sup>-</sup>). Inicialmente, la cepa

MRB10 portadora del plásmido

pBAD:PeI*EhCHIT*84 fue co-

transfectada con el plásmido

pBPelB:*EhPDI*. Las transformantes

estables fueron sometidas a un análisis

de expresión de la proteína *EhCHIT*

utilizando un ensayo de evaluación de

la actividad quitinolítica. Los resultados

obtenidos (Figura 12) mostraron que la

cepa MRB10 (*dsbA*<sup>-</sup>) expresa

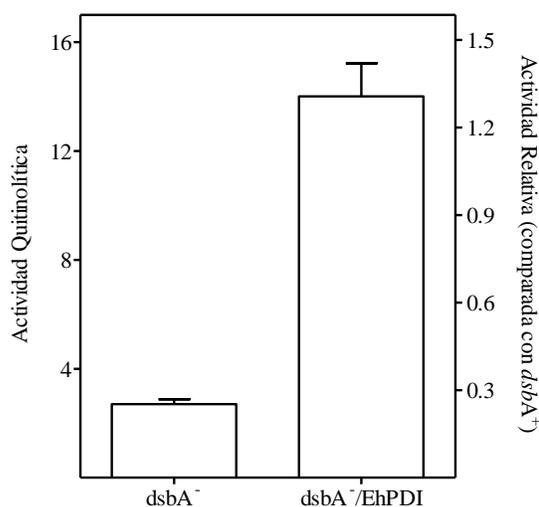


Figura 12. Análisis de expresión de la proteína *EhCHIT* (quitinasa amibiana) en la cepa MRB10 (*dsbA*<sup>-</sup>) portadora de pBAD:PeI*EhCHIT*84 y co-transfectada con pBPelB:*EhPDI* (*EhPDI* p38).

Los cultivos fueron inducidos con arabinosa 0.2% e IPTG 1 mM. La expresión determinada en la cepa *dsbA*<sup>-</sup>/*EhPDI* fue normalizada mediante la sustracción de la expresión observada en la cepa portadora del vector vacío.

eficientemente a la proteína *EhCHIT* activa en presencia de la proteína *EhPDI* p38, observándose un aumento significativo de la actividad quitinolítica en los cultivos que portan el plásmido pBPelB:*EhPDI* ( $p < 0.05$ ). En conjunto, estos resultados demuestran que la proteína *EhPDI* p38 exhibe actividad oxidasa sobre sustratos amibianos y que *EhCHIT* es dependiente de una chaperona molecular con actividad oxidorreductora para adquirir su estructura nativa.

#### **4.8. El dominio tiorredoxina N-terminal de *EhPDI* p38 es importante para la actividad oxidasa**

Finalmente, para conocer la participación individual de cada dominio tiorredoxina, y la contribución de sus residuos de cisteína (presentes en los sitios activos), a la actividad oxidasa de *EhPDI* p38 frente a un sustrato natural, tal como *EhCHIT*, se realizaron ensayos de co-expresión en el periplasma de la mutante *dsbA*<sup>-</sup>. La cepa MRB10 portadora del plásmido pBAD:PelB*EhCHIT*84 fue co-transfectada con los plásmidos pRMXX (portadores de variantes de la proteína *EhPDI* p38 que contienen sustituciones Cys>Ser en algunos de sus sitios activos CXXC) y las co-transfectantes estables fueron sometidas a un análisis de la actividad quitinolítica en igualdad de condiciones experimentales.

Como se observa en la Figura 13, sólo la variante que mantiene el dominio N-tiorredoxina sin cambios (pRM06: CC/SS) conserva la actividad oxidasa al 100% ( $p < 0.001$ ); sin embargo, la variante pRM05 (SS/CC), que mantiene el dominio C-tiorredoxina sin sustituciones, conserva la actividad al 43% ( $p < 0.01$ ). Esto era de esperarse, ya que ambos dominios exhiben actividad oxidasa ante sustratos no amibianos;

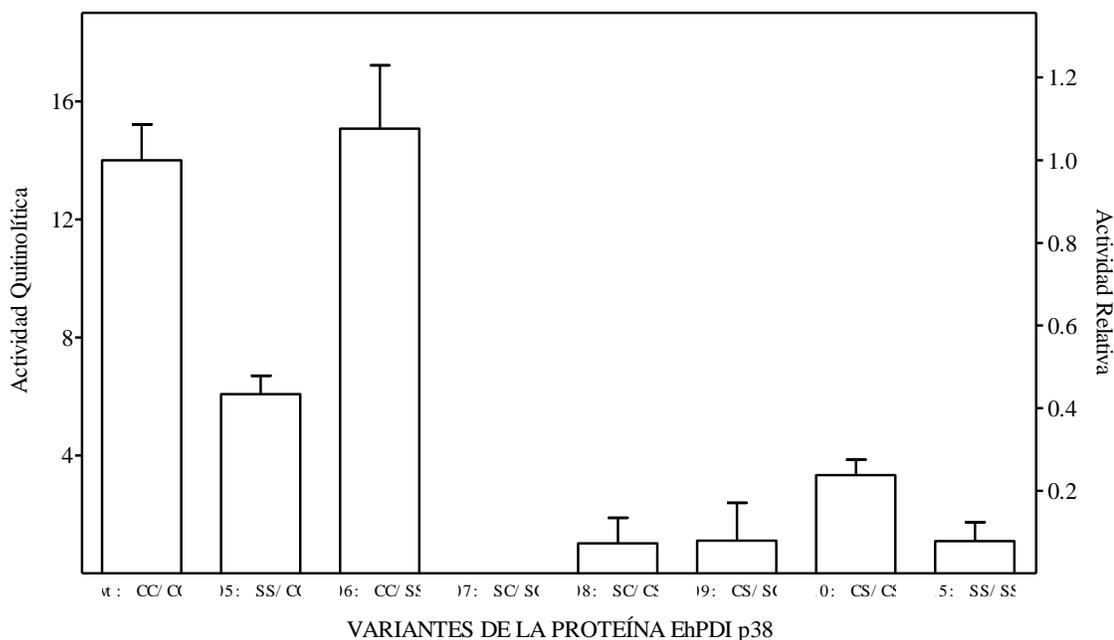


Figura 13. Análisis de expresión de la proteína *EhCHIT* (quitinasa amibiana) en la cepa MRB10 (*dsbA*<sup>-</sup>) portadora de pBAD:PeI *BEhCHIT84* y co-transfectada con pBPelB:*EhPDI* (wt) o sus variantes pRMXX (05-10, y 15).

Los cultivos fueron inducidos con arabinosa 0.2% e IPTG 1 mM. En cada variante, los residuos modificados se indican después de los dos puntos. La expresión determinada en la cepa *dsbA*<sup>-</sup> portadora de pBPelB:*EhPDI* o sus variantes fue normalizada mediante la sustracción de la expresión observada en la cepa portadora del vector vacío.

sin embargo, contrario a lo observado frente a la fosfatasa alcalina bacteriana, la actividad oxidasa frente a la quitinasa amibiana no es funcionalmente equivalente en ambos dominios, lo que sugiere que la actividad oxidorreductora de la proteína *EhPDI* p38 es dependiente del sustrato, tal como se ha observado en otras PDI homólogos. Incluso, es posible que el repliegamiento oxidativo sea dependiente de su afinidad por los diferentes sustratos; es decir, con una contribución significativa de la actividad chaperona.

A pesar de que el análisis de varianza seguido de la prueba de *Dunnnett* (*a posteriori*), indicó que la dispersión observada entre todas las variantes no es estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ), es posible destacar la actividad mostrada por la

variante pRM10 (Figura 13), la cual posee los residuos de cisteína posicionados en el extremo N-terminal del sitio activo de ambos dominios Trx. Cabe mencionar que estos residuos participan activamente en el plegamiento oxidativo de la fosfatasa alcalina bacteriana [Mares, *et al.*, 2009]; inclusive, su ausencia conduce a una pérdida total de la actividad oxidasa, como se observa en la variante pRM07 (Figura 13), lo que sugiere que su participación es más evidente frente a sustratos amibianos.

## 5. CONCLUSIONES

Utilizando el plásmido pBAD:AppA y las cepas BW25113 (*dsbC*<sup>+</sup>) y JW2861-1 (*dsbC*<sup>-</sup>) se comprobó la dependencia funcional de la proteína AppA al plegamiento asistido por la oxidorreductasa DsbC en el periplasma de *E. coli*, obteniéndose resultados similares a los reportados por Berkmen y cols (2005).

Mediante la co-expresión de proteínas en el periplasma de la cepa JW2861-1 (*dsbC*<sup>-</sup>) se demostró que la oxidorreductasa *EhPDI* p38 exhibe actividad isomerasa *in vivo*, complementando la función de la proteína DsbC y restableciendo la actividad enzimática de la proteína AppA.

A través de un análisis funcional de diferentes variantes de la proteína *EhPDI* p38, se evidenció que los cuatro residuos de cisteína (dos presentes en cada dominio Trx, en el motivo catalítico CGHC) son requeridos para realizar eficientemente la actividad isomerasa; no obstante, es posible considerar que la pérdida total de la actividad isomerasa pueda deberse a una ineficiente actividad reductasa, la cual puede ser atribuible principalmente al dominio N-Trx.

Utilizando el plásmido pBAD:PelBEhCHIT84 y las cepas BW25113 (*dsbA*<sup>+</sup> *dsbC*<sup>+</sup>), MRB10 (*dsbA*<sup>-</sup> *dsbC*<sup>+</sup>), MRB20 (*dsbA*<sup>+</sup> *dsbC*<sup>-</sup>) y MRB13 (*dsbA*<sup>-</sup> *dsbC*<sup>-</sup>) se demostró la dependencia funcional de la proteína *EhCHIT* al plegamiento asistido por la oxidorreductasa DsbA en el periplasma de *E. coli*.

Mediante la co-expresión de proteínas en el periplasma de la cepa *dsbA*<sup>-</sup> (MRB10) se ratificó que la oxidorreductasa *EhPDI* p38 exhibe actividad oxidasa *in vivo*,

complementando la función de la proteína DsbA y restableciendo la actividad enzimática de la proteína *EhCHIT*.

A través de un análisis funcional de diferentes variantes de la proteína *EhPDI* p38, se confirmó que ambos dominios Trx exhiben actividad oxidasa, en concordancia con lo reportado por Mares y colabs (2009); sin embargo, cuantitativamente no son equivalentes funcionales, ya que, en ausencia del otro dominio, sólo el dominio N-Trx fue capaz de mantener la actividad oxidasa al 100%. Adicionalmente, se confirmó que los cuatro residuos de cisteína (dos presentes en cada dominio Trx, en el motivo catalítico CGHC) son importantes para realizar eficientemente la actividad oxidasa.

En general, es posible concluir: (1) la proteína *EhPDI* p38 exhibe actividad oxidorreductasa que facilita el plegamiento de proteínas en el periplasma de *E. coli*; (2) las funciones oxidasa e isomerasa dependen de los residuos de cisteína presentes en los dominios Trx; (3) las funciones oxidorreductoras de cada dominio Trx no son equivalentes, y (4) el papel funcional de la oxidorreductasa *EhPDI* p38 en el plegamiento de proteínas es dependiente del sustrato.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Molecular biology of the cell. 5th Edition, Garland Science, 2007.
- Bardwell JC, McGovern K, Beckwith J. Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. Cell. 1991; 67(3): 581-9.
- Benham AM. The protein disulfide isomerase family: key players in health and disease. Antioxid Redox Signal. 2012; 16(8): 781-9.
- Berkmen M, Boyd D, Beckwith J. The nonconsecutive disulfide bond of *Escherichia coli* phytase (AppA) renders it dependent on the protein-disulfide isomerase, DsbC. J Biol Chem. 2005; 280(12): 11387-94.
- Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science. 1997; 277(5331): 1453-62.
- 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.
- Byrne LJ, Sidhu A, Wallis AK, Ruddock LW, Freedman RB, Howard MJ, Williamson RA. Mapping of the ligand-binding site on the b' domain of human PDI: interaction with peptide ligands and the x-linker region. Biochem J. 2009; 423(2): 209-17.
- Cai H, Wang CC, Tsou CL. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. J Biol Chem. 1994; 269(40): 24550-2.
- Choi JH, Lee SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 2004; 64(5): 625-35.
- De Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. Microb Cell Fact. 2009; 8:26.
- Denoncin K, Collet JF. Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. Antioxid Redox Signal. 2013; 19(1): 63-71.
- Fahnert B. Using folding promoting agents in recombinant protein production: a review. Methods Mol Biol. 2012; 824: 3-36.

- Feige MJ, Hendershot LM. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Curr Opin Cell Biol.* 2011; 23(2): 167-75.
- Ferrari DM, Söling HD. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J.* 1999; 339(1): 1-10.
- Fu XM, Wang P, Zhu BT. Characterization of the Estradiol-Binding Site Structure of Human Protein Disulfide Isomerase (PDI). *PLoS ONE.* 2011; 6(11): e27185.
- Fu XM, Zhu BT. Human pancreas-specific protein disulfide-isomerase (PDIp) can function as a chaperone independently of its enzymatic activity by forming stable complexes with denatured substrate proteins. *Biochem J.* 2010; 429(1): 157-69.
- Galligan JJ, Petersen DR. The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum Genomics.* 2012; 6: 6.
- Gupta D, Tuteja N. Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants. *Plant Signal Behav.* 2011; 6(2): 232-6.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Bacteriol.* 1995; 177(14): 4121-30.
- Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amebiasis. *N Engl J Med.* 2003; 348(16): 1565-73.
- Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* 1996; 381(6583): 571-9.
- Hashida T, Kotake Y, Ohta S. Protein disulfide isomerase knockdown-induced cell death is cell-line-dependent and involves apoptosis in MCF-7 cells. *J Toxicol Sci.* 2011; 36(1): 1-7.
- Hatahet F, Ruddock LW. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(11): 2807-50.
- Hecht O, Van Nuland NA, Schleinkofer K, Dingley AJ, Bruhn H, Leippe M, Grötzinger J. Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem.* 2004; 279(17): 17834-41.
- Heras B, Kurz M, Shouldice SR, Martin JL. The name's bond.....disulfide bond. *Curr Opin Struct Biol.* 2007; 17(6): 691-8.
- Hiniker A, Bardwell JC. *In vivo* substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem.* 2004; 279(13): 12967-73.
- Houry WA. Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Curr Protein Pept Sci.* 2001; 2(3): 227-44.

- Huston CD. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends Parasitol.* 2004; 20(1): 23-6.
- Inaba K. Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*. *J Biochem.* 2009; 146(5): 591-7.
- Kadokura H, Beckwith J. Mechanisms of oxidative protein folding in the bacterial cell envelope. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 13(8): 1231-46.
- Karala AR, Lappi AK, Ruddock LW. Modulation of an active-site cysteine pKa allows PDI to act as a catalyst of both disulfide bond formation and isomerization. *J Mol Biol.* 2010; 396(4): 883-92.
- Kerner MJ, Naylor DJ, Ishihama Y, Maier T, Chang HC, Stines AP, Georgopoulos C, Frishman D, Hayer-Hartl M, Mann M, Hartl FU. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell.* 2005; 122(2): 209-20.
- Kersteen EA, Raines RT. Catalysis of protein folding by protein disulfide isomerase and small-molecule mimics. *Antioxid Redox Signal.* 2003; 5(4): 413-24.
- Kim SY, Sharma S, Hoskins JR, Wickner S. Interaction of the DnaK and DnaJ chaperone system with a native substrate, P1 RepA. *J Biol Chem.* 2002; 277(47): 44778-83.
- Kundu S, Roy D. Computational study of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Entamoeba histolytica*: implications for structure-based drug design. *J Biomol Struct Dyn.* 2007; 25(1): 25-33.
- Lodish, Berk, Kaiser, Krieger, Scott, Bretscher, Ploegh, Matsudaira. *Molecular cell biology.* 6th Edition, W. H. Freeman, 2007.
- Maattanen P, GEhring K, Bergeron JJ, Thomas DY. Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2010; 21(5): 500-11.
- Madan D, Lin Z, Rye HS. Triggering protein folding within the GroEL-GroES complex. *J Biol Chem.* 2008; 283(46): 32003-13.
- Majoul I, Straub M, Hell SW, Duden R, Soling HD. KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell.* 2001; 1(1): 139-53.
- Makareeva E, Leikin S. Procollagen triple helix assembly: an unconventional chaperone-assisted folding paradigm. *PLoS One.* 2007; 2(10): e1029.
- Mamathambika BS, Bardwell JC. Disulfide-linked protein folding pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008; 24: 211-35.

- 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, Tesis Doctoral: La enzima PDI de *Entamoeba histolytica* (*EhPDI*) es capaz de complementar la mutante de *Saccharomyces cerevisiae*  $\Delta$ PDI1 y rescatar el fenotipo letal. Doctorado en Ciencias, UABC. 2009.
- Merlini G, Seldin DC, Gertz MA. Amyloidosis: pathogenesis and new therapeutic options. *J Clin Oncol*. 2011; 29(14): 1924-33.
- Miller JH. A short course in bacterial genetics. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1992.
- Missiakas D, Georgopoulos C, Raina S. Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene *dsbB*, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(15): 7084-8.
- Morf L, Singh U. *Entamoeba histolytica*: a snapshot of current research and methods for genetic analysis. *Curr Opin Microbiol*. 2012; 15(4): 469-75.
- Mori H. From the sequence to cell modeling: comprehensive functional genomics in *Escherichia coli*. *J Biochem Mol Biol*. 2004; 37(1): 83-92.
- Nandi N, Sen A, Banerjee R, Kumar S, Kumar V, Ghosh AN, Das P. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Microbiology*. 2010; 156(7): 1926-41.
- Olivos-García A, Saavedra E, Ramos-Martínez E, Nequiz M, Pérez-Tamayo R. Molecular nature of virulence in *Entamoeba histolytica*. *Infect Genet Evol*. 2009; 9(6): 1033-7.
- Park E, Rapoport TA. Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu Rev Biophys*. 2012; 41: 21-40.
- Pritt BS, Clark CG. Amebiasis. *Mayo Clin Proc*. 2008; 83(10) :1154-9.
- Quan H, Fan G, Wang CC. Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site. *J Biol Chem*. 1995; 270(29): 17078-80.
- Raina S, Missiakas D. Making and breaking disulfide bonds. *Annu Rev Microbiol*. 1997; 51: 179-202.
- Ralston KS, Petri WA Jr. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol*. 2011; 27(6): 254-63.

- Ramos MA, Alagón A. Molecular cloning of a gene encoding a PDI-like protein from *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res. 2000; 31(4): S173-5.
- Ramos MA, Mares RE, Magaña PD, Ortega JE, Cornejo-Bravo JM. In silico identification of the protein disulfide isomerase family from a protozoan parasite. Comput Biol Chem. 2008; 32(1): 66-70.
- 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, 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.
- Rietsch A, Belin D, Martin N, Beckwith J. An *in vivo* pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(23): 13048-53.
- Salles JM, Salles MJ, Moraes LA, Silva MC. Invasive amebiasis: an update on diagnosis and management. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007; 5(5): 893-901.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 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.
- Sklar JG, Wu T, Kahne D, Silhavy TJ. Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. Genes Dev. 2007; 21(19): 2473-84.
- Skowronek K, Kasprzak AA. A two-plasmid system for independent genetic manipulation of subunits of homodimeric proteins and selective isolation of chimeric dimers. Anal Biochem. 2002; 300(2): 185-91.
- Smith DF, Whitesell L, Katsanis E. Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention. Pharmacol Rev. 1998; 50(4): 493-514.
- Solovyov A, Xiao R, Gilbert HF. Sulfhydryl oxidation, not disulfide isomerization, is the principal function of protein disulfide isomerase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 2004; 279(33): 34095-100.
- Stafford SJ, Lund PA. Mutagenic studies on human protein disulfide isomerase by complementation of *Escherichia coli dsbA* and *dsbC* mutants. FEBS Lett. 2000; 466(2-3): 317-22.

- Tan J, Lu Y, Bardwell JC. Mutational analysis of the disulfide catalysts DsbA and DsbB. *J Bacteriol.* 2005; 187(4): 1504-10.
- Toldo S, Severino A, Abbate A, Baldi A. The role of PDI as a survival factor in cardiomyocyte ischemia. *Methods Enzymol.* 2011; 489: 47-65.
- Vats D, Vishwakarma RA, Bhattacharya S, Bhattacharya A. Reduction of cell surface glycosylphosphatidylinositol conjugates in *Entamoeba histolytica* by antisense blocking of *E. histolytica* GlcNAc-phosphatidylinositol deacetylase expression: effect on cell proliferation, endocytosis, and adhesion to target cells. *Infect Immun.* 2005; 73(12): 8381-92.
- Vuori K, Pihlajaniemi T, Myllylä R, Kivirikko KI. Site-directed mutagenesis of human protein disulphide isomerase: effect on the assembly, activity and endoplasmic reticulum retention of human prolyl 4-hydroxylase in *Spodoptera frugiperda* insect cells. *EMBO J.* 1992; 11(11): 4213-7.
- Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. *Molecular Biology of the Gene.* 7th Edition, Benjamin Cummings Publisher, 2013.
- Weski J, Ehrmann M. Genetic analysis of 15 protein folding factors and proteases of the *Escherichia coli* cell envelope. *J Bacteriol.* 2012; 194(12):3225-33.
- WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull.* 1997; 18(1): 13-4.
- Wilson IW, Weedall GD, Hall N. Host-Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: what have we learned from their genomes? *Parasite Immunol.* 2012; 34(2-3): 90-9.
- Xiao R, Wilkinson B, Solovyov A, Winther JR, Holmgren A, Lundström-Ljung J, Gilbert HF. The contributions of protein disulfide isomerase and its homologues to oxidative protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2004; 279(48): 49780-6.
- Ximénez C, Morán P, Ramos F, Ramiro M. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Med Int Mex* 2007; 23(5): 398–407.
- Yerbury JJ, Stewart EM, Wyatt AR, Wilson MR. Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO Rep.* 2005; 6(12): 1131-6.
- 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.
- Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996; 236(2): 302-8.