

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



**Determinación de la capacidad moduladora de
péptidos con afinidad a la proteína disulfuro
isomerasa de humano (HuPDI)**

T E S I S

que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

presenta

QFB. Alexis Zarahy Minchaca Acosta

Tijuana, B.C.

Mayo de 2017.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 207

Tijuana, B. C., a 9 de mayo de 2017

C. Alexis Zarahy Minchaca Acosta
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

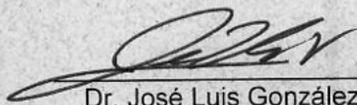
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por el C. Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra

Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema Determinación de la capacidad moduladora de péptidos con afinidad a la
proteína disulfuro isomerasa de humano (HuPDI).

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

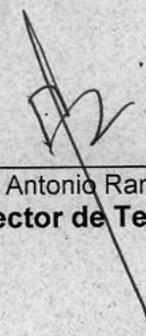
- I.- INTRODUCCION
- II.- ANTECEDENTES
- III.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS
- IV.- MATERIALES Y MÉTODOS
- V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- VI.- CONCLUSIONES
- VII.- BIBLIOGRAFÍA

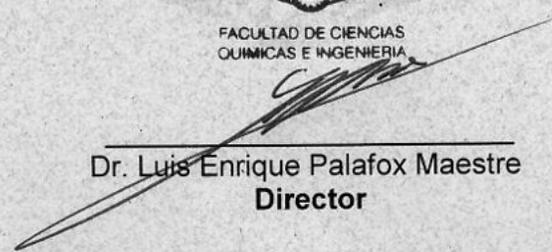

Dr. José Luis González Vázquez
Sub-Director Secretario

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA


Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Director de Tesis


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

Minchaca Acosta, Alexis Zarahy
**Determinación de la capacidad moduladora de péptidos con afinidad
a la proteína disulfuro isomerasa de humano (HuPDI)**
Tesis de Maestría

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- 1) el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales;
- 2) incluir la siguiente cita: "Minchaca Acosta, Alexis Zarahy. Determinación de la capacidad moduladora de péptidos con afinidad a la proteína disulfuro isomerasa de humano (HuPDI). Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Mayo de 2017."
- 3) enviar un correo electrónico a mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a mramos@uabc.edu.mx.

D.R. © Minchaca Acosta, Alexis Zarahy. Tesista.

D.R. © Ramos Ibarra, Marco Antonio. Director de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2017.

Tesis: Determinación de la capacidad moduladora de péptidos con afinidad a la proteína disulfuro isomerasa de humano (HuPDI)

Grado: Maestría en Ciencias, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

Institución: Universidad Autónoma de Baja California

Sustentante: Alexis Zarahy Minchaca Acosta

Fecha: Mayo de 2017

El presente trabajo de investigación fue realizado en el **Laboratorio de Biotecnología** de la **Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC**, bajo la dirección del profesor **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra**, con financiamiento del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**: Fondo Sectorial SEP-CONACYT para Investigación en Ciencia Básica (apoyo 155714) y Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE para Investigación en Salud (apoyo 161544), otorgados al Dr. Ramos Ibarra.

El **Manuscrito de Tesis** correspondiente fue **Revisado y Aprobado** por un **Comité Académico** conformado por los siguientes profesores:

Samuel Guillermo Meléndez López, Dr. (Presidente)

Marco Antonio Ramos Ibarra, Dr. (Secretario)

Rosa Elena Mares Alejandre, Dra. (Sinodal)

José Luis Mijangos Montiel, Dr. (Suplente)

Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz, M.C. (Suplente)

Durante mis estudios de posgrado (Maestría), fui **Becaria** del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT** (Folio 614379, periodo 08/2014 – 07/2016).

Durante el año 2016, recibí el respaldo académico y apoyo económico de la **Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas de la UABC** para **asistir y presentar** los resultados del presente estudio en **dos eventos académicos**: en junio, **Congreso Iberoamericano de Biotecnología: Biolberoamérica 2016**, llevado a cabo en la ciudad de Salamanca, España; y en noviembre, **XXXI Congreso Nacional de Bioquímica**, realizado en la ciudad de Aguascalientes, México.

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a la vida por la oportunidad de ser y estar; por las herramientas para seguir adelante, la claridad en mis objetivos y por colocar a las personas correctas en mi camino para ayudarme a cumplirlos.

Al Doctor Marco Ramos. Son muchísimos los motivos por los que he de agradecerle. Mencionando algunos, le agradezco tomar el reto de formarme como Maestro en Ciencias, compartir sus conocimientos con tanta pasión, tener la paciencia necesaria combinada con la dureza justa, su asesoría durante todo este trayecto, así como su constante inyección de energía para seguir durante esta travesía, ¡y su apoyo en lo que viene...! Como siempre, es un honor trabajar a su lado y ser parte de su grupo de trabajo.

A mis sinodales, Dra. Rosy, MC. Lilián, Dr. Sam, y Dr. Mijangos, por su entera disposición para apoyarme en este camino, por escucharme y aconsejarme atinadamente durante cada seminario, por las enriquecedoras discusiones que finalmente rindieron los frutos plasmados en este documento.

A mi familia (Mamá, Papá, Pato, Ana Karen) porque siempre han consentido mis sueños, y me han apoyado en cada una de las decisiones. Gracias por la fuerza y la positividad cada que llegó a cruzar por mi cabeza “tirar la toalla”. ¡Los adoro! Abuelo precioso, tesoro de mi corazón, gracias por tu amor y por aquellos domingos en que fuimos juntos a sacar pendientes del laboratorio. Ana Karen... no tengo espacio suficiente para agradecer tu apoyo incondicional, este logro es tan mío como tuyo.

Familia Minchaca Lucero, sin su apoyo, el cumplimiento de esta meta habría sido más complicado. Gracias por su apoyo incondicional y sus consejos. ¡Los quiero muchísimo! Gracias, gracias, gracias.

Luis y Lilián. Cuántas noches, cuánto estrés, cuántas risas, cenas, historias, viajes... en fin, muchas gracias por hacer más sencillo este camino. Por escucharme, por aconsejarme. Es un placer compartir el trabajo con ustedes. Pero sobre todo, muchas gracias por su amistad, eso es algo invaluable.

A mis amigos. Segunda tesis y aquí siguen. ¡Gracias! Pocas personas tienen la fortuna de rodearse de gente incondicional (durante 15 años!!!). Gracias por entender todos los “no puedo” y por no rendirse conmigo. Gracias por las discusiones enriquecedoras Diego, Héctor, John, Román, Gil. Frank, gracias por tu apoyo diario durante estos años. Los quiero mucho.

A mis compañeros de maestría y a todo el grupo de trabajo del laboratorio de Biotecnología. Gracias por todo el aprendizaje. Por las risas, las comidas y el gran esfuerzo diario para sacar adelante los proyectos. Celina, Vero y Jime, muchas gracias por todo su trabajo y aportación a este proyecto.

Gracias a todos los que contribuyeron de alguna manera en la realización de este proyecto. No puedo enlistar a cada uno, pero les agradezco desde el fondo de mi corazón.

Dedicatorias

Ana Karen,

Un gran pedazo de ti también está en este documento. Tu aliento, tu compañía, tus traspasadas, hambres y desvaríos. Tu amistad, tu hermandad, tu generosidad, tu apoyo incondicional. Inclusive, tu participación en lectura, revisión, crítica y discusión. Gracias por acompañarme a lo largo de este viaje. Eres una persona extraordinaria. Te quiero con todo mi corazón.

Contenido

| | |
|---|-----------|
| Agradecimientos | 5 |
| Dedicatorias | 6 |
| Contenido | 7 |
| Índice de figuras y tablas | 9 |
| Abreviaturas | 10 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 11 |
| 1.1. Biosíntesis y plegamiento de proteínas en organismos eucariotas | 11 |
| 1.1.1. Expresión y biosíntesis de proteínas en organismos eucariotas | 11 |
| 1.1.2. Plegamiento de proteínas en organismos eucariotas | 11 |
| 1.1.3. Plegasas y chaperonas moleculares del RE | 12 |
| 1.1.4. Mecanismo de respuesta a proteínas no plegadas | 13 |
| 1.1.5. Mecanismo de degradación asociado al RE | 14 |
| 1.2. PDI de humano (HuPDI) como proteína multifuncional | 15 |
| 1.2.1. Familia de PDI de humano | 15 |
| 1.2.2. HuPDI y su participación en el plegamiento de proteínas | 17 |
| 1.2.3. Particularidades estructura-función de HuPDI..... | 17 |
| 1.2.4. HuPDI como plegasa..... | 19 |
| 1.2.5. HuPDI como chaperona molecular..... | 21 |
| 1.3. HuPDI como diana terapéutica | 22 |
| 1.3.1. HuPDI en patologías humanas..... | 22 |
| 1.3.2. Moduladores de HuPDI | 24 |
| 2. ANTECEDENTES | 27 |
| 2.1. Diseño racional de fármacos | 27 |
| 2.2. Despliegue de péptidos en bacteriófagos | 27 |
| 2.3. Péptidos como moduladores enzimáticos | 28 |
| 2.4. Péptidos con afinidad a HuPDI | 30 |
| 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 32 |
| 3.1. Hipótesis | 32 |
| 3.2. Objetivo general | 32 |
| 3.3. Objetivos específicos | 32 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| 4.1. Materiales y reactivos | 33 |
| 4.1.1. Materiales y reactivos químico-biológicos | 33 |
| 4.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos..... | 33 |
| 4.1.3. Péptidos y oligonucleótidos sintéticos | 34 |
| 4.1.4. Estuches comerciales..... | 34 |
| 4.1.5. Bacterias y medios de cultivo | 35 |
| 4.1.6. Plásmidos comerciales..... | 35 |
| 4.2. Equipos y programas computacionales | 36 |
| 4.3. Protocolos generales | 37 |
| 4.3.1. Amplificación de ADN..... | 37 |
| 4.3.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa..... | 37 |
| 4.3.3. Secuenciación automática de ADN | 37 |
| 4.3.4. Preparación de bacterias competentes | 37 |
| 4.3.5. Transformación bacteriana mediante choque térmico..... | 38 |
| 4.3.6. Análisis de expresión de proteínas a mini-escala..... | 38 |
| 4.3.7. Fraccionamiento subcelular a mini-escala..... | 38 |
| 4.3.8. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.9. Cuantificación de proteínas por micro-Bradford | 39 |
| 4.3.10. Disolución y cuantificación de péptidos sintéticos | 39 |
| 4.4. Expresión y purificación de HuPDI recombinante | 40 |
| 4.4.1. pQHuDPI | 40 |
| 4.4.2. Expresión de HuPDI | 40 |
| 4.4.3. Lisis bacteriana en condiciones nativas | 40 |
| 4.4.4. Purificación de HuPDI | 40 |
| 4.5. Obtención de plásmidos pMHuPXXH | 41 |
| 4.5.1. Construcción de pMHuPXX | 41 |
| 4.5.2. Construcción de pMHuPXXH | 42 |
| 4.6. Expresión y purificación de HPXX-MBP-6xHis recombinantes | 43 |
| 4.6.1. Expresión de HPXX-MBP-6xHis | 43 |
| 4.6.2. Extracción de proteínas periplásmicas | 43 |
| 4.6.3. Purificación de las variantes HPXX-MBP-6xHis | 43 |
| 4.7. Determinación de CE₅₀ y K_D usando HPXX-MBP-6xHis | 44 |
| 4.7.1. Análisis preliminar del reconocimiento | 44 |
| 4.7.2. Determinación cuantitativa de la CE ₅₀ | 44 |
| 4.7.3. Determinación cuantitativa de la K _D | 45 |
| 4.8. Efecto modulador sobre la actividad reductasa de HuPDI | 45 |
| 4.8.1. Ensayo típico de actividad reductasa | 45 |
| 4.8.2. Análisis del efecto modulador sobre la actividad reductasa | 45 |
| 4.9. Efecto modulador sobre la actividad chaperona de HuPDI | 46 |
| 4.9.1. Ensayo típico de actividad chaperona | 46 |
| 4.9.2. Análisis del efecto modulador de los péptidos sobre la función chaperona | 47 |
| 4.10. Tratamiento de datos y análisis estadístico | 47 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 48 |
| 5.1. MBP como presentadora de heptapéptidos | 48 |
| 5.1.1. Inserción de la secuencia codificante para HPXX en pMAL-pIII | 49 |
| 5.1.2. Adición de 6xHis en el C-terminal de (pIII)HPXX-MBP | 50 |
| 5.1.3. Expresión periplásmica de las variantes HPXX-MBP-6xHis | 51 |
| 5.1.4. Purificación de las variantes HPXX-MBP-6xHis a mediana escala | 53 |
| 5.2. Purificación de HuPDI | 54 |
| 5.3. Péptidos sintéticos como alternativa | 55 |
| 5.4. HP73 presenta afinidad por HuPDI | 55 |
| 5.4.1. HPXX-MBP-6xHis presentan diferentes CE ₅₀ | 56 |
| 5.4.2. HP73-MBP-6xHis exhibe una CE ₅₀ en el orden micromolar | 57 |
| 5.4.3. HUP73 muestra una K _D en el orden micromolar | 57 |
| 5.5. HP04 y HP51 muestran efecto modulador sobre la actividad reductasa | 58 |
| 5.5.1. HUP24 no muestra efecto sobre la actividad reductasa | 59 |
| 5.5.2. HUP73 tiene un efecto modulador limitado | 60 |
| 5.5.3. HUP04 y HUP51 exhiben un efecto modulador positivo | 60 |
| 5.5.4. Análisis global | 61 |
| 5.5.5. HP04 y HP51 como moduladores positivos de HuPDI: el modelo propuesto | 62 |
| 5.6. Ningún péptido HPXX presenta efecto sobre la función chaperona | 64 |
| 6. CONCLUSIONES | 66 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 67 |

Índice de figuras y tablas

| | |
|---|----|
| Figura 1-1. Representación esquemática de los miembros de la familia de PDI de humano | 16 |
| Figura 1-2. Representación esquemática del arreglo de dominios de la proteína HuPDI | 17 |
| Figura 1-3. Conformaciones de los estados dinámicos de la proteína HuPDI | 18 |
| Figura 1-4. Representación gráfica de los mecanismos de oxidación y reducción, asistidos por oxidorreductasas típicas | 19 |
| Figura 1-5. Representación gráfica del mecanismo de isomerización, asistido por una oxidorreductasa típica | 20 |
| Figura 1-6. Representación gráfica de las aplicaciones terapéuticas de HuPDI como diana terapéutica | 25 |
| Figura 2-1. Representación gráfica del despliegue en superficie de péptidos fusionados a la proteína pIII | 28 |
| Figura 2-2. Esquema general de la técnica de despliegue de péptidos en superficie de bacteriófagos | 29 |
| Figura 2-3. Representación gráfica de la unión de los bacteriófagos que reconocen a HuPDI (representada por A ₄₅₀) con respecto a su título (UFP/mL) | 31 |
| Figura 4-1. Representación esquemática del plásmido pMAL-pIII | 36 |
| Figura 5-1. Diseño de mega-oligonucleótidos y secuencia nucleotídica del extremo 5' codificante para el N-terminal de la fusión pIII-MBP (contenida en pMAL-pIII) | 49 |
| Figura 5-2. Diseño del oligonucleótido MBPC6XHR y secuencia nucleotídica del extremo 3' codificante para el C-terminal de MBP, contenida en el plásmido pMAL-pIII | 50 |
| Figura 5-3. Representación esquemática del vector pMHuP73H, que expresa la proteína periplásmica recombinante HP73-MBP-6xHis | 51 |
| Figura 5-4. Secuencia nucleotídica de las regiones 5' y 3' de los plásmidos pMHuPXXH | 52 |
| Figura 5-5. Análisis de expresión a mini-escala y fraccionamiento subcelular de cultivos bacterianos portadores de plásmidos pMHuPXXH | 53 |
| Figura 5-6. Análisis de las fracciones de purificación de la proteína MBP-6xHis mediante cromatografía de afinidad a níquel | 54 |
| Figura 5-7. Análisis preliminar (comparativo) dosis-respuesta del reconocimiento HPXX-MBP-6xHis | 56 |
| Figura 5-8. Estimación de la CE ₅₀ del péptido HP73 mediante un ensayo de reconocimiento simple HuPDI:HP73-MBP-6xHis | 57 |
| Figura 5-9. Estimación de la K _D del péptido HP73 mediante un ensayo de reconocimiento competitivo HuPDI:(HUP73/HP73-MBP-6xHis) | 58 |
| Figura 5-10. Efecto modulador de HUP24 sobre la actividad reductasa de HuPDI | 59 |
| Figura 5-11. Efecto modulador de HUP73 sobre la actividad reductasa de HuPDI | 59 |
| Figura 5-12. Efecto modulador de HUP04 sobre la actividad reductasa de HuPDI | 60 |
| Figura 5-13. Efecto modulador de HUP51 sobre la actividad reductasa de HuPDI | 60 |
| Figura 5-14. Análisis global del efecto modulador de los péptidos HUPXX sobre la actividad reductasa de HuPDI | 61 |
| Figura 5-15. Modelo propuesto de interacción péptido:proteína y efecto sobre la estructura de HuPDI | 63 |
| Figura 5-16. Análisis del efecto modulador de los péptidos HUPXX sobre la actividad chaperona de HuPDI | 64 |
| Tabla 1-1. Inhibidores y otros moduladores de HuPDI | 26 |
| Tabla 2-1. Secuencias de heptapéptidos con potencial de unión a HuPDI | 30 |
| Tabla 4-1. Secuencia de los péptidos y oligonucleótidos sintéticos utilizados | 34 |
| Tabla 4-2. Descripción de las cepas de <i>E. coli</i> utilizadas | 35 |
| Tabla 5-1. Resultados de la cuantificación de las proteínas HPXX-MBP-6xHis | 54 |
| Tabla 5-2. Resultados de la cuantificación de los péptidos sintéticos | 55 |
| Tabla 5-3. Resultados globales del análisis del efecto modulador de los péptidos HUPXX | 61 |
| Tabla 5-4. Categorización de los péptidos de unión a HuPDI, en base a su efecto modulador, y análisis de sus propiedades físico-químicas inferidas | 62 |

Abreviaturas

| Abreviatura | Significado |
|-------------|---|
| AR | Actividad reductasa |
| BME | Beta-mercaptoetanol |
| BrEt | Bromuro de etidio |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CI50 | Concentración inhibitoria media |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNTB | 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzónico), ácido |
| DO | Densidad óptica |
| DPBS | Amortiguador de fosfatos salino, modificación de Dulbecco |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilen-diamino-tetra-acético |
| ELISA | Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima |
| FC | Fracción citosólica |
| FP | Fracción periplásmica |
| GPI | Glucosilfosfatidilinositol |
| HuPDI | Proteína disulfuro isomerasa de humano |
| HP | Heptapéptido |
| IPTG | Isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido |
| K_D | Constante de disociación |
| M, mM | Molar, milimolar |
| MBP | Proteína de unión a maltosa |
| NTA | Ácido nitrilo-tri-acético |
| <i>Pfu</i> | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SEM | Error estándar de la media |
| TA | Temperatura ambiente |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina |
| TEX | Tris, EDTA, Tritón |
| TMB | Tetrametilbencidina |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| POD | Peroxidasa de rábano |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biosíntesis y plegamiento de proteínas en organismos eucariotas

1.1.1. Expresión y biosíntesis de proteínas en organismos eucariotas

La clave para el funcionamiento adecuado de una célula radica en la producción correcta de sus proteínas [Kim *et al.*, 2013b]. Desde un punto de vista robusto, la información genética fluye: ADN → ARN → Proteína. Dentro del núcleo, la transcripción es el proceso inicial de copiado de la información, produciendo una molécula de ARN mensajero (ARNm), a partir de una secuencia molde (ADN). Posteriormente, el ARNm es transportado hacia el citosol, donde es reconocido por los ribosomas, y su mensaje es decodificado mediante un proceso de traducción, dando lugar a una proteína. Durante la biosíntesis de proteínas en los ribosomas (traducción génica), el mensaje se descodifica en bloques de tres nucleótidos (codones). Cada aminoácido es incorporado a la cadena polipeptídica naciente gracias al reconocimiento específico entre un codón (en el ARNm) y una secuencia anti-codón presente en el ARN de transferencia (ARNt). Cada molécula de ARNt funciona como un adaptador molecular, ya que porta el respectivo aminoácido y lo traslada hacia el ribosoma, facilitando la formación del enlace peptídico [Scheper *et al.*, 2007].

1.1.2. Plegamiento de proteínas en organismos eucariotas

Como resultado final de la biosíntesis de proteínas se obtiene una cadena polipeptídica lineal (estructura primaria). Para cumplir eficientemente con su función, el polipéptido debe adquirir una estructura tridimensional que favorezca su estabilidad termodinámica [Kim *et al.*, 2013b]. Este proceso es denominado plegamiento proteico. En gran medida, este proceso está regido por la secuencia lineal de aminoácidos. Curiosamente, algunos polipéptidos poseen la capacidad de adquirir espontáneamente su estructura nativa inmediatamente después de su biosíntesis [Dobson, 2003]. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el polipéptido suele ensayar varios estados intermediarios previos a adoptar su estructura tridimensional nativa. Para facilitar el proceso, y reducir el gasto energético, las células han perfeccionado una maquinaria molecular, conformada por chaperonas y plegasas, que asiste al plegamiento de proteínas [Wang y Tsou, 1998]. Dependiendo del destino celular, el plegamiento asistido puede llevarse a cabo en dos compartimientos subcelulares: el citosol (proteína citosólica), o el retículo endoplásmico (proteína integral o de secreción).

Plegamiento en el citosol. Un alto porcentaje de proteínas llevará a cabo su función en el citoplasma celular. Por tal motivo, la biosíntesis y el plegamiento deben suceder en ese compartimento. Durante la biosíntesis en ribosomas libres, el polipéptido naciente es protegido de la degradación (por acción de proteasas) y de la agregación (por interacción de regiones hidrofóbicas expuestas) por distintas chaperonas [Vabulas *et al.*, 2010] Además, el ambiente reductor del citosol promueve el estado reducido de los residuos de Cys; por esta razón, la mayoría de las proteínas citosólicas carecen de enlaces disulfuro que estabilicen su estructura tridimensional [Cumming *et al.*, 2004].

Plegamiento en el retículo endoplásmico (RE). Cerca de un tercio de las proteínas expresadas en una célula eucariota son transportadas a través del RE [Braakman y Bulleid, 2011]. Comúnmente, este compartimento recibe proteínas residentes o en tránsito hacia compartimientos posteriores en la ruta de secreción (p. ej., aparato de Golgi). El transporte y translocación del polipéptido naciente, desde el citosol hacia el lumen del RE, están mediados por dos factores moleculares: (1) la presencia de una secuencia de aminoácidos en el N-terminal del polipéptido naciente que funciona como señal y promueve el traslado del complejo ARNm-ribosoma-polipéptido hacia la membrana del RE, y (2) una maquinaria de translocación (comúnmente denominada como translocón), ubicada en la membrana del RE, que reconoce a ese complejo y favorece el paso del polipéptido naciente hacia el lumen del compartimento [Zimmermann *et al.*, 2011]. Durante la translocación, el polipéptido es reconocido y protegido por chaperonas residentes, como BiP (del inglés *Immunoglobulin-Binding Protein*), para evitar la agregación y asistir su plegamiento. Además, otras modificaciones bioquímicas, asistidas por proteínas residentes, son requeridas para el proceso de maduración del polipéptido; p. ej., hidrólisis de la secuencia señal, adición de azúcares (N-glicosilación), anclaje a GPI, y formación de enlaces disulfuro [Araki y Nagata, 2011]. El plegamiento y la maduración en el RE son procesos esenciales para el transporte ulterior de proteínas hacia compartimientos posteriores en la ruta de secreción [Nishikawa *et al.*, 2005].

1.1.3. Plegasas y chaperonas moleculares del RE

En el lumen del RE se llevan a cabo exclusivamente las modificaciones bioquímicas requeridas para que la proteína adopte su estructura funcional. Una maquinaria especializada, conformada por chaperonas y plegasas, favorece el plegamiento durante y después de la traducción, previniendo que el polipéptido se retenga como un intermediario no funcional [Braakman y Bulleid, 2011]. En tanto las plegasas participan directamente en el proceso, catalizando cambios estructurales en el polipéptido, las chaperonas incrementan su

efectividad, asistiendo la conformación nativa e impidiendo la adopción de otras (no nativas) [Dobson, 2003].

Chaperonas. Las chaperonas moleculares del RE más estudiadas son las proteínas de choque térmico o Hsp (del inglés *Heat Shock Proteins*). De éstas, la más conocida es BiP (una Hsp de 70 kDa, Hsp70), que funciona como facilitador de la translocación de péptidos (durante su paso por el translocón), asiste el plegamiento *de novo*, y controla la degradación de sus clientes [Finka *et al.*, 2015]. Además, algunos de estos procesos pueden ser catalizados con apoyo de co-chaperonas y consumo energético; p. ej., la participación de una Hsp40 estimula la unión BiP-ATP y la subsecuente hidrólisis del ATP induce cambios en la estructura de BiP, favoreciendo la unión y liberación del cliente [Yang *et al.*, 2015]. Además de las Hsp, existen otras chaperonas moleculares, como las lectinas calnexina (CNX, proteína transmembranal tipo I), y calreticulina (CRT, proteína soluble), que participan en el plegamiento y control de calidad de glicoproteínas no plegadas; específicamente, reteniendo a las conformaciones no nativas, mediante unión con los residuos de azúcar [Williams, 2006], y favoreciendo la formación de enlaces disulfuro [Pearse y Hebert, 2011], asegurando el procesamiento apropiado de las glicoproteínas que transitan por el RE en ruta hacia el siguiente compartimento [Braakman y Hebert, 2013].

Plegasas. El RE contiene un ambiente subcelular oxidante, el cual favorece la formación de enlaces disulfuro catalizada por oxidorreductasas residentes, como la familia PDI (proteína disulfuro isomerasas) [Gidalevitz *et al.*, 2013]. Además, sustenta la isomerización cis/trans en los enlaces peptídicos que comparten a prolina por acción de una PPI (peptidil-prolil (cis/trans) isomerasa) [Braakman y Hebert, 2013]. Asimismo, contiene un complejo encargado de la adición de oligosacáridos a residuos de asparagina (N-glicosilación), denominado OST (oligosacaril transferasa) [Xu y Ng, 2015]. La N-glicosilación es una modificación post-traducciona clave en la maduración de proteínas y esencial para el control de calidad del RE [Braakman y Bulleid, 2011].

1.1.4. Mecanismo de respuesta a proteínas no plegadas

A pesar de ser un proceso altamente controlado, el plegamiento de proteínas puede ocurrir de forma incorrecta. Por ello, el RE precisa de un estricto mecanismo de control que garantiza el equilibrio entre el plegamiento y la biosíntesis, secreción, y degradación de sus proteínas [Braakman y Bulleid, 2011]. En este mecanismo de proteostasis celular, tanto las chaperonas moleculares como los sistemas proteolíticos participan activamente [Rodrigo-Brenni *et al.*, 2014]. De esta manera, sólo las proteínas correctamente plegadas pueden

incorporarse en vesículas y abandonar ese compartimiento subcelular [Walter y Ron, 2011]. Sin embargo, cuando se presenta un desequilibrio (con potencial proteotóxico) por acumulación de proteínas no plegadas, el RE activa un mecanismo de respuesta denominado UPR (del inglés *Unfolded Protein Response*) [Nishikawa *et al.*, 2005], el cual permite: (i) incrementar el tamaño del compartimiento, (ii) incrementar las concentraciones de chaperonas y plegasas, y (iii) disminuir la translocación de polipéptidos.

La activación de UPR por estrés en el RE está mediada por tres sensores moleculares: IRE1, PERK, y ATF6. IRE1 es una proteína transmembranal con un dominio luminal (sensor) que se une a BiP y un dominio citosólico (efector) que funciona como cinasa y endorribonucleasa. La activación de IRE1 induce la sobreexpresión de chaperonas y plegasas mediante la producción activa del factor de transcripción XBP1. Este es el mecanismo UPR principalmente conservado a lo largo de la escala evolutiva [Walter y Ron, 2011]. PERK también es una proteína transmembranal con un dominio luminal (sensor) que reconoce a proteínas no plegadas y un dominio citosólico (efector) que funciona como cinasa [Gardner *et al.*, 2013]. La activación de PERK promueve la fosforilación de la subunidad α del factor eIF2, lo cual inhibe la iniciación de la traducción y reduce la carga de translocación de polipéptidos al RE [Cui *et al.*, 2011]. Simultáneamente, se favorece la traducción del factor de transcripción ATF4, el cual induce la producción de dos proteínas: GADD34, que funciona como un circuito de regulación negativa; y CHOP, que regula componentes de la vía de apoptosis. En consecuencia, una estimulación prolongada de PERK resulta en una señalización proapoptótica para la célula [Gardner *et al.*, 2013]. ATF6 es un factor de transcripción que inicialmente se sintetiza como proteína transmembranal (en el RE) con el dominio de unión a ADN (N-terminal) situado en hacia el citosol [Shen y Prywes, 2005]. ATF6 puede inducir tanto la biosíntesis de lípidos (promoviendo la síntesis de membrana de RE) como la producción de chaperonas (incluyendo BiP y PDI) Durante la activación de la UPR, ATF6 migra hacia el aparato de Golgi, donde es liberado por acción de una proteasa, y posteriormente migra hacia el núcleo, donde se une a elementos de respuesta al estrés del RE, promoviendo la transcripción de chaperonas moleculares [Chiang *et al.*, 2016].

1.1.5. Mecanismo de degradación asociado al RE

El mecanismo ERAD (del inglés *ER-Associated Degradation*) se encarga de la proteólisis de polipéptidos que, después de un tiempo prudente, no han logrado plegarse y adoptar su conformación nativa en el RE [Smith *et al.*, 2011]. ERAD actúa en conjunto con el sistema UPS (del inglés *Ubiquitin Proteasome System*), pues los sustratos de ERAD son retro-

translocados del lumen del RE hacia el citosol, para ser degradados por el proteasoma [Walter y Ron, 2011], que reconoce a sustratos etiquetados con una cadena de poli-ubiquitina (añadida por HRD-3, una ubiquitin ligasa del RE) [Smith *et al.*, 2011].

La maquinaria de plegamiento de proteínas juega un papel clave en el mecanismo ERAD. Por ejemplo, las chaperonas CNX y CRT se mantienen unidas a glicoproteínas mal plegadas, intentando revertir el proceso; sin embargo, una tasa lenta de replegamiento conduce a la separación de las chaperonas y el subsecuente marcaje (ubiquitinación) para su degradación [Meusser *et al.*, 2005]. La chaperona BiP y la plegasa PDI también exhiben capacidad de trasladar polipéptidos mal plegados (por exposición de regiones hidrofóbicas o estado redox inadecuado) a la degradación vía ERAD [Nishikawa *et al.*, 2005]. Por otro lado, ERAD es muy importante en células que no cuentan con un mecanismo UPR, permitiéndoles reducir o evadir los daños citotóxicos que genera el estrés del RE [Walter y Ron, 2011].

1.2. PDI de humano (HuPDI) como proteína multifuncional

1.2.1. Familia de PDI de humano

La formación correcta de enlaces disulfuro es una modificación post-traducciona (MPT) clave en la adopción de la estructura nativa de un polipéptido [Galligan y Petersen, 2012]. Se estima que una tercera parte de las proteínas que son translocadas al RE y atraviesan la vía secretora requieren al menos un enlace disulfuro que estabilice su estructura [Appenzeller-Hergog y Ellgaard, 2008]. La eficiencia de esta MPT depende de dos procesos bioquímicos claramente establecidos, la oxidación correcta de residuos de Cys y la isomerización de enlaces disulfuro incorrectamente formados [Ellgaard y Ruddock, 2005].

A pH fisiológico, las reacciones para la formación correcta de enlaces disulfuro suceden muy lentamente; por eso, es factible suponer que ocurren de manera catalizada. Las enzimas PDI son oxidorreductasas eucarióticas que catalizan la formación y rearreglo de enlaces disulfuro. En humanos, los miembros de la familia de PDI son las plegasas encargadas de llevar a cabo esta MPT [Benham, 2012].

A la fecha, se han identificado 21 miembros de la familia PDI de humano. Principalmente, son proteínas residentes del RE, aunque se ha reportado su localización en membrana celular y espacio extracelular (secretada). La Figura 1-1 muestra la diversidad estructural que caracteriza a esta familia, lo que además advierte su multifuncionalidad [Galligan y Petersen, 2012]. No obstante, como característica común se ha destacado la

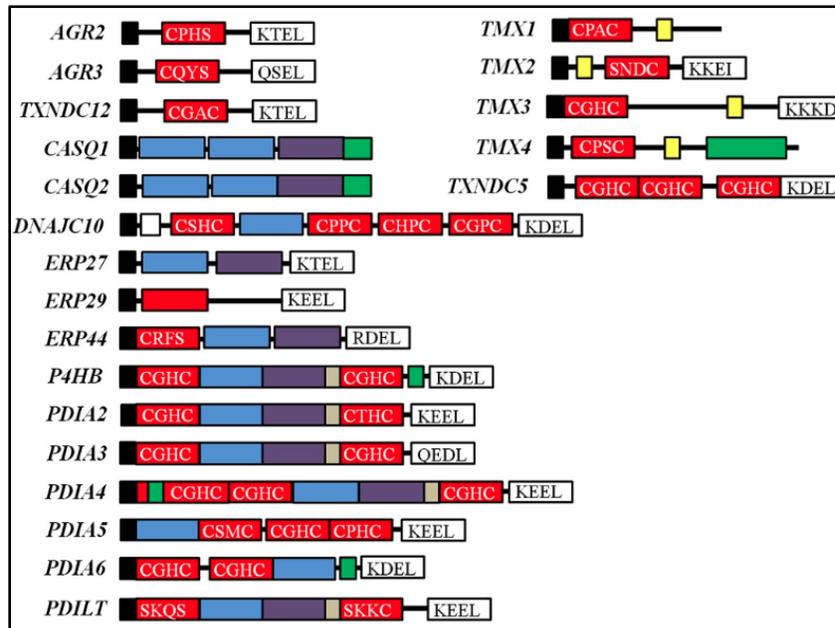


Figura 1-1. Representación esquemática de los miembros de la familia de PDI de humano.

Del lado izquierdo se presenta el nombre asignado a cada proteína PDI de humano. Los dominios catalíticamente activos (a) se muestran en recuadros rojos, en tanto los no activos (b) en azul y morado. La secuencia señal (N-terminal) se indica en un recuadro negro. La secuencia canónica de retención y recuperación del RE se presentan en un recuadro blanco. Tomada y conservada en su formato original de Galligan y Petersen (2012).

presencia de al menos un dominio parecido a tiorredoxina, distinguido por su firma estructural ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\alpha_3\beta_4\beta_5\alpha_4$) [Kemnick *et al.*, 1997].

De acuerdo a su actividad catalítica (oxidoreductasa), los dominios parecidos a tiorredoxina se clasifican en: a (activos) y b (no activos), en referencia primordial a la presencia o ausencia del motivo estructural CXXC, donde XX corresponde a cualquier par de aminoácidos (pero con alta preferencia a GH) [Kemnick *et al.*, 1997]. Las reacciones bioquímicas que pueden catalizar las PDI son: oxidación (formación), reducción (ruptura), e isomerización (re-arreglo) de enlaces disulfuro [Okumura *et al.*, 2015]. Curiosamente, aunque el dominio b carece de actividad catalítica, conserva la estructura típica de un dominio parecido a tiorredoxina [Serve *et al.*, 2010]. Además, la baja similitud de secuencia primaria, entre dominios b de la misma familia PDI, favorece una variabilidad intrínseca en su estructura terciaria, lo cual puede obrar en beneficio de sus capacidades de unión a sustrato o de interacción con otras proteínas [Kozlov *et al.*, 2010], aún más, aparentemente, su posicionamiento estructural, con respecto a los dominios a, contribuye a las funciones enzimáticas [Appenzeller-Hergog y Ellgaard, 2008].

Aunque se pensaría que todos los miembros de la familia PDI de humano pueden realizar las mismas reacciones, la realidad es que algunos de ellos sólo comparten homología estructural. Inclusive, para algunos todavía se ignoran sus habilidades catalíticas, su localización subcelular, o su participación en el plegamiento oxidativo [Hebert y Molinari, 2007].

1.2.2. HuPDI y su participación en el plegamiento de proteínas

El miembro más ampliamente estudiado de la familia PDI de humano es la proteína P4HB, también denominada PDIA1 y ampliamente conocida como PDI (HuPDI), la cual fue el primer catalizador de enlaces disulfuro identificado. HuPDI es una proteína multifuncional que exhibe principalmente actividades catalíticas, como oxidorreductasa, y no catalíticas, como chaperona; aunque otras funciones también han sido reportadas (p. ej., anti-chaperona y S-nitrosilasa). Asimismo, ha sido identificada como subunidad o componente de diferentes complejos proteicos; por ejemplo, subunidad β de la prolil 4-hidroxilasa o componente del complejo de transferencia microsomal de triglicéridos [Galligan y Petersen, 2012]. Por otro lado, es una proteína ubicua en tejidos humanos y muy abundante (hasta 0.4% del total de proteínas) en células con alta actividad secretora [Wang *et al.*, 2015]. Aunque es residente del RE, ha sido ubicada en otros compartimentos, como mitocondrias, núcleo, citosol, superficie celular, y medio extracelular [Wang *et al.*, 2015].

1.2.3. Particularidades estructura-función de HuPDI

HuPDI es una proteína de 57 kDa, constituida por 508 residuos (UniProtKB P07237). Como se muestra en la Figura 1-2, consta de 4 dominios tiorredoxina: a, b, b', y a'; una región espaciadora (nombrada *linker-x*, ubicada entre b' y a'), y un dominio C-terminal (rico en residuos ácidos, presuntamente involucrados en la unión a calcio). Además, posee una secuencia N-terminal hidrofóbica, que funciona como señal de localización en el RE, y el tetrapeptido KDEL en el extremo C-terminal, que funciona como secuencia de retención y recuperación en el RE [Kahn y Mutus, 2014].

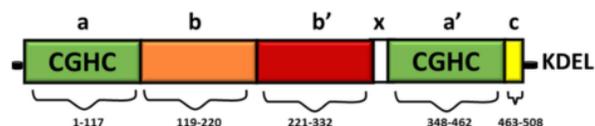


Figura 1-2. Representación esquemática del arreglo de dominios de la proteína HuPDI.

Los dominios activos (a) se muestran en verde, denotando el motivo catalítico, en tanto los no activos (b) en naranja y rojo. La región del *linker-x*, ubicada entre b' y a', se presenta en blanco. El dominio c, seguido de la secuencia canónica de retención y recuperación del RE, se indica en amarillo. Tomada y conservada en su formato original de Parakh y Atkin (2015).

Aún más, a partir de la elucidación de la estructura cristalográfica (resolución a 2.5 Å) de los estados dinámicos de la proteína HuPDI [Wang *et al.*, 2013], fue posible identificar particularidades estructurales relacionadas con su estado redox y su función fisiológica. Como se puede apreciar en la Figura 1-3, de manera global, el arreglo tridimensional adoptado por los estados dinámicos de HuPDI asemejan una herradura (U), con los dominios catalíticos (a y a') uno frente al otro, y los dominios no catalíticos (b y b') en la base. Además, se puede observar que los motivos catalíticos (CGHC), ubicados en el N-terminal de la hélice α_2 , se disponen frente a frente guardando distancias significativamente diferentes. La posición de ambos residuos de Cys es importante para la función catalítica. Específicamente, el residuo N-terminal es más reactivo, ya que tiene un pKa más bajo de lo usual (favorecido por su microambiente) que asiste la formación del anión tiolato (un potente nucleófilo) a pH fisiológico [Karala y Ruddock, 2010]. En contraste, los dominios b participan en la unión al sustrato, por lo que han sido asociados a la función chaperona; particularmente el dominio b', ya que exhibe un bolsillo hidrofóbico (con potencial de unión al sustrato) precisamente en la posición donde habitualmente se ubica el sitio activo del dominio tioredoxina [Ellgaard y Ruddock, 2005].

Otra particularidad destacable es la secuencia denominada *linker-x*, ubicada entre los dominios b' y a', que proporciona dinamismo estructural a la proteína. En relación a esto, un estudio proteolítico demostró que la región más lábil de HuPDI es la extensión x-a', correlacionando con la movilidad del *linker-x* y su capacidad de interactuar con el bolsillo hidrofóbico del dominio b' [Wang *et al.*, 2010].

De manera notable, el dinamismo estructural de HuPDI favorece dos conformaciones: cerrada (o reducida) y abierta (u oxidada). En la conformación cerrada (Figura 1-3A), el dominio a' se

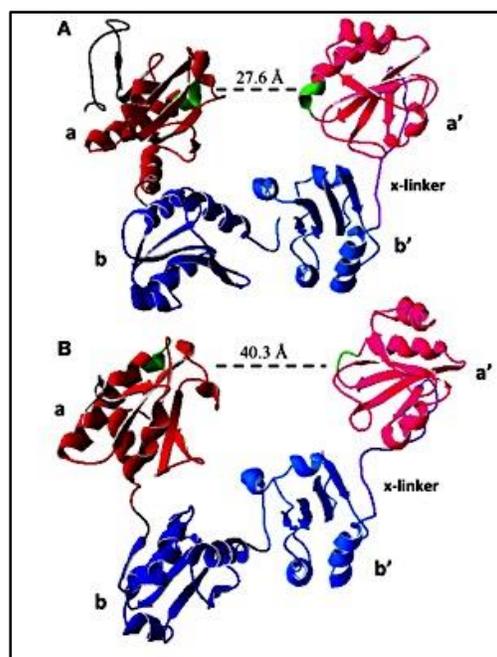


Figura 1-3. Conformaciones de los estados dinámicos de la proteína HuPDI.

Representación de listones del arreglo tridimensional determinado para las conformaciones dinámicas de la proteína HuPDI en su estado reducido (o cerrado) [A], y oxidada (o abierto) [B]. En cada conformación, se denota la posición de los dominios y se indica la distancia entre los sitios activos de los dominios a. Tomada y conservada en su formato original de Kahn y Mutus (2014).

ubica fuera del plano, con respecto a los otros, y muestra un giro de 45° , acercando a los dos sitios catalíticos (27.6 \AA), que a la vez exhiben sus residuos de Cys en estado reducido. Por el contrario, en la conformación abierta (Figura 1-3B), todos los dominios se disponen en el mismo plano y exhibe una región hidrofóbica más amplia; además, los sitios activos muestran una mayor distancia (40.3 \AA) entre ellos y sus residuos catalíticos se encuentran en estado oxidado. Cabe mencionar que el estado redox del dominio α' limita el movimiento y determina la conformación estructural de la proteína [Wang *et al.*, 2015].

1.2.4. HuPDI como plegasa

HuPDI es una proteína multifuncional que exhibe actividades oxidorreductoras esenciales para el plegamiento de proteínas. Como plegasa, participa en la formación y rearreglo de enlaces disulfuro mediante sus actividades catalíticas típicas: oxidasa, reductasa, e isomerasa.

Oxidasa y reductasa. Estas actividades son catalíticamente independientes. Mientras la oxidasa cataliza la formación de enlaces disulfuro, la reductasa cataliza la ruptura (Figura 1-4). Estas dependen de los residuos de Cys, presentes en el sitio activo (CXXC) de los dominios funcionales, que ciclan entre los estados ditiol-disulfuro, transfiriendo equivalentes redox a sus sustratos [Wang *et al.*, 2015]. En células de humano, la plegasa HuPDI participa en ambas reacciones. Durante la oxidación, la plegasa en su estado oxidado (HuPDI_{ox}) se conjuga con un grupo tiol libre del sustrato, formando un enlace intermediario plegasa-sustrato, el cual se resuelve mediante la participación de un

segundo grupo tiol libre del sustrato, formando un nuevo enlace disulfuro en el sustrato y liberando a la plegasa en su estado reducido (HuPDI_{red}) [Xu *et al.*, 2014]. En el RE, la reoxidación de HuPDI es catalizada por la proteína Ero1, que además ayuda a mantener el equilibrio entre los estados oxidado y reducido de la plegasa. En mamíferos, Ero1 se expresa en dos isoformas, Ero1 α y Ero1 β . La isoforma Ero1 α , principalmente expresada, exhibe alta afinidad por el dominio α' en su estado

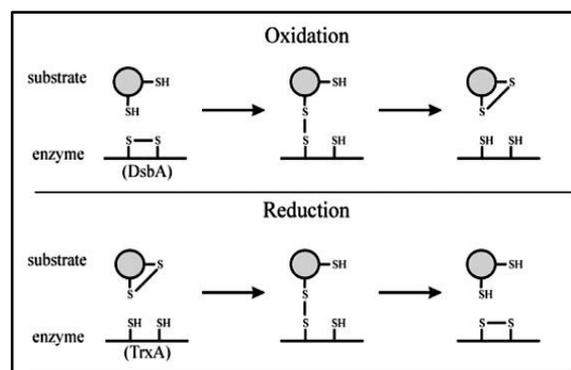


Figura 1-4. Representación gráfica de los mecanismos de oxidación y reducción, asistidos por oxidorreductoras típicas.

Respectivamente, las proteínas bacterianas DsbA y TrxA actúan como oxidasa y reductasa. Tomada y conservada en su formato original de Berkmen (2012).

reducido y cataliza la reoxidación de las cisteínas catalíticas [Wang *et al.* 2015], utilizando al cofactor FAD (como agente redox) y a O₂ (como aceptor final de electrones) para generar H₂O₂ [Mossuto *et al.*, 2013]. De esta manera, el dominio a' (oxidado) puede transferir su enlace disulfuro al dominio a (reducido); rindiendo, ahora, un dominio a oxidado y dominio a' reducido, lo cual promueve la repetición del ciclo [Benham *et al.*, 2013]. Durante la reducción, en contraste, la plegasa en su estado reducido (HuPDI_{red}) se condensa, vía un tiol libre de una cisteína catalítica, con un enlace disulfuro del sustrato, generando un enlace intermediario plegasa-sustrato, que se resuelve mediante la participación del tiol libre de la otra cisteína catalítica, favoreciendo la formación de un enlace disulfuro en el sitio catalítico de la plegasa (HuPDI_{ox}) y liberando al sustrato en su estado reducido [Wang *et al.*, 2015]. Por otro lado, se ha propuesto un intercambio tiol-disulfuro entre los distintos miembros de la familia de PDI como proceso bioquímico para mantener el estado redox de cada proteína; sin embargo, se requieren estudios que validen esa hipótesis [Oka *et al.*, 2015].

Isomerasa. Durante la biosíntesis o el plegamiento oxidativo de proteínas que contienen enlaces disulfuro entre cisteínas no consecutivas, existe la posibilidad de la formación de enlaces disulfuro incorrectos [Feige y Hendershot, 2011]. Ante la presencia de tal condición, una oxidorreductasa con actividad isomerasa puede actuar catalizando el rearrreglo de los enlaces disulfuro erróneamente formados (Figura 1-5). En este sentido, se ha postulado que la plegasa HuPDI puede participar como disulfuro isomerasa a través de dos vías: (1) isomerización directa, resolviendo el rearrreglo en una sola etapa, o (2) reducción-oxidación, mediante etapas independientes de hidrólisis y condensación. Para la isomerización directa, el residuo de Cys ubicado en la posición N-terminal (del motivo catalítico CXXC) se encuentra como anión tiolato (pKa de 6.7), el cual funciona como nucleófilo sobre el enlace disulfuro incorrecto y, después de romperlo, forma un enlace intermediario plegasa-sustrato [Hudson *et al.*, 2015]. Enseguida, un tiol libre de otro residuo de Cys del sustrato resuelve ese enlace intermolecular, liberando a la plegasa en su estado inicial (HuPDI_{red}) y generando un nuevo enlace disulfuro en el sustrato [Kersteen y Raines, 2003]. Para la reducción-oxidación, la actividad reductasa de HuPDI_{red} rompe inicialmente los enlaces disulfuro incorrectos y libera al sustrato; posteriormente, la actividad oxidasa de

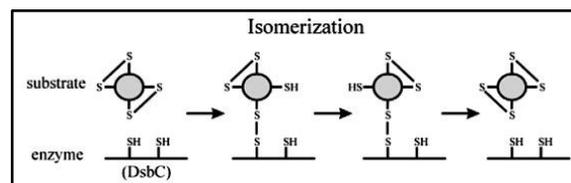


Figura 1-5. Representación gráfica del mecanismo de isomerización, asistido por una oxidorreductasa típica.

La proteína bacteriana DsbC actúa como isomerasa. Tomada y conservada en su formato original de Berkmen (2012).

HuPDI_{ox} reordena y cataliza la formación nuevos enlaces disulfuro, capturando al sustrato y buscando su conformación nativa. Este mecanismo ha sido evidenciado durante el replegamiento de la ribonucleasa con enlaces disulfuro incorrectamente formados [Kersteen y Raines, 2003]. En relación a la participación de los dominios estructurales en las actividades catalíticas de HuPDI, se ha reportado que ambos dominios activos (a y a') pueden catalizar la oxidación de sustratos por sí mismos (en ausencia de otros dominios). Sin embargo, se ha observado que la actividad isomerasa depende de la estructura completa, con requerimiento esencial del dominio b', lo que indica que esta función depende ampliamente de la unión al sustrato [Ellgaard y Ruddock, 2005]. Por otro lado, se reportado que el estado redox de HuPDI también participa en su capacidad para el reconocimiento a sustratos. Por ejemplo, el estado oxidado reconoce a sustratos desplegados, los cuales posteriormente son liberados por el estado reducido (a consecuencia de la oxidación). En cambio, el estado reducido reconoce a intermediarios de plegamiento, actúa sobre estos como reductasa o isomerasa, y los libera como sustratos para oxidación o proteínas correctamente plegadas. Curiosamente, se ha sugerido que la actividad oxidorreductasa de los dominios funcionales es asimétrica, ya que el dominio a' (mayormente oxidado, por acción de Ero1 α) participa primordialmente como oxidasa y el dominio a como isomerasa [Wang *et al.*, 2015].

1.2.5. HuPDI como chaperona molecular

Además de su actividad como oxidorreductasa, HuPDI realiza funciones no catalíticas; por ejemplo, como chaperona molecular. Esta actividad ha sido asociada a su función como subunidad β de la prolil 4-hidroxilasa (P4H) y del complejo microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP); además, de mostrar capacidad para mantener la estructura y actividad del receptor de estrógenos ER α [Wang *et al.*, 2015]. Independiente a las exigencias de plegamiento del sustrato, HuPDI ha demostrado poseer la habilidad de unirse a sustratos mal plegados y evitar su agregación [Wang *et al.*, 2015]. Aún más, esta función está altamente ligada a los dominios no catalíticos (b y b'); especialmente al dominio b', el cual es esencial y suficiente para la unión a péptidos pequeños (10-15 aminoácidos). No obstante, se ha observado que la unión de sustratos de mayor peso molecular requiere de la participación de varios dominios (p. ej., abb' o bb'c) [Gorres y Raines, 2001]. Por otro lado, también el estado redox de HuPDI juega un papel importante en la actividad chaperona, ya que la conformación oxidada (abierta) favorece la unión a sustratos no plegados que exhiben regiones hidrofóbicas [Wang *et al.*, 2015].

1.3. HuPDI como diana terapéutica

1.3.1. HuPDI en patologías humanas

En consideración a la importancia de las actividades desempeñadas por HuPDI en el proceso de plegamiento oxidativo de proteínas, la alteración en su funcionamiento (ganancia o pérdida) ha sido asociada a diversas patologías en humanos, destacándose las enfermedades neurodegenerativas, metabólicas, infecciosas, proliferativas, y circulatorias.

Enfermedades Neuro-Degenerativas (END). El conjunto de END originadas por la formación de oligómeros y agregados amiloideos de proteínas mal plegadas se ha asociado a un mal funcionamiento de chaperonas y plegasas, incluida la proteína HuPDI. De manera interesante, 55% de las proteínas involucradas en enfermedades amiloideas contienen enlaces disulfuro [Mossuto *et al.*, 2013]. En pacientes con enfermedad de Parkinson o Alzheimer, la formación de agregados amiloideos ha sido asociada a la presencia de HuPDI nitrosilada [Benham, 2012], considerada como funcionalmente inactiva, ya que la plegasa nativa exhibe la capacidad de inhibir la formación de: (a) agregados de α -sinucleína (característicos de la enfermedad de Parkinson) [Yagi-Utsumi *et al.*, 2015], y (2) fibrillas de Tau (proteína neuroprotectora para la enfermedad de Alzheimer) [Xu *et al.*, 2013]. La esclerosis lateral amiotrófica, caracterizada por agregados SOD1 (superóxido dismutasa), y la enfermedad de Huntington, donde se observan agregados de huntingtina, son ejemplos adicionales de enfermedades neurodegenerativas donde la función de HuPDI está comprometida [Benham, 2012].

Enfermedades Proliferativas. Para sustentar su alta demanda proteica, las células tumorales y cancerosas activan el mecanismo UPR, favoreciendo el proceso de plegamiento mediante la sobre-expresión de chaperonas y plegasas [Eirich *et al.*, 2014]. De modo significativo, se ha detectado la sobre-expresión de HuPDI en diferentes tipos de cáncer (ovario, próstata, pulmones, linfomas, gliomas, melanoma, y leucemia), asociándose primordialmente a la supervivencia celular [Xu *et al.*, 2012]. Aún más, se ha observado que otros miembros de la familia de PDI, como PDIA4 y PDIA6, favorecen la sobrevivencia de células tumorales de pulmón, adaptándose al estrés del RE y evitando la apoptosis [Tufo *et al.*, 2014]. Por otro lado, se ha reportado que la actividad oxidorreductora de HuPDI en la superficie celular está implicada en la progresión de un tipo de glioma maligno, favoreciendo la migración y adhesión de células tumorales [Goplen *et al.*, 2006].

Enfermedades Metabólicas. Aunque la etiología de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es compleja, se ha sugerido que la disminución de células β pancreáticas se debe a la

formación de agregados amiloideos y a procesos apoptóticos asociados a estrés del RE [Back y Kaufman, 2012]. En otros casos, se ha observado que la sobre-expresión de HuPDI en células β pancreáticas disminuye la secreción de insulina estimulada por glucosa e induce estrés del RE. Específicamente, actuando como anti-plegasa, reduciendo el enlace disulfuro inter-catenario de insulina y favoreciendo la formación de agregados. Por lo tanto, se ha sugerido que HuPDI actúa como factor limitante para la secreción de insulina, aumentando la retención de pro-insulina dentro del RE de células β pancreáticas [Rajpal *et al.*, 2012].

Enfermedades Circulatorias. Aunque carecen de RE, las plaquetas almacenan HuPDI y la secretan en respuesta a su activación celular [Kim *et al.*, 2013a]; inclusive, representan uno de los linajes celulares que despliegan esta proteína en su superficie [Flaumenhaft *et al.*, 2015]. En relación a esto, se ha reportado que su presencia funcional (como reductasa) es esencial para la activación de las plaquetas durante la formación de coágulos. Específicamente, se ha demostrado que: (1) la inhibición de HuPDI bloquea la agregación de las plaquetas y la generación de fibrina en una lesión [Flaumenhaft y Furie, 2016] (2) la integrina plaquetaria $\alpha_{IIb}\beta_3$ se activa mediante un cambio conformacional que resulta de la reducción de un enlace disulfuro (Cys5-Cys435 o Cys663-Cys687) [Kim *et al.*, 2013a], y (3) las plaquetas carentes de HuPDI exhiben una pobre activación de tal integrina [Sharda *et al.*, 2015]. Por otro lado, en la superficie de células endoteliales de miocardio, la actividad reductasa de HuPDI presenta una función protectora durante la remodelación cardiaca post-infarto, evadiendo la apoptosis y favoreciendo tanto la migración celular como la adhesión-formación tubular (a través de la interacción con las integrinas que participan en la adhesión celular) [Grek y Townsend, 2014].

Infecciones Virales. En algunos procesos infecciosos virales; p. ej., VIH o Dengue, se ha observado que HuPDI (desplegada en la superficie de la célula hospedera) participa activamente en las etapas de adhesión e internalización del agente infeccioso [Wan *et al.*, 2012]. Durante la interacción VIH:célula, la proteína HuPDI desplegada en la superficie de los linfocitos T CD4⁺ cataliza la reducción de al menos dos enlaces disulfuro de la proteína viral gp120. Esta modificación bioquímica es requerida para la unión con los co-receptores CCR5 y CXCR4, y la subsecuente internalización del VIH [Kahn *et al.*, 2011]. Por otro lado, en el caso de la infección con el virus del Dengue, la sobre-expresión de las integrinas β_1 y β_3 en células epiteliales (inducida por la presencia del virus) no es suficiente para su internalización, ya que posteriormente requieren ser activadas, mediante un cambio conformacional, por acción de la actividad reductasa de HuPDI [Wan *et al.*, 2012].

Infecciones Bacterianas. Algunas infecciones bacterianas; p. ej., *Chlamydia*, también requieren de la participación de HuPDI en la superficie de las células hospederas para completar su infección [Abromaitis y Stephens, 2009]. Mediante estudios *in vitro*, usando cultivos celulares, se observó una reducción significativa de la capacidad de ingreso e infección bacteriana en presencia de bacitracina, un inhibidor de la actividad reductasa de la HuPDI de superficie celular [Wan *et al.*, 2012]. En otro contexto subcelular, la toxina de *Vibrio cholerae*, constituida por las subunidades A y B (siendo A la subunidad activa), es desensamblada en el RE de la célula infectada; enseguida, la subunidad A1 liberada es desplegada y translocada hacia el citosol por acción de HuPDI [Tsai *et al.*, 2011].

1.3.2. Moduladores de HuPDI

La búsqueda de moléculas con actividad moduladora de las funciones fisiológicas de HuPDI ha llevado a identificar compuestos químicos pequeños con capacidad de alterar sus actividades enzimáticas. Idealmente, los moduladores, tanto positivos (activadores) como negativos (inhibidores), deben presentar tres habilidades: (1) alta selectividad, (2) baja toxicidad, y (3) reversibilidad, que son deseables para su eficiente traslado a la práctica clínica. Como se observa en la Figura 1-6, la factibilidad de utilizar moduladores de HuPDI en el contexto clínico representa una opción terapéutica viable para distintas patologías. Inclusive, algunas hipótesis ya ha sido propuestas: (i) un inhibidor en la superficie plaquetaria favorecería una terapia anti-trombótica [Flaumenhaft *et al.*, 2015], y (ii) activadores de la función chaperona y de la actividad reductasa ayudarían a evitar la formación de agregados proteicos en END [Parak y Atkin, 2015].

Inhibidores. Durante más de 20 años, el antibiótico bacitracina fue considerado como el inhibidor por excelencia de HuPDI; a pesar de exhibir una capacidad limitada (CI_{50} de 0.09 mM) y baja especificidad. Actualmente, diferentes moléculas con potencial inhibidor han sido descritas. Como se puede observar en la Tabla 1-1, existen moléculas con potencial inhibidor; por ejemplo, PACMA 31 (CI_{50} de 10 μ M). Sin embargo, la mayoría presenta como desventaja su carácter irreversible [Flaumenhaft, *et al.*, 2015], ya que comúnmente muestran alta afinidad por los residuos de Cys del sitio activo; lo que, a su vez, conduce a una baja selectividad, debido a que el motivo CXXC es compartido por todas las proteínas de la super-familia tiorredoxina. En consecuencia, ninguna de las moléculas identificadas a la fecha posee un potencial uso clínico. No obstante, éstas han sido aprovechadas para comprender en diferentes niveles (desde molecular hasta celular) las actividades bioquímicas y funciones fisiológicas de HuPDI.

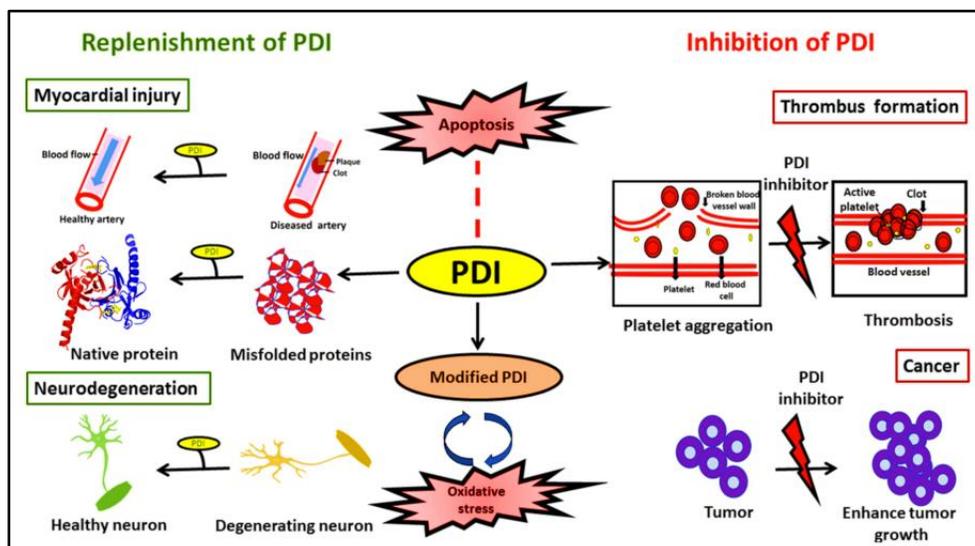


Figura 1-6. Representación gráfica de las aplicaciones terapéuticas de HuPDI como diana terapéutica.

De lado izquierdo se indican las patologías donde la recuperación de la función representa una ventaja terapéutica; mientras que de lado derecho se muestran las situaciones donde la inhibición es deseable. Tomada y conservada en su formato original de Parak y Atkin (2015).

Activadores. A la fecha, no se ha reportado molécula alguna con capacidad activadora de las funciones específicas de HuPDI. No obstante, existe un interés genuino en la modulación positiva de esta plegasa como medida terapéutica para controlar la progresión de algunas patologías. Por ejemplo, un activador podría reducir los efectos dañinos de procesos isquémicos cardíacos (específicamente, como sistema para prevenir la apoptosis). De igual manera, un activador podría potenciar la actividad chaperona y asistir el replegamiento de proteínas no plegadas o mal plegadas, reduciendo el estrés característico de ciertas patologías, tal como las enfermedades neurodegenerativas.

Moduladores alostéricos. A diferencia de los inhibidores y activadores, los moduladores alostéricos poseen la capacidad de interactuar con una enzima en una región diferente al sitio catalítico, regulando su actividad bioquímica; ya sea directamente, alterando las interacciones enzima-sustrato, o indirectamente, promoviendo cambios conformacionales en la estructura terciaria [Flaumenhaft *et al.* 2015]. En esta categoría ha sido incluido el quersetin-3-rutinósido, un modulador reversible de la actividad reductasa que interactúa con el dominio b' (de unión al sustrato), ocasionando una compactación de la conformación nativa y un bloqueo de la actividad catalítica [Lin *et al.*, 2015]. Recientemente, se reportó la identificación de brepistats, un modulador que se une al bolsillo de unión al sustrato, presente

Tabla 1-1. Inhibidores y otros moduladores de HuPDI

| Inhibidor | Origen y aplicación | CI ₅₀ [mM] [§] | Referencia |
|----------------------------|--|------------------------------------|-----------------|
| Bacitracina | Antibiótico natural: Inhibidor inespecífico de PDI | 0.09 | Roth, 1981 |
| Ribostamicina [¶] | Antibiótico natural: Inhibidor de la actividad chaperona de PDI | ND | Horibe, 2001 |
| P1 | Sintético: Inhibidor de células cancerosas | 1.7 x 10 ⁻³ | Ge, 2013 |
| DTNB | Sintético: Inhibe la unión del VIH a los receptores de los linfocitos CD4 | 2.6 | Lara, 2011 |
| pCMBS | Sintético: Tiene reacción con grupos tiol libres | ND | Robinson, 2006 |
| PAO | Sintético: Tiene reacción con el motivo CXXC de PDI | 0.085 | Bennet, 2000 |
| Estrógenos | Hormona: Inhibidor de las actividades reductasa e isomerasa de PDI | 1 x 10 ⁻³ | Tsibris, 1989 |
| RB-11-ca | Sintético: Inhibidor de PDI | 0.024 | Banerjee, 2013 |
| 16F16 | Sintético: Inhibidor de la apoptosis | 0.074 | Hoffstrom, 2010 |
| PACMA31 | Sintético: Regulador del ciclo celular, inhibidor de células en proceso de apoptosis | 0.01 | Xu, 2012 |
| T8 | Sintético: Inhibición de PDI en células cancerosas | >0.3 | Eirich, 2014 |
| CCF642 | Sintético: Actividad anti-mieloma múltiple | <0.005 | Vatolin, 2016 |
| LOC14 | Sintético: Actividad anti-apoptosis en células nerviosas, en un modelo de Huntington | 0.5 x 10 ⁻³ | Kaplan, 2015 |
| ML359 | Sintético: Inhibidor de la actividad reductasa de PDI (anti-trombótico) | 0.25 x 10 ⁻³ | Khodier, 2014 |
| Juniferdina | Producto natural: Bloquea adhesión de VIH con linfocitos CD4 | 0.17 x 10 ⁻³ | Kahn, 2011 |
| Quercetín-3-rutinósido | Producto natural: Inhibidor irreversible de formación de coágulos | 6.1 x 10 ⁻³ | Jasuja, 2012 |

[¶] La inhibición completa de la actividad chaperona se detectó a una relación 1:100 (ribostamicina:PDI); [§] ND: no disponible. Tomada y modificada de Mares (2015).

en el dominio b', y desplaza al *linker-x*; ocasionando un cambio conformacional que promueve la actividad isomerasa sobre sustratos pequeños, como glutatión oxidado (GSSG), pero inhibe la actividad reductasa sobre sustratos de mayor talla molecular, como insulina, ya que restringe el movimiento del dominio a' (fijando a la proteína en su forma cerrada o reducida) [Bekendam *et al.* 2016].

2. ANTECEDENTES

2.1. Diseño racional de fármacos

Actualmente, los avances científicos y tecnológicos permiten obtener información más detallada sobre la estructura de las proteínas, impactando directamente en la comprensión y análisis de sus funciones biológicas. En este sentido, quizá la aplicación más relevante de ese conocimiento es el diseño racional de fármacos, ya que ofrece la posibilidad de desarrollar moléculas con mayor especificidad y afinidad hacia la diana terapéutica [Lounnas *et al.*, 2013]. Esa estrategia científico-tecnológica consiste en la combinación de diferentes procedimientos encaminados a determinar de forma más precisa y efectiva la interacción entre dos moléculas. La determinación de las interacciones moleculares entre el ligando y el receptor, con base a predicciones *in silico*, o el tamizado de una librería de miles de moléculas sintéticas, péptidos, o ácidos nucleicos, ha permitido reducir la inversión en tiempo de investigación para identificar moléculas líderes con actividad farmacológica [Mavromoustakos *et al.*, 2011]; p. ej., agonistas, antagonistas, ligandos peptídicos etc. [Molek *et al.*, 2011]. En ese contexto, el tamizado de péptidos desplegados en la superficie de bacteriófagos es una estrategia promisoriosa para la identificación de moléculas con potencial terapéutico; ya que genera información valiosa referente a los sitios de interacción entre el ligando y el receptor, lo cual es fundamental para el diseño racional fármacos basado en péptido-mimética [Molek *et al.*, 2011].

2.2. Despliegue de péptidos en bacteriófagos

Los bacteriófagos son un tipo de virus que infectan exclusivamente a bacterias. Sus características los han convertido en un modelo de estudio con aplicación biomédica, donde destaca su uso como vectores moleculares, para entrega dirigida de fármacos o biomoléculas, o como sistemas de despliegue y reconocimiento de interacciones proteína-proteína [Aghebati-Maleki *et al.*, 2016]. La tecnología de despliegue de péptidos en bacteriófagos consiste en la modificación del genoma viral, insertando la secuencia codificante para el péptido de interés en fusión a una proteína de superficie (Figura 2-1). Comúnmente, como sistema de expresión y despliegue se utiliza a un bacteriófago filamentoso, tipo f1 o M13, ya que no lisan a sus hospederos; y como proteína acarreadora a pIII, la cual es pentavalente

(aunque cada fago puede expresar de desde 1 hasta 5 copias [Omidfar y Daneshpour, 2015]. Aún más, con esta estrategia de clonación molecular, es posible construir librerías de péptidos, expresados y desplegados en la superficie de bacteriófagos, que son muy útiles para esquemas de tamizado de alto rendimiento (*high throughput screening*). El despliegue en bacteriófagos ofrece ventajas sobre otros métodos de tamizado, ya que: (1) se pueden generar librerías de hasta 10^9 bacteriófagos, todos ellos desplegando una secuencia distinta; (2) son partículas pequeñas, siendo posible obtener concentraciones cercanas a 10^{12} bacteriófagos por mL, permitiendo identificar péptidos de unión específica a partir de un número elevado de variantes; y (3) facilitan el proceso de selección positiva (alta afinidad), ya que cada ronda puede ser ensayada en concentraciones crecientes de tensoactivo (Figura 2-2); y (4) los bacteriófagos son partículas fáciles de mantener y manipular. Inclusive, existen librerías comercialmente disponibles y de bajo costo [Hyde-DeRuyscher *et al.*, 2000, Troitskaya y Kodadek 2004].

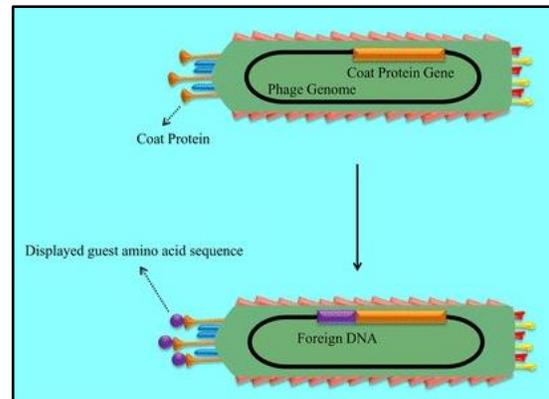


Figura 2-1. Representación gráfica del despliegue en superficie de péptidos fusionados a la proteína pIII.

La imagen representa el proceso de clonación, expresión y despliegue de péptidos en la superficie viral. La secuencia genética de interés (recuadro morado) se inserta en fase a la secuencia codificante de la proteína de superficie (recuadro naranja). De esta forma, el péptido (círculo morado) será expresado en fusión a la proteína viral (naranja). Tomada y conservada en su formato original de Aghebati-Maleki (2016).

2.3. Péptidos como moduladores enzimáticos

Las funciones y propiedades de los péptidos nativos varían desde antibióticos o anti-tumorales, altamente específicos, hasta hormonas, neurotransmisores, e inmunomoduladores [Gentilucci *et al.*, 2010]. De manera interesante, los péptidos con una estructura secundaria apropiada pueden ser seleccionados como ligandos específicos de prácticamente cualquier polipéptido funcional, considerando como premisa que todas las proteínas en algún momento de su desempeño operacional tienen contacto con otra proteína. Por lo tanto, si un péptido exhibe las propiedades estructurales requeridas para la interacción péptido:proteína, es posible suponer que puede actuar como un modulador (activador o inhibidor) de la función fisiológica de una diana terapéutica (p. ej. enzima o receptor). Dos tipos de péptidos pueden

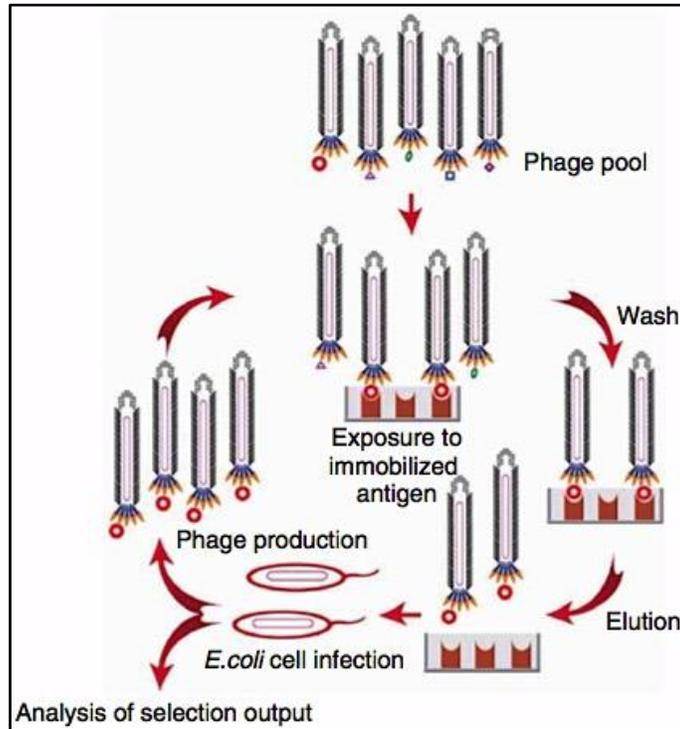


Figura 2-2. Esquema general de la técnica de despliegue de péptidos en superficie de bacteriófagos.

A partir de una librería de bacteriófagos que expresan y despliegan distintos péptidos en fusión a una proteína de superficie, se realizan rondas de selección que consisten en exponer los bacteriófagos a la molécula diana de interés (inmovilizada en superficie). Después de un periodo de interacción, los bacteriófagos que no reconocen a la diana son lavados. Finalmente, los bacteriófagos que expresan y despliegan péptidos que reconocen específicamente a la molécula diana de interés son recuperados y amplificadas. Es recomendable realizar varias rondas de selección, aumentando la astringencia en cada una de ellas, con el objeto de seleccionar aquellos con la mayor afinidad posible. Tomada y conservada en su formato original de Odmifar y Daneshpour (2015).

ser considerados para este propósito: (1) aquellos derivados de un compañero de interacción funcional, y (2) aquellos seleccionados de una biblioteca aleatoria [Groner *et al.*, 2012]. Muchos de los péptidos que ya han sido identificados y caracterizados actúan como inhibidores, teniendo como ventaja el adquirir una estructura secundaria que: (i) compite reconoce el sitio de unión al sustrato, bloqueando la unión al ligando natural, o (ii) modifica la estructura terciaria de la proteína, perturbando su acceso [Troitskaya y Kodadek 2004].

En un estudio comparativo, se valoró la efectividad de péptidos sintéticos, obtenidos a partir del despliegue de péptidos en bacteriófagos, para inhibir 7 enzimas distintas: β -glucosidasa, proilil-tRNA sintetasa, y tirosil-tRNA sintetasa de bacteria, alcohol deshidrogenasa y hexocinasa de levadura, y carboxipeptidasa B y glicógeno fosforilasa a de mamífero. De manera significativa, 13 péptidos (de 17 analizados) mostraron preferencia por el sitio activo

de la enzima; inclusive, algunos con valores de K_i en el rango nanomolar [Hyde-DeRuyscher *et al.*, 2000]. No obstante, el uso de péptidos como fármacos presenta desventajas *in vivo*; p. ej., tiempo de vida media corto, abundante filtración renal, y absorción a distintos tejidos [Molek *et al.*, 2011], su alta selectividad, potencia, y seguridad, además de su baja toxicidad, han permitido su aplicación en patologías oncológicas y padecimientos metabólicos [Fosgerau y Hoffman, 2015]. Además, con el apoyo de procedimientos de diseño racional de fármacos; p. ej., peptidomimética o proteomimética, es factible resolver o reducir los inconvenientes asociados a su naturaleza bioquímica [Helmer y Schmitz, 2016].

2.4. Péptidos con afinidad a HuPDI

A la fecha, se han reportado tres péptidos que exhiben afinidad por HuPDI: el tripéptido NKT, que fue utilizado como primera molécula para determinar la existencia del sitio de unión a sustrato [Noiva *et al.*, 1993]; y la hormona somatostatina (AGCKNFFWKTFTSC) y el péptido quimiotáctico mastoparén (INLKALAALAKKIL), los cuales se unen reversiblemente al mismo sitio que NKT [Hatahet y Ruddok, 2009]. Considerando estos antecedentes y ante la prevalente necesidad de tratamientos dirigidos contra HuPDI que muestren aplicación clínica, es razonable buscar péptidos con afinidad a HuPDI, mediante un tamizado de péptidos desplegados en bacteriófagos, y caracterizar sus propiedades estructurales y funcionales, mediante ensayos *in vitro* de caracterización bioquímica, que demuestren la viabilidad de esta estrategia para identificar moléculas con potencial farmacológico.

Como primera etapa, se tamizó una librería de heptapéptidos aleatorios fusionados a la proteína pIII del bacteriófago M13 (*Ph.D.TM-7 Phage Display Peptide Library, New England Biolabs*), la cual contiene aproximadamente 10^9 secuencias independientes y una redundancia de 10 copias por μL (en la alícuota comercial). Como resultado de un trabajo previo, en nuestro grupo de trabajo se identificaron tres bacteriófagos que despliegan heptapéptidos (Tabla 2-1) con capacidad de unión a HuPDI [Castellanos Martínez, 2014]. Como se muestra en la Figura 2-3, los bacteriófagos denominados con los números 4, 51, y 73 sobrepasan significativamente la línea basal (que representa al bacteriófago vacío, como control negativo). Aunque no fue posible determinar una constante de disociación (K_D) para la interacción bacteriófago:HuPDI, ya que no fue posible alcanzar el valor máximo de

Tabla 2-1. Secuencias de heptapéptidos con potencial de unión a HuPDI.

| Bacteriófago | Secuencia (N → C) |
|--------------|-------------------|
| HuPDI04 | HHPITYV |
| HuPDI51 | GETRAPL |
| HuPDI73 | HAIYPRH |

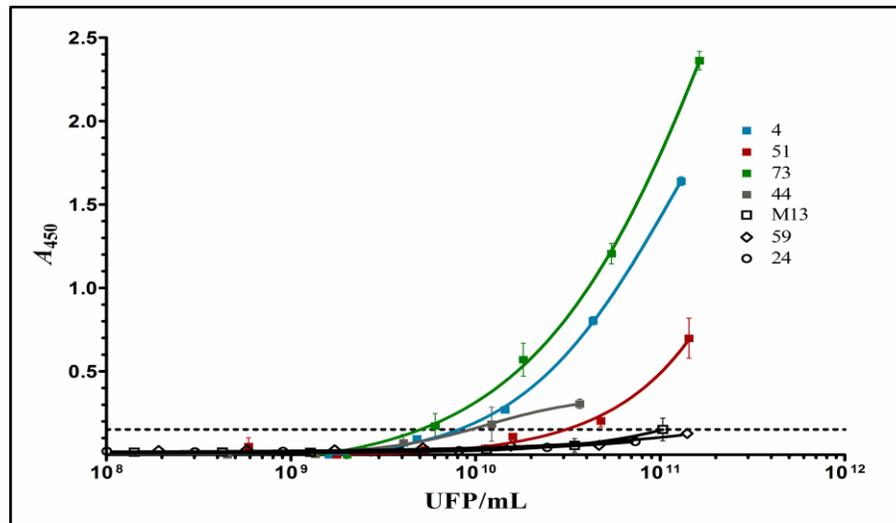


Figura 2-3. Representación gráfica de la unión de los bacteriófagos que reconocen a HuPDI (representada por A_{450}) con respecto a su título (UFP/mL).

La línea punteada representa el valor basal, todos aquellos por debajo de ese fueron considerados como no significativos. M13 corresponde al bacteriófago sin expresión de secuencia peptídica. Tomada de Castellanos Martínez (2014).

unión (A_{450}), la tendencia ascendente (sigmoidea) sugiere que los péptidos desplegados por los bacteriófagos 4, 51, y 73 exhiben la habilidad de reconocer y permanecer unidos a la diana de interés. Con estos antecedentes, nos propusimos evaluar la eficiencia de tales péptidos sobre las propiedades funcionales de HuPDI; específicamente, las actividades catalíticas y chaperona, ya que éstas representan los blancos potenciales para el diseño racional de fármacos dirigidos contra esa plegasa.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Los heptapéptidos de unión a la proteína HuPDI: HP04, HP24, y HP73, inducen un efecto modulador sobre su actividad reductasa y su función chaperona.

3.2. Objetivo general

Determinar el efecto modulador de tres heptapéptidos que exhiben afinidad a la proteína HuPDI, mediante ensayos *in vitro* de actividad reductasa y función chaperona, para considerar su potencial como base para el diseño de moléculas con actividad farmacológica.

3.3. Objetivos específicos

1. Obtener plásmidos de expresión en periplasma bacteriano, mediante el uso de técnicas de clonación molecular, que contengan la fusión HPXX-MBP-6xHis.
2. Obtener las proteínas de fusión HPXX-MBP-6xHis puras, mediante cromatografía de afinidad a níquel, a partir de extractos periplásmicos de bacterias sobre-expresadoras.
3. Determinar los parámetros de CE_{50} y K_D , mediante ensayos de reconocimiento simple o competitivo, para la establecer la afinidad de cada péptido HPXX.
4. Determinar el efecto de los péptidos HPXX sobre las actividades reductasa y chaperona, mediante ensayos bioquímicos típicos *in vitro*, para establecer su potencial modulador sobre HuPDI y, por ende, sus funciones fisiológicas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales y reactivos

4.1.1. Materiales y reactivos químico-biológicos

Affimetrix eBioscience: placas *Nunc™ Maxisorp®* para micro-titulación (ELISA). *Amresco*: cloruro de sodio (NaCl). *Becton-Dickinson*: agar bacteriológico, extracto de levadura, triptona. *Biorad*: acrilamida (solución al 30%), agarosa, azul brillante de *Coomassie* R250, membrana de nitrocelulosa, reactivo de *Bradford*, N,N,N',N'-tetra-metil-etilenediamina (TEMED). *Cellgro*: 1X *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)* (libre de calcio y magnesio). *Costar*: placas estándar para micro-titulación (96 pocillos). *Fermont*: etanol. *G-Biosciences*: 10X *BLOK™ BSA* (10% de BSA en solución 10X de PBS). *GE Healthcare Life Sciences*: columnas PD-10 para GPC. *IBI*: ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA), ditioneitol (DTT), dodecil sulfato de sodio (SDS), glicerol, tris[hidroximetil]aminometano (Tris). *JT Baker*: ácido acético, ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄), bicarbonato de sodio (NaHCO₃), fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄), sulfato de magnesio (MgSO₄), urea. *MP Biomedicals*: glicina. *New England Biolabs*: solución 100X de BSA (10 mg/mL), maltosa, resina de afinidad a maltosa (agarosa-amilosa). *Prod. Quím. Monterrey*: isopropanol. *Qiagen*: resina de afinidad a metales (agarosa-NTA-Ni). *Sigma*: ampicilina, bacitracina, bromuro de etidio (BrEt), cloruro de calcio (CaCl₂), dimetilsulfóxido (DMSO), imidazol, isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), N-(2,4-dimetoxifenil)-N-(1-oxo-2-propin-1-il)-2-(2-tienil) glicilglicina etil ester (PACMA31), sacarosa, tetraciclina, *Tritón* X-100, *Tween®*-20, β-mercaptoetanol (BME). *Spectrum*: metanol. *Thermo Scientific*: 1-Step™ *Ultra TMB-ELISA Substrate Solution*.

4.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos

Agilent: ADN polimerasa de *P. furiosus* (*Pfu* ADN-pol), solución amortiguadora 10X para *Pfu* ADN-pol. *Boehringer Mannheim*: anticuerpo (IgG) de cabra anti-FC de ratón acoplado a peroxidasa. *Eli Lilly*: insulina humana recombinante (Humulin® R). *New England Biolabs*: endonucleasas *Bam*HI, *Bgl*II, *Kpn*I, y *Sac*I, soluciones de amortiguadoras 10X para endonucleasas (NEB1, NEB2, y NEB3), ADN ligasa del bacteriófago T4 (T4 ADN-lig), solución amortiguadora 10X para T4 ADN-lig, anticuerpo monoclonal anti-MBP. *Rockland, Inc.*: anticuerpo (IgG) de cabra anti-FC de ratón acoplado a fosfatasa alcalina.

Tabla 4-1. Secuencia de los péptidos y oligonucleótidos sintéticos utilizados.

| Péptido | Secuencia (N → C) |
|-----------------|---|
| HUP04 | HHPITYVGGGC |
| HUP24 | SAPSSKNGGGC |
| HUP51 | GETRAPLGGGC |
| HUP73 | HAIYPRHGGGC |
| Oligonucleótido | Secuencia (5' → 3') |
| MP-HUPDI04 | TTT AGT GGT ACC TTT CTA TTC TCA CTC TCA TCA TCC TAT TAC TTA TGT GGG TGG AGG TTC GGC CGA TAT GAA AAC TGA AG |
| MP-HUPDI24 | TTT AGT GGT ACC TTT CTA TTC TCA CTC TTC TGC GCC GTC GTC TAA GAA TGG TGG AGG TTC GGC CGA TAT GAA AAC TGA AG |
| MP-HUPDI51 | TTT AGT GGT ACC TTT CTA TTC TCA CTC TGG GGA GAC TCG TGC GCC GCT TGG TGG AGG TTC GGC CGA TAT GAA AAC TGA AG |
| MP-HUPDI73 | TTT AGT GGT ACC TTT CTA TTC TCA CTC TCA TGC TAT TTA TCC GCG TCA TGG TGG AGG TTC GGC CGA TAT GAA AAC TGA AG |
| MBPC6XHR | ATT ATT AAG CTT AGT GGT GAT GGT GAT GAT GCG AAT TAG TCT GCG CGT CTT TCA G |
| PMP3FW | AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA |
| PMP3RV | GAC CGT TAT AGC CTT TAT CGC CG |
| PMP3CHRV | CGG GCC TCT TCG CTA TTA CGC |
| M13FW | GTA AAA CGA CGG CCA GT |

4.1.3. Péptidos y oligonucleótidos sintéticos

La Tabla 4-1 enlista la secuencia de los péptidos y oligonucleótidos sintéticos utilizados en el presente estudio. Los péptidos fueron adquiridos de la compañía *Anaspec*, conteniendo el extremo amino libre y el carboxilo amidado. La escala de síntesis fue de 10 mg y se recibieron con una pureza >95%. Los oligonucleótidos fueron obtenidos de la compañía *Operon Technologies, Inc.*

4.1.4. Estuches comerciales

El ADN plasmídico fue purificado usando el estuche *QIAprep Spin Miniprep Kit*, en tanto, los productos de PCR y los productos de digestión endonucleolítica fueron obtenidos utilizando el estuche *QIAquick PCR Purification Kit*. Por otro lado, los fragmentos de ADN fueron extraídos a partir de gel de agarosa usando el estuche *QIAquick Gel Extraction Kit*. Estos estuches comerciales fueron adquiridos de la compañía *Qiagen*. Las proteínas bacterianas fueron extraídas en condiciones solubles y nativas utilizando el estuche *CellLytic® B* de *Sigma*.

Tabla 4-2. Descripción de las cepas de *E. coli* utilizadas.

| Cepa | Genotipo | Fuente |
|------------------------------|---|---------------------|
| BL21 (DE3) | <i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS; where λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI- B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i> | Novagen |
| ER2738 | <i>F'proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(Tet^R)/fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i> | New England Biolabs |
| SHuffle [®] Express | <i>fhuA2 [lon] ompT ahpC gal λatt::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacI^q) ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i> | New England Biolabs |

Nota: Todas las cepas forman parte de la reserva de reactivos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de la FCQI, UABC.

4.1.5. Bacterias y medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* utilizadas durante el desarrollo del presente proyecto se describen en la Tabla 4-2. La cepa ER2738 fue utilizada como hospedera en experimentos de clonación molecular, y en protocolos de expresión de las proteínas MBP-6xHis y HPXX-MBP-6xHis, excepto HP73-MBP-6xHis. La cepa BL21 (DE3) fue usada como hospedera en protocolos de expresión de la proteína HP73-MBP-6xHis. La cepa SHuffle[®] Express fue empleada como hospedera en protocolos de expresión de la proteína PDI de humano (HuPDI).

Todas las cepas bacterianas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB líquido: 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl; LB agar: LB líquido suplementado con 1.7% de agar bacteriológico). La recuperación de transformantes fue realizada en medio 2X YT (1.6% de triptona, 1% de extracto de levadura, 0.5% de NaCl). La selección de transformantes fue realizada en medio LB suplementado con el antibiótico requerido (0.15 mg/mL de ampicilina; 0.015 mg/mL de tetraciclina).

4.1.6. Plásmidos comerciales

El plásmido pMAL-pIII (Figura 4-1), de *New England Biolabs*, fue utilizado como parental para la construcción de los vectores de expresión periplásmica. Este vector de expresión bacteriana contiene los orígenes de replicación M13 (bacteriófago) y ColE1 (bacteria). Además, posee el gen codificante para la enzima β-lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina a su hospedero. Por otro lado, bajo el control del promotor híbrido Ptac/LacO, inducible por IPTG, se ubica la secuencia codificante para (pIII)MBP, la cual consiste de la fusión génica entre la secuencia señal de la proteína pIII del bacteriófago M13 y la proteína de unión a maltosa, promoviendo la exportación al espacio periplásmico. Adicionalmente, incluye el gen codificante para el represor LacI, sobre-expresado de manera

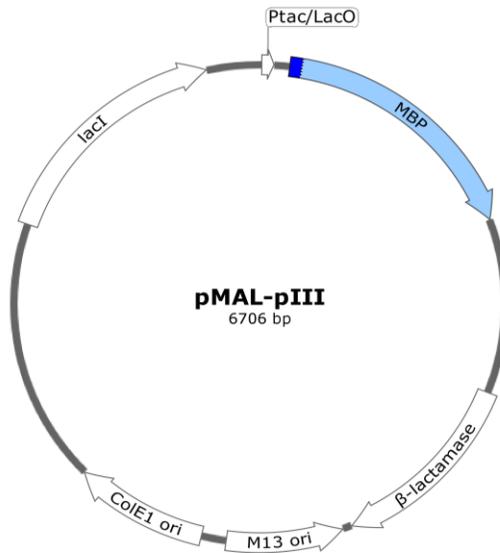


Figura 4-1. Representación esquemática del plásmido pMAL-pIII.

En color azul fuerte se indica la secuencia señal de la proteína pIII del bacteriófago M13, seguida de la secuencia codificante para la proteína de unión a maltosa (MBP), en color azul claro. Otras características moleculares también son mostradas (ver texto).

constitutiva y que actúa como parte de un mecanismo de control estricto de la expresión proteica (LacI→LacO).

4.2. Equipos y programas computacionales

Las células bacterianas fueron cultivadas a 37 °C y 300 rpm en una incubadora de ambiente controlado *Incubator Shaker Series 25 (New Brunswick Scientific Co.)*. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un equipo termociclador *Multigene (Labnet International, Inc.)*. La visualización y digitalización de geles de agarosa teñidos con BrEt se realizó con el fotodocumentador *Gel Doc EZ Imager™ (BioRad)*. Las separaciones celulares y los fraccionamientos subcelulares a mini escala fueron realizadas en una microcentrífuga *MiniSpin® Plus (Eppendorf)*. Las separaciones celulares a midi-escala fueron realizadas en una centrífuga *Allegra™ X-22R (Beckman Coulter)*. Las mediciones espectrofotométricas en microplacas fueron realizadas usando los lectores *Microplate Reader Model 680 y xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (BioRad)*. El análisis bioestadístico de los datos fue llevado a cabo utilizando el programa *Graphpad™ Prism® v4.0 para MS Windows*. Las construcciones *in-silico* de plásmidos fueron realizadas usando los programas

computacionales *Serial Cloner* (serialbasics.free.fr) y *SnapGene® Viewer* (www.snapgene.com), ambos del dominio público.

4.3. Protocolos generales

4.3.1. Amplificación de ADN

La amplificación de fragmentos de ADN se llevó a cabo en reacciones de 50 µL, conteniendo: solución amortiguadora 1X para *Pfu* ADN-pol, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 µM de cada oligonucleótido (sentido y anti-sentido), 1-10 ng de ADN molde, *Pfu* ADN-pol. Las condiciones típicas de termociclado fueron: un ciclo inicial de desnaturalización (2 min a 94 °C), seguido de 35 ciclos de amplificación exponencial (20 seg a 94 °C, 20 seg a 55 °C, y 20-60 seg a 72 °C, según fuese requerido), y un ciclo de extensión final (7 min 72 °C). Al finalizar la amplificación, las muestras fueron conservadas a 12 °C, hasta ser retiradas.

4.3.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Las muestras de ADN fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa (1–2%, según fuese requerido), conteniendo 0.5 µg/mL de BrEt (como agente fluorogénico intercalante de ADN) en solución amortiguadora 1X TAE (40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético, 1 mM de EDTA). Como referencia, se utilizaron los marcadores de peso molecular *Ladder 100-bp* y λ -*HindIII* de *New England Biolabs*.

4.3.3. Secuenciación automática de ADN

La secuencia nucleotídica de los fragmentos de ADN insertados en los plásmidos construidos fue obtenida mediante el servicio externo de secuenciación automática proporcionado por la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt-UNAM).

4.3.4. Preparación de bacterias competentes

Las células bacterianas competentes para transformación mediante choque térmico fueron preparadas siguiendo el protocolo estándar del laboratorio [Sambrook *et al.*, 2001]. Brevemente, un cultivo joven fue preparado mediante dilución 1:100 en medio LB, a partir de un cultivo semilla (nocturno), e incubación durante 2-3 h ($DO_{600} = 0.4-0.6$). Las células fueron colectadas mediante centrifugación (13,000 rpm; 2 min; 10 °C). En condiciones estériles, la pastilla celular fue lavada secuencialmente con 0.5 mL de agua destilada fría y 100 mM de

CaCl₂ frío. Finalmente, fue resuspendida en 100 mM de CaCl₂ frío (0.05 mL) y mantenida en hielo, al menos 5 min, previo al protocolo de transformación.

4.3.5. Transformación bacteriana mediante choque térmico

La muestra conteniendo 0.1-10 ng de plásmido (1-2 µL) fue añadida a 0.05 mL de suspensión de células competentes. El protocolo de transformación fue realizado de acuerdo a los procedimientos típicos de laboratorio [Sambrook *et al.*, 2001]. Después de 30 min en hielo, la mezcla (plásmido-bacterias) fue sometida al siguiente tratamiento: 90 seg a 42 °C, seguidos de 5 min en hielo. Inmediatamente, las células fueron recuperadas en 1 mL de medio 2X YT (37 °C; 60 min; 300 rpm). Finalmente, las transformantes estables fueron seleccionadas en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente.

4.3.6. Análisis de expresión de proteínas a mini-escala

Un cultivo semilla (nocturno, 12-14 h) fue preparado inoculando 1 unidad formadora de colonias (ufc) en 2 mL de medio (LB suplementado con el antibiótico correspondiente). Posteriormente, un cultivo de expresión fue preparado inoculando 5 mL de medio con 0.05 mL de cultivo semilla. Después de 2 h de incubación (fase de pre-inducción), el inductor (IPTG) fue añadido a una concentración final de 0.3 mM y la incubación continuó por un periodo adicional de 4 h (fase de sobre-expresión). Los paquetes celulares provenientes de 1 mL del cultivo fueron separados mediante centrifugación (12,000 rpm; 2 min), congelados (-20 °C), y mantenidos en esas condiciones por lo menos una noche.

4.3.7. Fraccionamiento subcelular a mini-escala

El paquete celular de 1 mL de cultivo de expresión fue resuspendido en 0.2 mL de solución amortiguadora TEX (150 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 3 mM de EDTA, pH 8.0; 0.1% de Tritón X-100) [Thorstenson *et al.*, 1997]. Después de 30 min en hielo, la suspensión celular fue separada mediante centrifugación (14,500 rpm; 2 min). El sobrenadante (fracción periplásmica, FP) fue transferido a un microtubo limpio, y el precipitado (fracción citosólica, FC) fue resuspendido en 0.2 mL de solución de lisis desnaturizante (8 M de urea; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0).

4.3.8. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida

Las muestras analíticas fueron preparadas mezclando 1 volumen de solución proteica con 1 volumen de solución amortiguadora 2X para cargado de proteínas (10% de glicerol;

2.5% de SDS; 5% de BME; 0.002% de azul de bromofenol; 50 mM de Tris-HCl, pH 6.8) y desnaturalizadas a $T = 95-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Las proteínas contenidas en 0.01 mL de muestra fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% [Laemmli, 1970]. Los gels de SDS-poliacrilamida al 12% fueron preparados siguiendo el protocolo estándar de laboratorio. La separación fue realizada a 80 V durante 15-20 min y, posteriormente, a 120 V durante 60-90 min. Las proteínas fueron teñidas con solución CBB (25% de isopropanol; 10% de ácido acético; 0.2% de azul brillante de *Coomassie* R250) durante 1-2 h, y desteñidas con solución DS (10% de isopropanol; 10% de ácido acético) durante la noche.

4.3.9. Cuantificación de proteínas por micro-Bradford

La concentración de proteínas fue determinada mediante la adaptación de un microensayo del método de *Bradford* [Zor y Selinger, 1996]. En pocillos de una placa de microtitulación, se prepararon diluciones (0.05 mL, volumen final) de la proteína estándar (*BSA*) a concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, y 0.05 mg/mL, y de muestra problema (1:5, por duplicado). Enseguida, 0.1 mL de reactivo de *Bradford* fueron añadidos a cada pocillo y mezclados brevemente por pipeteo. Después de 5 min, los valores de absorbancia a 450 y 595 nm (A_{450} y A_{595} , respectivamente) fueron registrados, usando un lector de microplacas. La concentración de cada muestra problema fue calculada interpolando el resultado de la relación A_{595}/A_{450} dentro del intervalo lineal de la curva estándar de *BSA* ($r^2 > 0.99$).

4.3.10. Disolución y cuantificación de péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos HUPXX (XX: 04, 24, 51, y 73) fueron solubilizados en DMSO para obtener una concentración teórica de 10 mM. La concentración real fue determinada mediante cuantificación con el reactivo de Ellman (DTNB) [Winther y Thorpe, 2014]. DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico) reacciona con los grupos tiol libres formando un complejo disulfuro y liberando una molécula del producto colorido TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico), que absorbe a 412 nm (A_{412}) y tiene un coeficiente de extinción molar de $14,150\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Considerando que todos los péptidos HUPXX sólo tiene un equivalente (-SH), la concentración fue estimada usando la siguiente fórmula:

$$\text{mM} = \frac{A_{412}}{\varepsilon} \cdot \text{FD}$$

donde A_{412} representa el dato registrado de absorbancia correspondiente, ε el respectivo coeficiente de extinción molar ($\varepsilon^{\text{mM}} = 14.15$), y FD el factor de dilución utilizado.

4.4. Expresión y purificación de HuPDI recombinante

4.4.1. pQHuPDI

Plásmido derivado del vector pQE30 (*Qiagen*). La secuencia codificante para el péptido maduro de la proteína HuPDI de humano fue amplificada mediante PCR, usando dos oligonucleótidos sintéticos (específicos para el ADN complementario del gen *pdia1/p4hb*) como iniciadores y el plásmido pCMV6-XL4/NM_000918.2 (*Origene*) como molde. En condiciones de expresión típicas, la proteína HuPDI recombinante se produce como polipéptido activo etiquetado con un hexámero de histidinas en el extremo N-terminal [Mares *et al.*, 2011].

4.4.2. Expresión de HuPDI

Un cultivo semilla fue preparado inoculando 0.06 mL de una suspensión de *E. coli* SHuffle® Express portadora de pQHuPDI en 6 mL de medio LB suplementado con ampicilina. La proliferación bacteriana fue promovida durante la noche (12-14 h). Cinco cultivos a midi-escala (100 mL) fueron preparados inoculando 1 mL del cultivo semilla en medio LB suplementado con ampicilina. Después de 2 h de incubación (fase de pre-inducción), fueron inducidos con 0.1 mM de IPTG y proliferados durante 4 h adicionales (fase de sobre-expresión). Las pastillas bacterianas fueron separadas por centrifugación (9,500 rpm; 10 min; 10 °C) y conservadas en congelación (-20 °C) hasta su uso.

4.4.3. Lisis bacteriana en condiciones nativas

Cada pastilla celular fue descongelada a temperatura ambiente (TA) y resuspendida en 5 mL de reactivo *CellLytic*® B. La lisis fue favorecida mediante la adición de 0.1 mL de una solución a 10 mg/mL de lisozima, 0.002 mL de benzonasa (equivalentes a 250 U), y 0.05 mL de una mezcla 100X de inhibidores de proteasas. Después 10 min de agitación leve a TA, la fracción soluble (lisado bacteriano total, LBST) fue obtenida mediante centrifugación (9,500 rpm; 15 min; 12 °C). El LBST fue clarificado mediante una segunda centrifugación (14,500 rpm; 15 min; 10 °C) y conservado en refrigeración (12-14 °C) hasta su uso.

4.4.4. Purificación de HuPDI

Una columna para cromatografía de afinidad a níquel (colchón de 1 mL, resina de agarosa-NTA-Ni), fue preparada y lavada con 5 mL de solución BW (300 mM de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM de imidazol, pH 8.0). El LBST clarificado fue mezclado con 1

volumen de solución BW y lentamente cargado en la columna. Después de tres pasadas, la columna fue lavada extensivamente con 15 mL de solución BW. La proteína HuPDI fue separada mediante la adición de 7 mL de solución E (300 mM de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 250 mM de imidazol, pH 8.0) y colectada en fracciones de 1 mL. Las fracciones de mayor concentración proteica fueron identificadas, mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, agrupadas y mezcladas. La concentración de proteína fue determinada mediante un micro-ensayo de *Bradford*.

Una columna para cromatografía de permeación en gel, PD-10, fue preparada siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, la columna fue lavada y estabilizada con 25 mL de solución 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0). Enseguida, la proteína HuPDI recombinante contenida en 2.5 mL de solución E fue cargada lentamente a la columna y recuperada mediante elución con 3.5 mL de solución 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0). La pureza y concentración fueron verificadas como se describió anteriormente.

4.5. Obtención de plásmidos pMHuPXXH

4.5.1. Construcción de pMHuPXX

Amplificación. La secuencia codificante para los heptapéptidos de unión a HuPDI (HPXX, donde XX es 04, 24, 51, o 73) fue incorporada dentro de la fusión génica (pIII)MBP (específicamente, entre pIII y MBP), mediante una estrategia de mutagénesis insercional - PCR megaprimer [Kammann *et al.*, 1989; Barik, 2002], utilizando un mega-oligonucleótido sintético, diseñado específicamente para cada HPXX (Tabla 4-1), y el oligonucleótido M13FW como iniciadores (sentido y antisentido, respectivamente) y el plásmido pMAL-pIII como molde. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y purificados utilizando un estuche comercial.

Digestión y ligación. Los productos de PCR y el vector parental (pMAL-pIII) fueron digeridos con las endonucleasas *KpnI* y *SacI*, en las condiciones recomendadas por el proveedor (*New England Biolabs*). Una vez analizados y purificados, los productos de digestión fueron incorporados, en una relación molar mayor a 1:10 (vector:inserto), en una reacción de ligación (0.01 mL) conteniendo 400 U de T4 ADN-lig en solución amortiguadora 1X para T4 ADN-lig. La reacción fue favorecida mediante incubación a 16 °C durante 14-16 h.

Transformación y selección. Los productos de ligación fueron transfectados en la cepa ER2738, mediante transformación por choque térmico, y los transformantes estables fueron seleccionados mediante resistencia a ampicilina (proliferación en medio LB suplementado con

el antibiótico). Las ufc portadoras de plásmidos recombinantes fueron identificadas mediante PCR de cultivo. Brevemente, cuatro ufc fueron seleccionadas aleatoriamente e inoculadas independientemente en 1 mL de medio LB con ampicilina. Después de 4-5 h de proliferación, 1 μ L de cultivo fue utilizado como molde para amplificar el inserto mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos PM3FW y PMP3RV, flanqueantes al sitio de inserción, como iniciadores. Las ufc positivas fueron identificadas por su polimorfismo de longitud mediante electroforesis en gel de agarosa.

Verificación del inserto. De cada construcción, dos ufc (clonas) positivas fueron seleccionadas para extracción de ADN plasmídico de alta pureza. La integridad de los insertos fue verificada mediante secuenciación automática de ADN. La inserción de la secuencia codificante para cada heptapéptido y su fusión en fase con las secuencias pIII y MBP fue confirmada visualmente. Un plásmido de cada construcción (pMHuP04, pMHuP24, pMHuP51, y pMHuP73) fue utilizado para verificar la expresión de proteína recombinante. Por otro lado, una muestra de ADN plasmídico de cada construcción fue almacenada e incorporada a la reserva de reactivos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de FCQI, UABC.

4.5.2. Construcción de pMHuPXXH

Amplificación. La secuencia codificante para un hexámero de histidinas fue añadida en el extremo C-terminal de MBP, mediante una estrategia de PCR convencional, usando los oligonucleótidos PMP3FW y MBPC6XHR, el cual incorpora la secuencia del hexapéptido de interés (Tabla 4-1), como iniciadores (sentido y antisentido, respectivamente) y el plásmido pMAL-pIII como molde. El producto de PCR fue analizado y purificado como se detalló anteriormente.

Digestión y ligación. El producto de PCR y los vectores correspondientes (pMAL-pIII o pMHuPXX) fueron digeridos con las endonucleasas *Bgl*II y *Hind*III, en las condiciones recomendadas por el proveedor (*New England Biolabs*). Una vez analizados y purificados, los productos de digestión fueron incorporados en diferentes reacciones de ligación, considerando una mezcla vector:inserto para cada construcción, como se especificó anteriormente.

Procedimientos y análisis posteriores. Los procedimientos de transfección y selección de transformantes estables, así como la identificación de ufc portadoras de plásmidos recombinantes fueron realizados como se mencionó anteriormente. El análisis de integridad de los insertos y la correcta incorporación del hexámero de histidinas fue realizado como se especificó anteriormente. Un plásmido de cada construcción (pMHuP04H, pMHuP24H, pMHuP51H, pMHuP73H, y pMBPH) fue utilizado para los ensayos de expresión y purificación

de proteína recombinante. Por otro lado, una muestra respectiva de ADN plasmídico de cada construcción fue almacenada e incorporada a la reserva de reactivos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de FCQI, UABC.

4.6. Expresión y purificación de HPXX-MBP-6xHis recombinantes

4.6.1. Expresión de HPXX-MBP-6xHis

Un cultivo semilla fue preparado inoculando 0.03 mL de una suspensión de *E. coli* portadora de pMHuPXXH en 3 mL de medio LB suplementado con ampicilina. La proliferación bacteriana fue promovida durante la noche (12-14 h). Dos cultivos a midi-escala (100 mL) fueron preparados inoculando 1 mL del cultivo semilla en medio LB suplementado con ampicilina. Después de 2 h de incubación (fase de pre-inducción), fueron inducidos con 0.3 mM de IPTG y proliferados durante 4 h adicionales (fase de sobre-expresión). Las pastillas bacterianas fueron separadas por centrifugación (9,500 rpm; 10 min; 10 °C) y conservadas en congelación (-20 °C) hasta su uso.

4.6.2. Extracción de proteínas periplásmicas

La fracción periplásmica de cada pastilla fue separada mediante fraccionamiento subcelular por choque osmótico frío, siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor (*New England Biolabs*). Brevemente, una pastilla celular proveniente de 100 mL de cultivo bacteriano portador de los plásmidos pMHuPXXH, o pMBPH (como control), fue resuspendida en 40 mL de solución amortiguadora para esferoplastos (20% de sacarosa; 30 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de EDTA, pH 8.0) y agitada (*rocking*) durante 10 min a TA. Inmediatamente, la pastilla fue separada mediante centrifugación (8,000 Xg; 20 min; 4 °C) y resuspendida en 40 mL de solución fría de 5 mM de MgSO₄. Enseguida, la extracción fue permitida mediante agitación durante 10 min en frío (baño de hielo). Finalmente, la fracción periplásmica fue recuperada mediante centrifugación (8,000 Xg; 20 min; 4 °C), transferida a un tubo cónico limpio, y neutralizada con 0.8 mL de solución 1 M de Tris-HCl (pH 8.0). Adicionalmente, las fracciones periplásmicas fueron clarificadas mediante ultrafiltración (0.22 μM).

4.6.3. Purificación de las variantes HPXX-MBP-6xHis

Para cada proteína, una columna para cromatografía de afinidad a níquel (colchón de 0.5 mL, resina de agarosa-NTA-Ni²⁺) fue preparada y lavada con 2.5 mL de solución BW (300 mM de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM de imidazol, pH 8.0). El LBST clarificado fue

mezclado con 1 volumen de solución BW y lentamente cargado en la columna. Después de tres pasadas, la columna fue lavada extensivamente con 7.5 mL de solución BW. La proteína HuPDI recombinante fue separada mediante la adición de 3 mL de solución E (300 mM de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 250 mM de imidazol, pH 8.0) y colectada en fracciones de 0.5 mL. Las fracciones de mayor concentración proteica fueron identificadas y agrupadas, y la concentración de la mezcla fue determinada como se detalló anteriormente.

4.7. Determinación de CE_{50} y K_D usando HPXX-MBP-6xHis

4.7.1. Análisis preliminar del reconocimiento

La concentración efectiva media (CE_{50}) de cada reconocimiento HuPDI:HPXX-MBP-6xHis fue determinada mediante una variante de ELISA indirecto. Brevemente, los pocillos de una placa de micro-titulación fueron sensibilizados durante la noche (12-16 h) con 0.1 mL de una solución a 5 μ g/mL de HuPDI, en solución R (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 500 mM de NaCl; 0.05% de *Tween*[®]-20). En seguida, cada pocillo fue bloqueado durante 2 h con 0.2 mL de una solución al 1% de BSA, en solución 1X de PBS. La interacción (HPXX:HuPDI) fue permitida durante 1 h, añadiendo (por triplicado) 0.1 mL de tres diluciones decimales (1.0, 0.1, y 0.01 mg/mL) de cada proteína (HPXX-MBP-6xHis, o MBP-6xHis). Todas diluciones fueron realizadas usando solución R (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 500 mM de NaCl; 0.05% de *Tween*[®]-20) como diluyente. El reconocimiento primario fue permitido durante 1 h, adicionando 0.1 mL de una dilución 1:5,000 de anticuerpo monoclonal anti-MBP (en solución R). El reconocimiento secundario fue similarmente favorecido, añadiendo 0.1 mL de una dilución 1:5,000 de anticuerpo (IgG) de cabra anti-FC de ratón acoplado a peroxidasa. El revelado fue realizado agregando 0.1 mL de sustrato para peroxidasa (*ultra-TMB.ELISA*). Después de 15 min, la reacción fue detenida con 0.1 mL de una solución 2 N de H₂SO₄. La absorbancia a 450 nm (A_{450}) fue registrada usando un lector de microplacas.

4.7.2. Determinación cuantitativa de la CE_{50}

Una aproximación cuantitativa de la CE_{50} para la proteína HP73-MBP-6xHis (referencia) fue obtenida utilizando la variante del ensayo de ELISA indirecto, con algunas modificaciones: (i) los pocillos fueron sensibilizados con 0.1 mL de una solución 5 ng/mL de HuPDI; (ii) la interacción HPXX:HuPDI fue realizada con 6 soluciones de HP73-MBP-6xHis (23 μ M y 5 diluciones seriadas base 2).

4.7.3. Determinación cuantitativa de la K_D

La constante de disociación (K_D) para la proteína HP73-MBP-6xHis (referencia), como valor aparente de la afinidad del péptido HP73, fue determinada mediante una variante del ensayo tipo ELISA indirecto, en condiciones de competencia de ligando y considerando algunas adaptaciones adicionales: (i) los pocillos fueron sensibilizados con 0.1 mL de una solución 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HuPDI; (ii) para la interacción, la solución R fue suplementada con 2 μM de HP73-MBP-6xHis; (iii) la competencia fue realizada usando el péptido sintético HUP73 (Tabla 4-1) a 4 concentraciones (100 μM y 3 diluciones seriadas base 3).

4.8. Efecto modulador sobre la actividad reductasa de HuPDI

4.8.1. Ensayo típico de actividad reductasa

La actividad disulfuro reductasa de la proteína HuPDI fue determinada mediante un ensayo turbidimétrico de reducción de insulina (sustrato) [Ramos et al., 2011]. Las mezclas de reacción (0.2 mL) fueron preparadas en una placa de micro-titulación, conteniendo 400 picomoles de HuPDI y 20 nanomoles de insulina (Humulin® R) en solución amortiguadora de fosfatos-EDTA (pH 7.0). La reacción fue iniciada mediante la adición del 60 nanomoles del agente reductor (DTT). Las concentraciones finales fueron 2 μM de HuPDI, 0.1 mM de insulina, y 0.3 mM de DTT en solución 100 mM de NaH_2PO_4 - 2 mM de EDTA. Una reacción carente de HuPDI y DTT fue utilizada como blanco; en tanto, otra carente de HuPDI como control de reducción química. La reducción de insulina fue monitoreada durante 90 min, registrando la absorbancia a 655 nm (A_{655}) cada 5 min ($T = 23 \pm 1$ °C). A partir de la gráfica de resultados (A_{655} contra tiempo), la actividad reductasa (AR) fue determinada a partir del incremento lineal de la absorbancia con respecto al tiempo (m), después de una fase lag inicial (X_0), usando la siguiente fórmula:

$$AR \left(\frac{A_{655}}{\text{min}^2} \right) = \frac{m}{X_0}$$

4.8.2. Análisis del efecto modulador sobre la actividad reductasa

Las mezclas de modulación (MM, 0.05 mL) en presencia de los péptidos sintéticos (HUPXX, donde XX es 04, 24, 51, o 73), fueron preparadas conteniendo 8 μM de HuPDI y diferentes concentraciones (0, 0.15, 0.25, 0.40, 0.70 y 1.0 mM) del péptido correspondiente en solución de reacción 1X (100 mM de NaH_2PO_4 , 2 mM de EDTA; pH 7.0). Como controles de inhibición, se utilizaron mezclas con concentraciones conocidas de compuestos de referencia

(0.5 mM de bacitracina y 0.3 mM de PACMA31). Para favorecer el equilibrio de la interacción, las mezclas fueron incubadas a 23 ± 1 °C durante 30 min. Posteriormente, las mezclas de reacción para evaluar la actividad reductasa fueron realizadas añadiendo la respectiva solución MM (0.05 mL) a pocillos de una micro-placa de titulación conteniendo 0.14 mL de la solución de sustrato (0.143 mM de insulina en solución de reacción 1X). La reducción fue iniciada añadiendo 0.01 mL de una solución 6 mM de DTT fresco. Mezclas de reacción blanco y control de reducción química fueron preparadas simultáneamente. El monitoreo de la reacción y el cálculo de actividad reductasa fueron realizados como se detalló en el ensayo típico. El efecto modulador (%) fue determinado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Efecto modulador (\%)} = \left(\frac{AR_x}{AR_0} \right) \cdot 100$$

Donde AR_0 y AR_x representan la actividad reductasa basal de HuPDI (en ausencia de péptido sintético) o modulada por interacción con una concentración X del correspondiente péptido sintético, respectivamente.

4.9. Efecto modulador sobre la actividad chaperona de HuPDI

4.9.1. Ensayo típico de actividad chaperona

La actividad chaperona de la proteína HuPDI fue determinada mediante un ensayo turbidimétrico que valora la habilidad de prevenir la agregación de insulina [Ramos *et al.*, 2011]. En pocillos de una placa de micro-titulación, las mezclas de reacción (0.2 mL) fueron preparadas conteniendo 200 picomoles de HuPDI y 20 nanomoles de insulina (Humulin® R) en solución amortiguadora de fosfatos-EDTA (pH 7.0). La reacción fue iniciada mediante la adición del 4 micromoles del agente reductor (DTT). Las concentraciones finales fueron 1 μ M de HuPDI, 0.1 mM de insulina, y 20 mM de DTT en solución 100 mM de NaH_2PO_4 - 2 mM de EDTA. Una reacción carente de HuPDI y DTT fue utilizada como blanco; en tanto, otra carente de HuPDI como control de agregación de insulina en ausencia de chaperona. Las reacciones fueron monitoreadas durante 60 min, registrando la absorbancia a 655 nm (A_{655}) cada 5 min ($T = 23\pm 1$ °C). A partir de la gráfica de resultados (A_{655} contra tiempo), la actividad chaperona fue determinada considerando el valor máximo de precipitación (saturación aparente) y usando la siguiente fórmula de protección (%) de la agregación insulina:

$$\text{Protección (\%)} = \left(\frac{A_0 - A}{A_0} \right) \cdot 100$$

Donde A_0 y A representan la absorbancia máxima en ausencia y presencia de HuPDI respectivamente [Ramos *et al.*, 2011].

4.9.2. Análisis del efecto modulador de los péptidos sobre la función chaperona

El efecto modulador de los heptapéptidos sobre de actividad chaperona de HuPDI fue determinado mediante el ensayo de protección de la agregación de la insulina utilizando los péptidos sintéticos (HUPXX, donde XX es 04, 24, 51, o 73) en una concentración única, y manteniendo una relación molar 50 veces mayor (con respecto a HuPDI). El protocolo típico fue realizado sin modificaciones mayores, pero considerando la incorporación 10 nanomoles (50 μ M, final) del respectivo HUPXX a la mezcla de reacción correspondiente. Además, una mezcla control del disolvente (DMSO al 0.83%, final) fue preparada simultáneamente.

4.10. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Todos los resultados corresponden a tres ensayos independientes, a menos que se indique de otra manera. Los resultados que mostraron evidencias de un sesgo no asociado a la hipótesis; p. ej., errores experimentales, técnicos, o humanos, fueron eliminados sin consideración. Para fines del presente manuscrito, solo se muestran los resultados significativos para probar la hipótesis; sin embargo, todos los datos y resultados experimentales, incluyendo los no mostrados, están disponibles a solicitud escrita (aminchaca@uabc.edu.mx; cc: mramos@uabc.edu.mx). Los valores promedio y su error estándar fueron calculados usando el programa *Graphpad™ Prism®* v4.0. La significancia estadística fue obtenida mediante análisis de varianza (ANOVA) y la prueba post-análisis de *Dunnnett*. Los resultados con un valor $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En su carácter de proteína multifuncional, la plegasa HuPDI juega un papel significativo en distintos procesos celulares; sin embargo, estudios recientes demostraron que despliega una dualidad operacional en diferentes patologías de humanos, exhibiendo efectos tanto adversos como protectores en varias enfermedades [Parakh y Atkin, 2015]. A la fecha, un importante número de inhibidores ha sido reportado [Mares *et al.*, 2015]; no obstante, ninguno de ellos ha cumplido satisfactoriamente las demandas requeridas para aplicación clínica, ya que presentan baja especificidad y alto potencial tóxico [Flaumenhaft, *et al.*, 2015]. Por otro lado, existe escasa información referente a moléculas activadoras; sin embargo, reportes recientes han mostrado el potencial terapéutico de estos moduladores en el control de la progresión de algunas enfermedades en humano; p. ej., cardiomiopatía isquémica o Alzheimer [Parak y Atkin, 2015].

Con el fin de contribuir a la identificación y caracterización de moduladores moleculares (inhibidores o activadores) capaces de regular las funciones fisiológicas (catalíticas y chaperona) de HuPDI, se realizó el tamizado de una librería de péptidos aleatorios desplegados en la superficie de bacteriófagos [Castellanos Martínez, 2014]. Como resultado de esa estrategia, se identificaron tres heptapéptidos con capacidad de reconocimiento a la proteína HuPDI, denominados como HP04 (HHPITYV), HP51 (GETRAPL), y HP73 (HAIYPRH). Enseguida, para valorar su potencial modulador, se propuso determinar tanto su afinidad como el efecto ejercido sobre dos de las funciones fisiológicas de HuPDI: actividad reductasa y función chaperona, utilizando como moléculas de prueba a: (i) péptidos presentados por MBP, y (ii) péptidos sintéticos.

5.1. MBP como presentadora de heptapéptidos

La inserción de las secuencias codificantes para heptapéptidos en el vector comercial pMAL-pIII (entre los codones correspondientes a la señal pIII y la secuencia codificante para MBP), ofrece la ventaja de sobre-expresar una proteína recombinante en el periplasma bacteriano con las siguientes características bioquímicas: (1) un extremo amino-terminal que asegura una independencia entre la presentación del heptapéptido y el plegamiento de MBP, ya que la señal pIII será removida (por acción de la peptidasa); (2) un despliegue monovalente

del heptapéptido, ya que MBP es monomérica; y (3) una alta eficiencia de purificación por métodos cromatográficos típicos, ya que MBP es soluble y posee afinidad a amilosa.

5.1.1. Inserción de la secuencia codificante para HPXX en pMAL-pIII

Inicialmente, se planteó insertar las secuencias codificantes para los heptapéptidos (HPXX): HP04, HP51, HP73 (que reconocen a HuPDI), y HP24 (control negativo), mediante clonación directa en el plásmido comercial pMAL-pIII. Sin embargo, después de varios intentos con resultados no satisfactorios, esta estrategia fue rechazada. Consecuentemente, se propuso amplificar individualmente cada HPXX usando un mega-oligonucleótido sintético (Tabla 4-1). Brevemente, a partir de la secuencia nucleotídica obtenida del genoma de cada bacteriófago, se diseñaron mega-oligonucleótidos que insertan la secuencia del HPXX en fase con la señal pIII y el polipéptido MBP.

La Figura 5-1 ilustra el diseño considerado para cada inserción. Cada mega-oligonucleótido y el oligonucleótido universal M13FW fueron utilizados exitosamente para amplificar las fusiones respectivas (pIII)HPXX-MBP, usando a pMAL-pIII como molde. Después del tratamiento con las endonucleasas correspondientes, cada fusión fue reinsertada en el vector parental, generando las variantes plasmídicas pertinentes (pMHuPXX). Enseguida, los plásmidos recombinantes fueron utilizados como vectores de expresión en

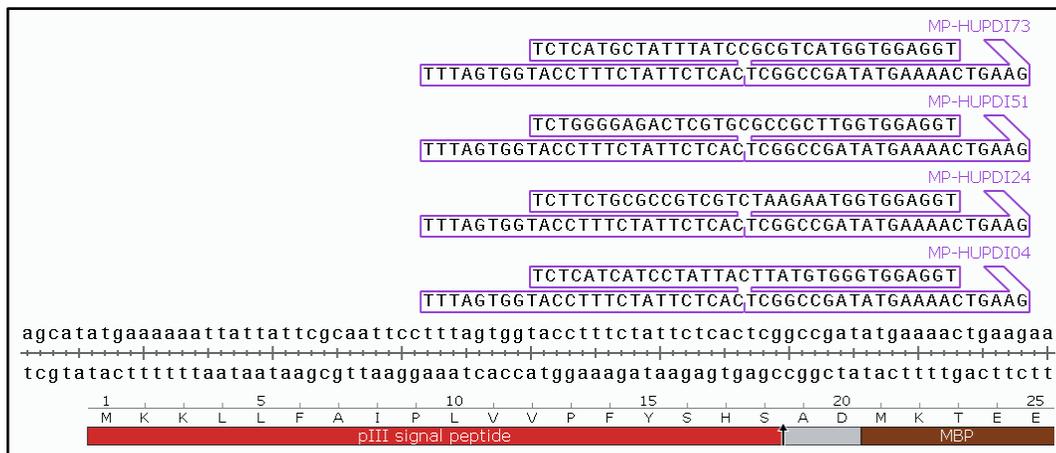


Figura 5-1. Diseño de mega-oligonucleótidos y secuencia nucleotídica del extremo 5' codificante para el N-terminal de la fusión pIII-MBP (contenida en pMAL-pIII).

Las regiones de hibridación y las secuencias específicas de inserción de los mega-oligonucleótidos MP-HUPDIXX se indican cajas de línea color morado. El polipéptido de fusión pIII-MBP se muestra en cajas coloridas: señal pIII en rojo y MBP en café. Además, una flecha apunta el sitio de corte por la peptidasa de señal.

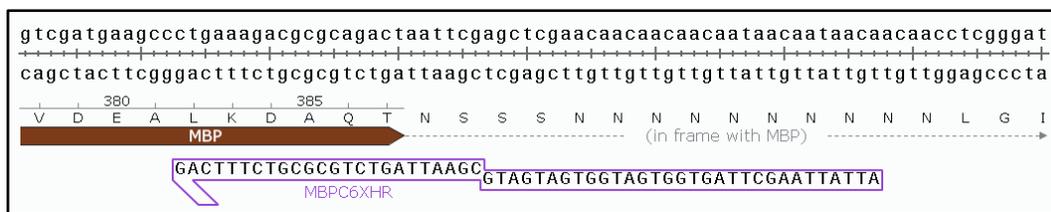


Figura 5-2. Diseño del oligonucleótido MBPC6XHR y secuencia nucleotídica del extremo 3' codificante para el C-terminal de MBP, contenida en el plásmido pMAL-pIII.

La región de hibridación y la secuencia de adición (6xHis-paro-*Hind*III) se indican en una caja de línea color morado. El polipéptido C-terminal de MBP se muestra en una caja color café.

ensayos analíticos de purificación proteica. Desafortunadamente, los niveles de expresión fueron bajos y los rendimientos de recuperación de proteína pura fueron insuficientes para los fines del estudio. Por tales motivos, se decidió incorporar un hexámero de histidinas (6xHis), en el extremo carboxilo-terminal de MBP, como etiqueta molecular para la purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad a níquel.

5.1.2. Adición de 6xHis en el C-terminal de (pIII)HPXX-MBP

El diseño del oligonucleótido MBPC6XHR (anti-sentido) consideró la inclusión de un segmento de hibridación con la secuencia codificante para el extremo C-terminal de MBP, y la adición de 6 codones para residuos de histidina (6xHis). Además, incorporó un codón de paro seguido de la secuencia de reconocimiento para la endonucleasa *Hind*III.

La Figura 5-2 muestra el diseño considerado para la incorporación de la etiqueta 6xHis. Los oligonucleótidos PMP3FW y MBPC6XHR fueron utilizados exitosamente para amplificar la fusión MBP-6xHis, usando pMAL-pIII como molde. Después del tratamiento con endonucleasas correspondientes, esta fusión fue utilizada para sustituir (mediante inserción) la respectiva región en cada vector pMHuPXX, sin perturbar la secuencia codificante para el extremo N-terminal (donde se localiza el heptapéptido), generando las variantes (pIII)HPXX-MBP-6xHis. Simultáneamente, se construyó el plásmido pMBPH, como control de expresión de (pIII)MBP-6xHis. Cabe destacar que las construcciones *in silico* favorecieron la identificación de los plásmidos recombinantes.

La Figura 5-3 ilustra de manera general las características moleculares de los plásmidos recombinantes (pMHuP73 como muestra). Previo al análisis de expresión y al procedimiento de purificación, las respectivas fusiones de todas las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación automática de ADN.

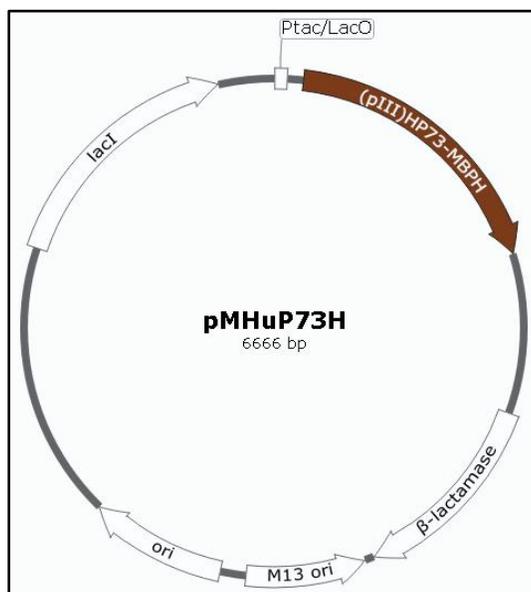


Figura 5-3. Representación esquemática del vector pMHuP73H, que expresa la proteína periplásmica recombinante HP73-MBP-6xHis.

Este plásmido y sus relacionados conservan, como esqueleto molecular, las características del vector parental pMAL-pIII (ver Figura 4-1).

La Figura 5-4 muestra los resultados del análisis de la secuencia nucleotídica de pMHuP73H (como ejemplo): el panel [A] corresponde a la inserción (pIII)HPXX-MBP y el [B] a la adición MBP-6xHis. Es importante destacar la presencia del espaciador Gly-Gly-Gly-Ser (Figura 5-4[A]) entre HPXX y MBP, el cual favorece la proyección independiente del péptido.

En resumen, 5 plásmidos recombinantes fueron obtenidos: pMHuP04H, pMHuP51H, pMHuP73H (con péptidos de unión a HuPDI); pMHuP24H (con péptido irrelevante, control negativo del reconocimiento); y (5) pMBPH (ausencia de péptido, control negativo del acarreador). Todos expresan variantes de MBP con las características moleculares, celulares y bioquímicas requeridas para cumplir los objetivos del presente estudio.

5.1.3. Expresión periplásmica de las variantes HPXX-MBP-6xHis

Inicialmente, la expresión periplásmica de los polipéptidos HPXX-MBP-6xHis fue evaluada en condiciones típicas y a mini-escala, utilizando a la cepa ER2523 (NEB® Express) como célula hospedera (recomendada por el proveedor). A pesar de atender las recomendaciones típicas para las condiciones de inducción de la expresión (p. ej., temperatura

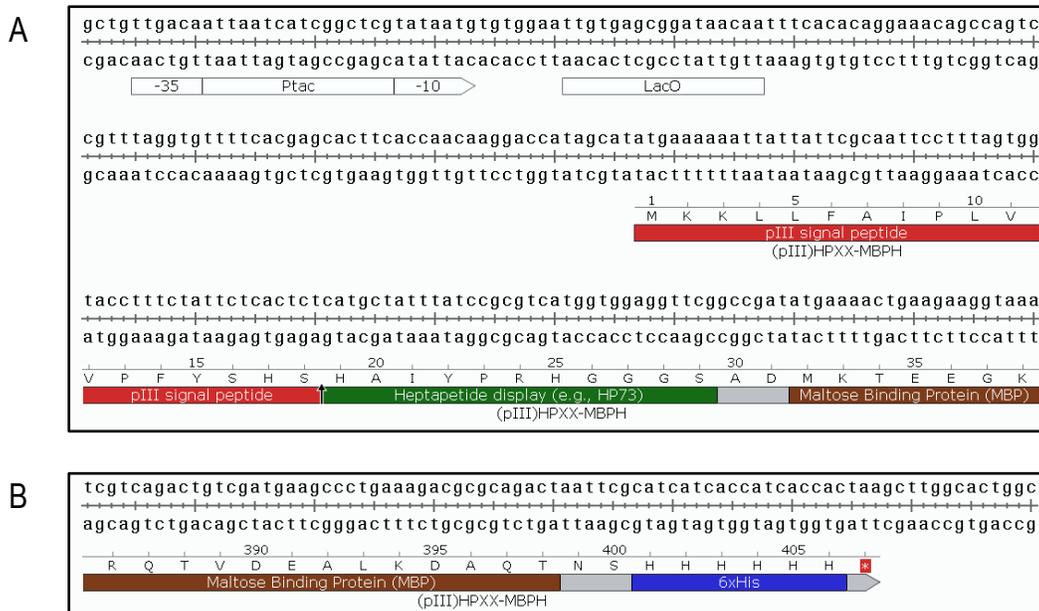


Figura 5-4. Secuencia nucleotídica de las regiones 5' y 3' de los plásmidos pMHuPXXH.

[A] Ptac/LacO y extremo 5' codificante para el N-terminal del polipéptido pIII-HPXX-MBP-6xHis. El promotor tac (Ptac) y el operador lac (LacO) se indican en cajas blancas; en tanto, el polipéptido de fusión se muestra en cajas coloridas: señal pIII en rojo, heptapéptido desplegado y espaciador (GGGS) en verde, y MBP en café. Además, el sitio de corte de la señal se muestra con una flecha. Para fines ilustrativos, la secuencia mostrada corresponde a HP73. [B] Extremo 3' codificante para el C-terminal del polipéptido pIII-HPXX-MBP-6xHis. El polipéptido de fusión se muestra en cajas coloridas: MBP en café y el hexámero de histidinas en azul.

de cultivo, tiempo de inducción, y concentración de inductor), la expresión de proteínas recombinantes mostró niveles muy bajos, no convenientes para fines del estudio.

Atinadamente, se empleó la cepa ER2738 (recomendada por el proveedor para infección con bacteriófagos), que facilitó la expresión de 4 de los 5 polipéptidos requeridos; siendo HP73-MBP-6xHis la que mostró niveles insuficientes. Ante esto último, se exploró la expresión en la cepa BL21 (DE3), la cual es una célula hospedera con excelentes condiciones metabólicas para la sobre-expresión de proteínas. De manera Interesante, los resultados mejoraron ampliamente, por lo que esta propuesta fue adoptada exclusivamente para HP73-MBP-6xHis.

Con estos resultados como antecedentes, se realizó un ensayo analítico (mini-escala) de expresión de proteínas recombinantes HPXX-MBP-6xHis, usando las condiciones típicas de expresión (37 °C con agitación constante: 2 h de pre-inducción; 0.3 mM de IPTG; 4 h de sobre-expresión). Los lisados bacterianos totales y sus correspondientes fracciones subcelulares (citoplásmica y periplásmica) fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

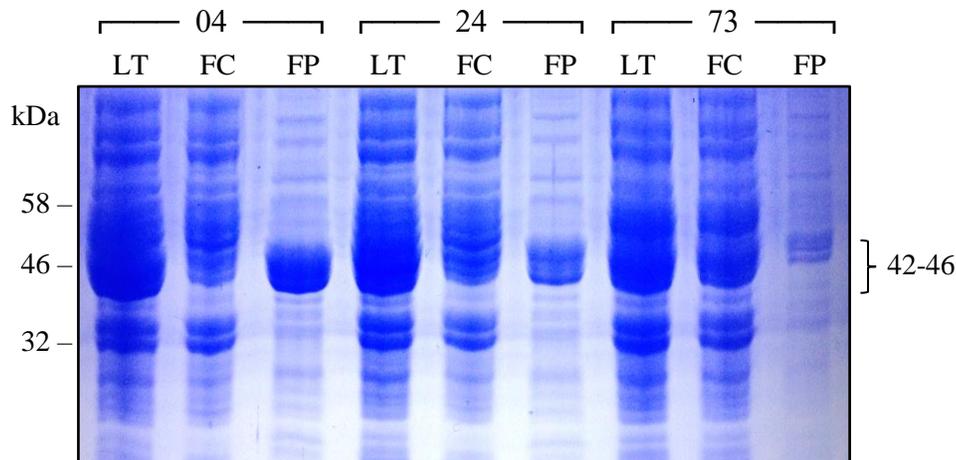


Figura 5-5. Análisis de expresión a mini-escala y fraccionamiento subcelular de cultivos bacterianos portadores de plásmidos pMHuPXXH.

Los cultivos fueron inducidos con IPTG (0.3 mM) para la sobre-expresión de proteínas. Los lisados totales y las fracciones subcelulares fueron obtenidas mediante protocolos típicos. Alícuotas (5 μ L) de cada muestra fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 12%) y teñidas con azul de brillante de *Coomassie*. XX: 04, 24, y 73; LT, lisado bacteriano total; FC, fracción citosólica; FP, fracción periplásmica. Los marcadores de peso molecular se indican en la izquierda.

Como se indica en la Figura 5-5, los cultivos portadores de los plásmidos pMHuP04H, pMHuP24H, y pMHuP73H sobre-expresan proteínas en el rango de 42 a 46 kDa, concordantes con los tamaños esperados para las variantes procesadas (± 42.6 kDa) y no procesadas (± 44.7 kDa). Más aún, las fracciones periplásmicas (FP) ostentan enriquecimiento de una proteína de 43 kDa, sugiriendo el procesamiento y la exportación de las proteínas recombinantes HPXX-MBP-6xHis hacia el espacio periplásmico de la bacteria. La autenticidad de éstas fue comprobada mediante inmuno-reconocimiento con anticuerpos dirigidos contra la proteína MBP (anti-MBP) y la etiqueta 6xHis (resultados no mostrados).

5.1.4. Purificación de las variantes HPXX-MBP-6xHis a mediana escala

La producción a midi-escala de cada una de las proteínas (HPXX-MBP-6xHis y MBP-6xHis) se realizó a partir de 2-4 cultivos bacterianos (100 mL cada uno) portadores de los respectivos plásmidos (pMHuPXXH o pMBPH). La expresión proteica se realizó utilizando condiciones típicas (37 $^{\circ}$ C, 300 rpm: 2 h de pre-inducción; 0.3 mM de IPTG; 4 h de sobre-expresión). Las pastillas bacterianas (provenientes de 200 mL de cultivo) fueron separadas mediante centrifugación y los periplasmas fueron extraídos siguiendo un protocolo estándar de fraccionamiento subcelular por choque osmótico en frío.

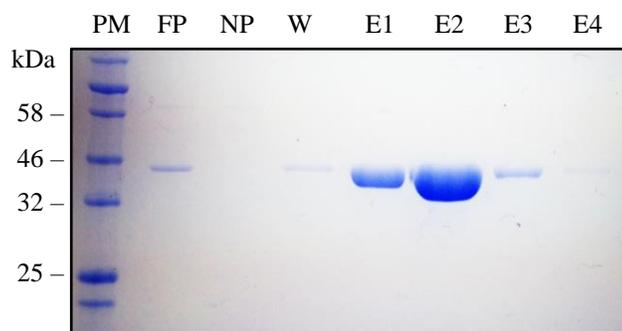


Figura 5-6. Análisis de las fracciones de purificación de la proteína MBP-6xHis mediante cromatografía de afinidad a níquel.

Para fines ilustrativos, sólo se muestra el resultado de uno de los ensayos de purificación. Alícuotas (5 μ L) de cada muestra fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 12%) y teñidas con azul de brillante de *Coomassie*. PM, Marcador de peso molecular; FP, Fracción periplásmica; NP, Fracción no pegada; W, Lavado; E1- E4: Eluciones 1-4.

Cada proteína fue purificada, mediante cromatografía de afinidad a níquel, a partir de la respectiva fracción periplásmica (40 mL). Después del análisis mediante SDS-PAGE, las fracciones cromatográficas enriquecidas en la proteína de interés (típicamente, E1 y E2) fueron mezcladas y cuantificadas.

Como se demuestra en la Figura 5-6, este procedimiento facilitó la expresión y purificación de proteínas con un adecuado grado de pureza (>95%, a juicio visual). Los resultados de la cuantificación de cada una de las proteínas HPXX-MBP-6xHis puras de enlistan en la Tabla 5-1.

Tabla 5-1. Resultados de la cuantificación de las proteínas HPXX-MBP-6xHis.

| Proteína pura | Concentración | |
|----------------|---------------|---------|
| | mg/mL | μ M |
| MBP-6xHis | 1.14 | 44 |
| HP04-MBP-6xHis | 1.00 | 23 |
| HP24-MBP-6xHis | 0.26 | 6 |
| HP51-MBP-6xHis | 0.90 | 21 |
| HP73-MBP-6xHis | 0.98 | 23 |

5.2. Purificación de HuPDI

La producción a midi-escala de la proteína HuPDI se realizó a partir de 5 cultivos bacterianos (100 mL cada uno) portadores del plásmido pQHuDPI, siguiendo un procedimiento estándar de laboratorio [Mares *et al.*, 2011].

La proteína recombinante pura (HuPDI) fue obtenida a una concentración de 1.313 mg/mL, correspondiente a 23 μ M (considerando un peso molecular teórico calculado de 56,692 g/mol).

5.3. Péptidos sintéticos como alternativa

Paralelamente, péptidos sintéticos también fueron obtenidos (a través de un servicio de síntesis comercial) con el objetivo de afinar algunos parámetros de reconocimiento. Los péptidos HUPXX fueron diseñados conteniendo la secuencia espaciadora GGGC y su extremo C-terminal amidado. Esta adición ofrece tres particularidades moleculares de interés: (1) el residuo de Cys permite la posibilidad de conjugación del péptido con fluoresceína o biotina, vía conjugación con maleimida; (2) un espacio entre el péptido y la etiqueta molecular, reduciendo el impedimento estérico en el sitio de unión; y (3) un extremo C-terminal bloqueado, reduciendo la probabilidad de formación de puentes de hidrógeno (vía el carboxilo), neutralizando una carga negativa de la carga neta del péptido (que puede interferir en el ensayo) y, además, previene la degradación por carboxipeptidasas.

Los péptidos HUPXX fueron disueltos en DMSO a una concentración teórica de 10 mM. Este disolvente fue optado como recurso tradicional, ya que no se especificaron las propiedades fisicoquímicas de los péptidos en la hoja de control de calidad proporcionada por el proveedor. Posteriormente, la concentración real de cada disolución fue determinada mediante un ensayo colorimétrico, usando el reactivo de Ellman [Winther y Thorpe, 2014].

La Tabla 5-2 enlista las concentraciones estimadas. Las soluciones de trabajo fueron ajustadas a la concentración requerida (para cada ensayo) utilizando la respectiva solución de análisis como diluyente.

Tabla 5-2. Resultados de la cuantificación de los péptidos sintéticos.

| Péptido | Secuencia (N → C) | mM |
|---------|-------------------|------|
| HUP04 | HHPIITYVGGGC | 7.40 |
| HUP24 | SAPSSKNGGGC | 7.20 |
| HUP51 | GETRAPLGGGC | 6.94 |
| HUP73 | HAIYPRHGGGC | 6.15 |

5.4. HP73 presenta afinidad por HuPDI

Dos parámetros que valoran la fuerza de unión (afinidad) entre un ligando (L) y su receptor (R) son la concentración efectiva media (CE_{50}) y la constante de disociación aparente (K_D). En una relación dosis-respuesta, la CE_{50} hace referencia a la concentración de L requerida para obtener una respuesta al 50% (p. ej., unión, reconocimiento, inhibición, activación, etc.) [Sebaugh, 2010]. Mientras que, la K_D hace alusión a la constante de equilibrio para la separación (disociación) del complejo L-R en sus componentes [Pollard, 2010]. Estos valores son relevantes para la bioquímica y farmacología de cualquier complejo (p. ej., antígeno-anticuerpo, sustrato-enzima, fármaco-diana, etc.), ya que la CE_{50} determina la

concentración de L (antígeno, sustrato, o fármaco) a la cual se obtiene una respuesta media de manera eficaz (como parámetro constante) y la K_D estima la concentración a la cual L exhibe mayor tendencia a separarse del complejo (durante el equilibrio). En este sentido, la eficiencia de un ligando puede ser definida por su CE_{50} y la afinidad con base a su K_D [Bigott-Hennkens *et al.*, 2008]. Inclusive, ambos valores pueden ser utilizados para categorizar la fuerza de interacción entre un receptor y varios ligandos (p. ej., estudios comparativos de eficacia terapéutica). Sin embargo, en última instancia, la K_D representa el parámetro de mayor confianza para valorar la afinidad de una interacción bimolecular; esto es, generalmente, la mayor afinidad hacia el receptor es exhibida por el ligando con menor K_D [Pollard, 2010].

Adicionalmente, como la afinidad puede ser influenciada por interacciones intermoleculares no covalentes (p. ej., puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, e interacciones hidrofóbicas), las estrategias modernas de diseño racional de fármacos buscan obtener moléculas (ligandos) con mayor número de tales interacciones, afectando directamente a la K_D (μM o menor) y, por ende, favoreciendo la especificidad del fármaco por la diana terapéutica [Mason, 2010].

5.4.1. HPXX-MBP-6xHis presentan diferentes CE_{50}

Inicialmente, se realizó un ensayo de reconocimiento simple (tipo ELISA), como análisis preliminar dosis-respuesta, para determinar el rango de concentraciones efectivas de cada HPXX-MBP-6xHis. Para esto, se inmovilizaron 0.5 μg de HuPDI (por pocillo) y se ensayaron 3 concentraciones (0.01, 0.1 y 1.0 mg/mL; por triplicado) de cada proteína de prueba (incluyendo a MBP-6xHis, como control). Después de una hora de interacción, el reconocimiento fue revelado mediante inmuno-detección acoplada a una reacción enzimática colorida.

Como se indica en la Figura 5-7, sólo la proteína HP73-MBP-6xHis mostró reconocimiento efectivo en el rango

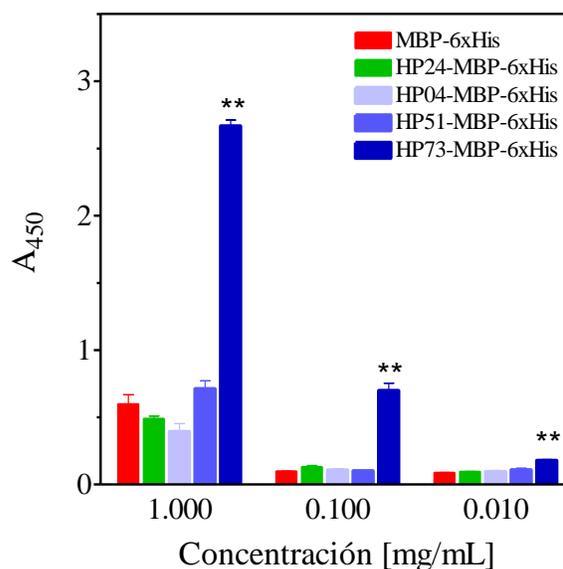


Figura 5-7. Análisis preliminar (comparativo) dosis-respuesta del reconocimiento HPXX-MBP-6xHis.

Tres concentraciones: 0.01, 0.1, y 1 mg/mL de proteína HPXX-MBP-6xHis fueron analizadas por triplicado. La dispersión corresponde al error estándar de la media. ** indica una $p < 0.01$, con respecto al control (barra roja).

analizado, revelando valores de absorbancia significativos ($p < 0.01$). De manera interesante, esto era esperado, ya que el bacteriófago que despliega a HP73 mostró la mayor capacidad de reconocimiento a HuPDI [Castellanos Martínez, 2014].

Desafortunadamente, el ensayo y sus condiciones no permitieron valorar el reconocimiento de HP04-MBP-6xHis y HP51-MBP-6xHis en concentraciones superiores a $20 \mu\text{M}$ ($\pm 1 \text{ mg/mL}$), por lo que se recomienda repetir esta determinación usando otras alternativas metodológicas. Por ejemplo, usar la proteína verde fluorescente como acarreadora del heptapéptido (detección directa), o conjugar al péptido sintético con fluoresceína (detección directa) o biotina (detección indirecta con avidina acoplada a enzima).

5.4.2. HP73-MBP-6xHis exhibe una CE_{50} en el orden micromolar

En consecuencia, el valor de CE_{50} fue estimado únicamente para la HP73-MBP-6xHis. Para esto, el intervalo de concentraciones fue ampliado, desde 0.35 a $23 \mu\text{M}$. Como se puede observar en la Figura 5-8, el reconocimiento muestra una tendencia no lineal típica de una sigmoidea dosis-respuesta, rindiendo una CE_{50} aparente de $7.6 \mu\text{M}$. De manera destacable, este valor (en el orden micromolar) sugiere un reconocimiento aceptable para moléculas con potencial farmacológico (modulador).

5.4.3. HUP73 muestra una K_D en el orden micromolar

De igual manera, la K_D fue determinada mediante un ensayo de reconocimiento competitivo (tipo ELISA), usando como variable la concentración de HUP73 y, por ende, manteniendo constantes la cantidad de HuPDI inmovilizada y la concentración HP73-MBP-6xHis.

Este ensayo puede ser interpretado de la siguiente manera: como ambas moléculas, HUP73 y HP73-MBP-6xHis, muestran afinidad comparable por HuPDI, la interacción con HP73-MBP-6xHis será desplazada conforme las concentraciones de HUP73 aumentan; por

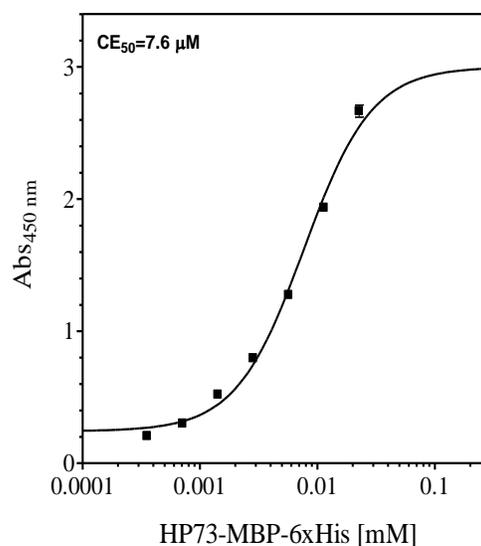


Figura 5-8. Estimación de la CE_{50} del péptido HP73 mediante un ensayo de reconocimiento simple HuPDI:HP73-MBP-6xHis.

lo tanto, el inmuno-reconocimiento con anti-MBP disminuirá como resultado del aumento en la concentración del complejo HuPDI:HUP73. Para esto, se inmovilizaron 0.5 μg de HuPDI (por pocillo) y se ensayaron 4 concentraciones (3.7 a 100 μM ; por duplicado) de HUP73 en presencia de 2 μM de HP73-MBP-6xHis. Después de una hora de reconocimiento competitivo, la interacción remanente HuPDI:HP73-MBP-6xHis fue revelada mediante inmunodetección acoplada a una reacción enzimática colorida.

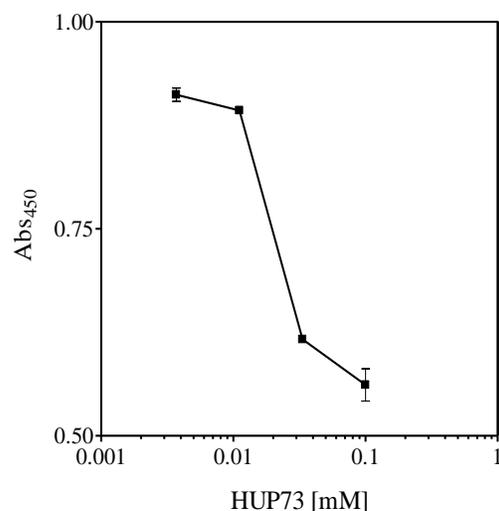


Figura 5-9. Estimación de la K_D del péptido HP73 mediante un ensayo de reconocimiento competitivo HuPDI:(HUP73/HP73-MBP-6xHis).

Como se indica en la Figura 5-9, el reconocimiento muestra una tendencia no lineal típica de una sigmoidea dosis-respuesta, dando una K_D aparente en el rango de 10 a 20 μM . De manera similar a la CE_{50} , el orden micromolar de la K_D sugiere una afinidad aceptable para moléculas con potencial farmacológico (modulador o activador).

De manera independiente a los resultados observados, es recomendable reproducir estos ensayos en rangos más amplios y obtener valores con mayor certidumbre. Además, se sugiere realizar procedimientos técnicos que garanticen valores con mayor precisión y sensibilidad; por ejemplo, como ITC (del inglés *Isothermal Titration Calorimetry*) o SPR (del inglés *Surface Plasmon Resonance*).

5.5. HP04 y HP51 muestran efecto modulador sobre la actividad reductasa

Además de su participación en los procesos celulares de UPR y ERAD, la actividad disulfuro reductasa es significativamente relevante para células que expresan a HuPDI en su superficie. Habitualmente, esta actividad catalítica es valorada mediante un método turbidimétrico estándar de reducción bioquímica de insulina. Simplemente, el enlace disulfuro inter-catenario de la insulina puede ser hidrolizado por acción catalítica de HuPDI, rindiendo liberación, agregación y precipitación de la cadena B, lo cual (en consecuencia) produce un aumento en la turbidez en la solución. De esta manera, la actividad reductasa puede ser determinada como el cambio en la DO_{655} (turbidez) con respecto al tiempo.

Cabe destacar que esta metodología ha sido ampliamente utilizada para demostrar la actividad reductasa de diferentes reductasas; p. ej. proteínas tioredoxina, dsbC, y PDI de varios organismos. Inclusive, ha sido aplicado como procedimiento de alto rendimiento en protocolos de tamizado de inhibidores de PDI.

Para valorar el efecto modulador de los 4 péptidos sintéticos (HUPXX, donde XX: 04, 24, 51, y 73), se analizaron diferentes concentraciones (0 a 1.4 mM) en su capacidad de unirse y afectar la actividad reductasa de HuPDI. Cabe mencionar que el disolvente (DMSO) interfiere en el resultado cuando se encuentra en concentraciones mayores a 5%; por lo tanto, todos los experimentos fueron realizados en condiciones de efecto mínimo asociado a la presencia del solvente. Después de 30 min de interacción HuPDI:HUPXX (para lograr el equilibrio), se analizó la actividad reductasa de cada mezcla de reacción (durante 90 min).

Para facilitar la discusión de los resultados, se presentarán en orden de trascendencia, partiendo del control de reconocimiento nulo (HUP24), seguido de HUP73, HUP04, y HUP51.

5.5.1. HUP24 no muestra efecto sobre la actividad reductasa

Como se puede observar en la Figura 5-10, la interacción HuPDI:HUP24 no afecta la actividad reductasa, ya que ninguna de las concentraciones ensayadas mostró una tendencia diferente a la actividad basal (línea roja). Es importante resaltar que este péptido fue usado como referencia de unión negativa; por lo tanto, el resultado concuerda con lo esperado.

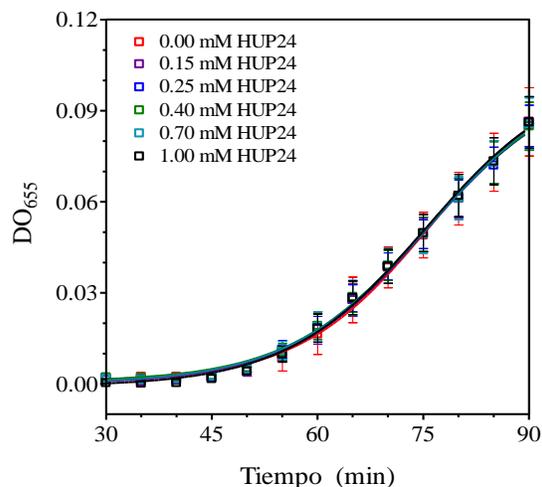


Figura 5-10. Efecto modulador de HUP24 sobre la actividad reductasa de HuPDI.

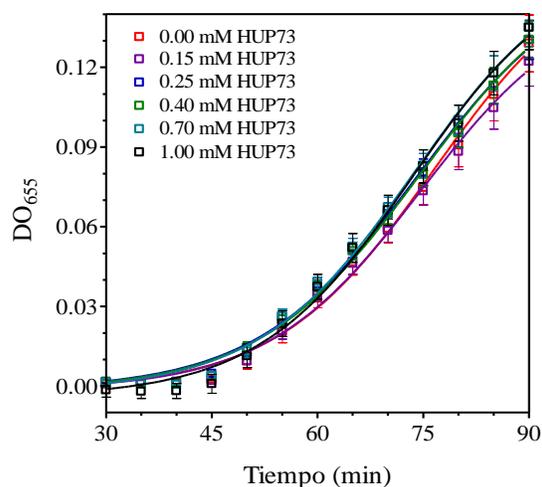


Figura 5-11. Efecto modulador de HUP73 sobre la actividad reductasa de HuPDI.

5.5.2. HUP73 tiene un efecto modulador limitado

Contrario a lo esperado (con base a los valores de CE_{50} y K_D determinados), la interacción HuPDI:HUP73 condujo un efecto modulador limitado; ya que, como se denota en la Figura 5-11, no muestra desviación alguna a concentraciones menores a 0.1 mM; sin embargo, se aprecia un efecto positivo leve a concentraciones mayores a 0.4 mM, aunque irrelevantes (a simple vista).

Estos resultados sugieren que HUP73 exhibe una afinidad aceptable hacia HuPDI, empero, dirigida a un dominio proteico que altera ligeramente su actividad reductasa.

A pesar de esto, se recomienda valorar su efecto sobre otras actividades catalíticas; p. ej., oxidasa.

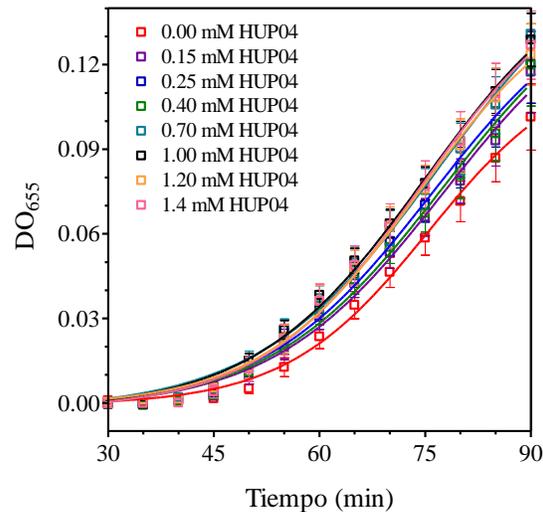


Figura 5-12. Efecto modulador de HUP04 sobre la actividad reductasa de HuPDI.

5.5.3. HUP04 y HUP51 exhiben un efecto modulador positivo

Sorpresivamente, y agradablemente inesperado, las interacciones HuPDI:HUP04 y HuPDI:HUP51 regularon un efecto modulador positivo sobre la actividad reductasa.

Como se distingue en las Figuras 5-12 y 5-13, todas las concentraciones ensayadas mostraron tendencias superiores a la basal (línea roja); inclusive, algunas con significancia estadística ($p < 0.05$).

Además, es evidente que la diferencia entre ellas se amplía conforme las concentraciones de los péptidos aumentan, lo que supone una respuesta dependiente de la dosis.

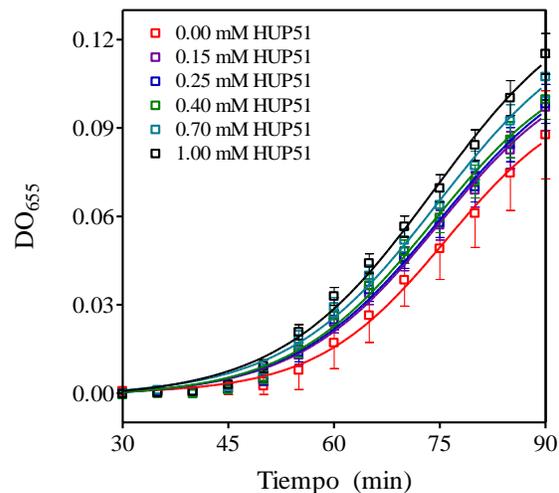


Figura 5-13. Efecto modulador de HUP51 sobre la actividad reductasa de HuPDI.

5.5.4. Análisis global

De manera resumida, la Tabla 5-3 y la Figura 5-14 muestran los resultados globales del análisis cuantitativo del efecto modulador, regulado por los péptidos HUPXX, sobre la actividad reductasa de HuPDI.

De manera congruente con lo esperado, HUP24 no ejerció ningún efecto (Tabla 5-3, $p > 0.05$; Figura 5-14, línea roja). La secuencia peptídica 24 (SAPSSKN) ha figurado como el control adecuado para validar los ensayos realizados, ya que fue seleccionada, desde el tamizado de la librería de péptidos desplegados en bacteriófagos, por su nulo reconocimiento a HuPDI, lo cual predecía un efecto mínimo sobre la función.

En relación a HUP73, ninguna de las concentraciones ensayadas mostró significancia estadística (Tabla 5-3, $p > 0.05$). No obstante, la tendencia predice un efecto modulador positivo a altas concentraciones (Figura 5-14, línea verde); sin embargo, es recomendable que esta observación sea validada experimentalmente.

En referencia a HUP04 y HUP51, ambos revelaron efecto modulador positivo a concentraciones de 1 mM o mayores (Tabla 5-3, $p < 0.05$). Pero, comparativamente, es evidente que HUP51 (Figura 5-14, línea azul fuerte) exhibe mayor capacidad que HUP04 (Figura 5-14, línea azul débil). Sin embargo, acorde a la tendencia, su habilidad reguladora es dependiente de la dosis.

Tabla 5-3. Resultados globales del análisis del efecto modulador de los péptidos HUPXX.

| Concentración [mM] | Efecto Modulador (%) | | | |
|--------------------|----------------------|----------|---------|---------|
| | HUP04 | HUP51 | HUP73 | HUP24 |
| 0.00 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 |
| 0.15 | 105 ± 4 | 108 ± 7 | 103 ± 5 | 99 ± 2 |
| 0.25 | 111 ± 4 | 111 ± 6 | 101 ± 3 | 97 ± 3 |
| 0.40 | 108 ± 6 | 113 ± 6 | 101 ± 2 | 98 ± 3 |
| 0.70 | 116 ± 8 | 120 ± 8 | 107 ± 4 | 97 ± 4 |
| 1.00 | 121 ± 4* | 129 ± 8* | 109 ± 6 | 98 ± 4 |
| 1.20 | 121 ± 5* | ND | ND | ND |
| 1.40 | 125 ± 8* | ND | ND | ND |

Cada dato representa el valor de la media ± error estándar. ND, no determinado.

* Efecto modulador con significancia estadística ($p < 0.05$). Efecto positivo con respecto a la actividad basal (ausencia de péptido).

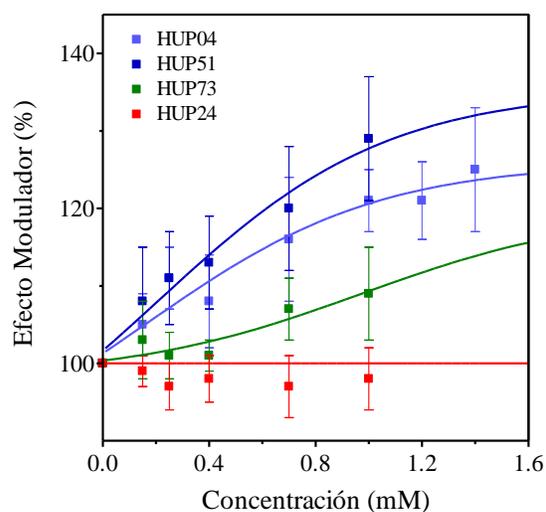


Figura 5-14. Análisis global del efecto modulador de los péptidos HUPXX sobre la actividad reductasa de HuPDI.

Tabla 5-4. Categorización de los péptidos de unión a HuPDI, en base a su efecto modulador, y análisis de sus propiedades físico-químicas inferidas.

| Péptido (N → C) | Efecto Modulador | pI | Carga Neta (a pH 7.0) | Hidrofilicidad Promedio |
|-----------------|------------------|----------|-----------------------|-------------------------|
| HP24 SAPSSKN | - | 9.9-10.1 | 1.0 | 0.5 |
| HP73 HAIYPRH | + | 9.6-9.9 | 1.2 | -0.4 |
| HP04 HHPITYV | ++ | 7.7-7.9 | 0.2 | -1.0 |
| HP51 GETRAPL | +++ | 6.9-7.0 | 0.0 | 0.5 |

Las propiedades fueron obtenidas usando los servicios en línea: (i) *Peptide Calculator* de *Bachem* (<http://www.bachem.com/service-support/peptide-calculator>), y (ii) *Peptide Property Calculator* de *Innovagen* (<http://pepcalc.com>).

Es importante mencionar que, a la fecha, no se ha reportado ningún un modulador positivo de la actividad reductasa de HuPDI; específicamente, frente a sustratos como insulina. En este sentido, recientemente se reportó a *bepristat*, un modulador alostérico de HuPDI que exhibe funcionalidad dual (inhibidor o potenciador) dependiente del sustrato [Bekendam *et al*, 2016]; actúa como inhibidor durante la reducción del enlace disulfuro inter-catenario de insulina y como potenciador durante la reducción de enlaces disulfuro de péptidos pequeños.

Por tal motivo, los resultados obtenidos en el presente estudio representan un avance técnico y científico en la generación de conocimiento útil y apropiado para el desarrollo de moléculas con potencial terapéutico. Específicamente, para el diseño de moduladores que impacten en el control de enfermedades cardiovasculares; por ejemplo, cardiopatía isquémica o algunas coagulopatías [Flaumenhaft y Furie, 2016].

5.5.5. HP04 y HP51 como moduladores positivos de HuPDI: el modelo propuesto

Previo a la propuesta, se consideró relevante analizar tres propiedades físico-químicas: punto isoeléctrico (pI), carga neta (a pH 7.0), e hidrofiliicidad promedio, inferidas a partir de secuencia primaria, para contrastar el comportamiento modulador de los péptidos de unión a HuPDI estudiados.

La Tabla 5-4 enlista la información obtenida y categorizada en base al efecto modulador revelado, utilizando cruces (+) como unidades arbitrarias. Como se puede notar, no existe correlación aparente entre el efecto modulador y la hidrofiliicidad del péptido, siendo más notorio comparando HP24 y HP51, ya que ambos rindieron resultados opuestos a pesar de que presentan el mismo valor hidrofílico. Sin embargo, por otro lado, se observa una clara correlación con respecto al valor de pI y la carga neta del péptido. En este sentido, se puede distinguir un aumento del efecto modulador conforme el valor de pI se aproxima a 7.0 (en este caso, desde valores ± 10) y, consecuentemente, la carga neta tiende al equilibrio. Por lo tanto,

es factible asumir que la modulación positiva de la actividad reductasa de HuPDI puede regularse con péptidos o moléculas con propiedades similares a las mostradas por HP51.

En consideración a la propuesta de modelo de interacción péptido:HuPDI y regulación de la actividad reductasa, es necesario recordar dos aspectos clave de la estructura terciaria de HuPDI: (1) puede encontrarse en dos estados conformacionales, oxidado (abierto) o reducido (cerrado), los cuales dependen del movimiento del *linker-x*; y (2) posee un bolsillo de unión a sustrato, localizado en el dominio b', que puede funcionar como sitio de regulación alostérica; ya que cuando se bloquea, por péptidos o proteínas, se induce el desplazamiento del *linker-x* y el aumento en la actividad reductasa de los dominios a y a'.

A la luz de lo anterior, la Figura 5-15 muestra el modelo propuesto para la interacción de los péptidos HP04 o HP51 con la proteína HuPDI, y su efecto modulador positivo sobre la actividad reductasa: inicialmente, los péptidos interactúan con la región de unión al sustrato del dominio b' (barra amarilla); específicamente, en un lugar diferente al sitio de unión a sustratos grandes (p. ej. insulina), promoviendo el desplazamiento del *linker-x* y la adopción del estado conformacional cerrado; enseguida, las condiciones redox prevalentes favorecen el estado reducido de los dominios catalíticos e inducen el incremento de la actividad reductasa. Además, se sospecha que la interacción estabiliza la conformación cerrada, de manera reversible y dependiente de la concentración del péptido, desplazando el equilibrio hacia el estado preferentemente reducido de HuPDI.

Por lo tanto, es factible suponer que las propiedades biofísicoquímicas de HP04 y HP51 constituyen una plataforma accesible para el diseño racional de fármacos con actividad

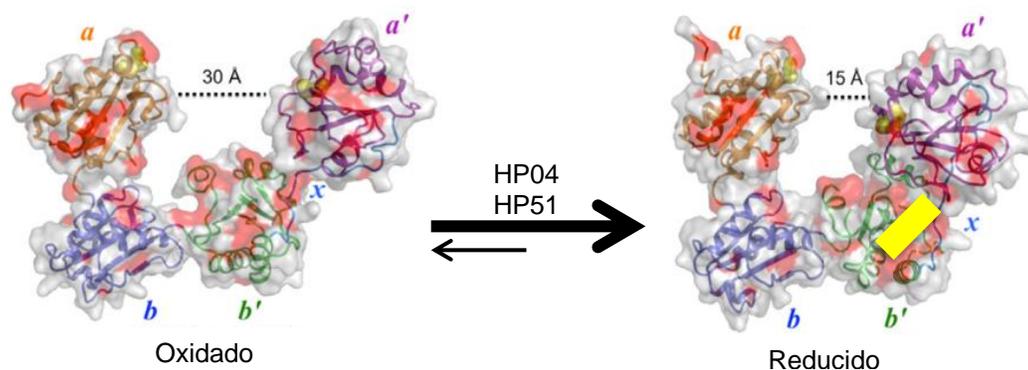


Figura 5-15. Modelo propuesto de interacción péptido:proteína y efecto sobre la estructura de HuPDI.

Las flechas señalan reversibilidad y tendencia del estado favorecido (reducido) durante el equilibrio. La barra amarilla indica la posición inferida de interacción HuPXX:HuPDI.

reguladora de las funciones fisiológicas de HuPDI. Inclusive, estas propiedades pueden ser consideradas como base para el diseño de moléculas con actividad terapéutica. En relación a esto último, la predicción de interacciones moleculares, asistida por protocolos bioinformáticos de modelado y acoplamiento molecular, representa una alternativa viable para la generación de moléculas con potencial terapéutico anti-HuPDI; específicamente, la peptidomimética o proteomimética ofrecen algoritmos de aplicabilidad validada.

5.6. Ningún péptido HPXX presenta efecto sobre la función chaperona

La actividad no catalítica más estudiada de HuPDI es la función chaperona; la cual se caracteriza principalmente por su habilidad de unirse a polipéptidos desplegados (o mal plegados) y evitar la agregación. Actualmente, existe una amplia diversidad de métodos para valorar esta función; sin embargo, se ha utilizado como estándar el ensayo turbidimétrico de protección de la agregación de insulina (la cual ocurre a consecuencia de la reducción química de la hormona). En principio, cuando el enlace disulfuro inter-catenario de la insulina es hidrolizado por agente reductor DTT (20 mM), las regiones hidrofóbicas de la cadena B (liberada) tienden a agregarse y precipitarse súbitamente, aumentando la turbidez del medio;

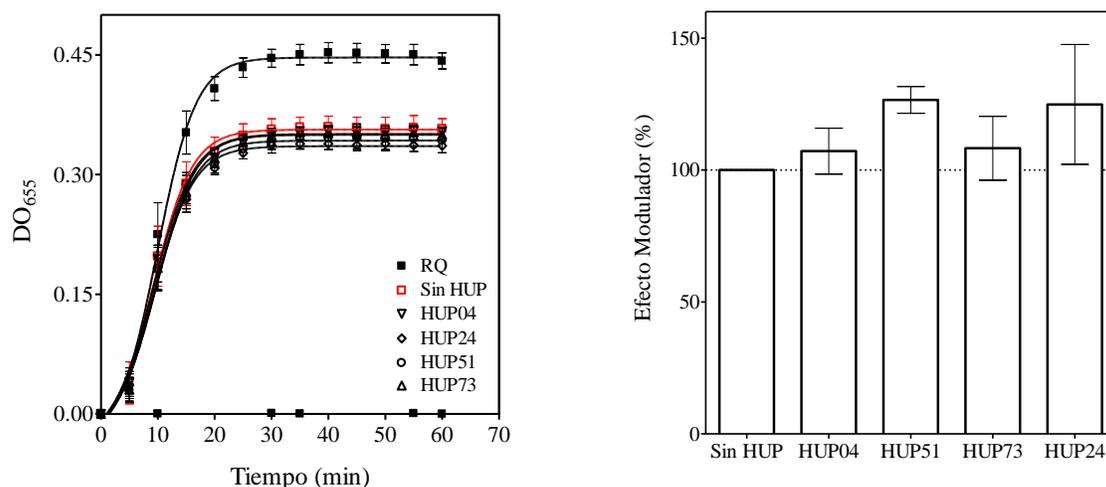


Figura 5-16. Análisis del efecto modulador de los péptidos HUPXX sobre la actividad chaperona de HuPDI.

Ensayo de protección de la agregación de la cadena B de insulina. La reducción química (20 mM de DTT), en ausencia de HuPDI, se utilizó como control de agregación máxima (0% de actividad chaperona) y una reacción en condiciones similares, pero en presencia de 1 μ M de HuPDI, se consideró como control de mínima agregación (100% de actividad chaperona, línea roja). La presencia de cualquiera de los péptidos no muestran un efecto significativo ($p > 0.05$)

sin embargo, en presencia de una chaperona (p. ej., HuPDI), las regiones hidrofóbicas (expuestas) de la cadena B forman complejos solubles con la chaperona, manteniendo la nitidez de la solución. Por lo tanto, la función chaperona es valorada mediante registros de la turbidez (DO_{655}) de una solución de reacción, en ausencia y presencia de HuPDI.

Para valorar el efecto modulador de los péptidos HUPXX sobre la función chaperona de HuPDI, se realizó un análisis preliminar usando la relación molar 50:1 (péptido:chaperona) en el ensayo típico de protección de la agregación de insulina. Cabe mencionar que esta relación permitió mantener la concentración de DMSO en valores menores al 1%; evitando que el solvente contribuya significativamente al resultado. De manera notable, ninguno de los péptidos mostró un efecto significativo sobre la actividad chaperona de HuPDI, como se muestra en la Figura 5-16. No obstante, es factible suponer dos eventos que pueden explicar (hipotéticamente) los resultados: (1) la concentración ensayada de los péptidos HUPXX (50 μ M) es menor al límite mínimo del rango dinámico de afinidad y, por ende, su presencia no afecta a la función; y (2) la cadena B compite selectivamente por el mismo sitio de unión en HuPDI, exhibiendo mayor afinidad, desplazando al péptido y, por consecuencia, limitando cualquier posibilidad de regulación del función. Ante estas especulaciones, se recomienda realizar el mismo ensayo a concentraciones mayores y crecientes del péptido (p. ej., de 0.1 a 1 mM, equivalente a una relación 100:1 a 1000:1) y así validar la hipótesis. Por otro lado, también se recomienda explorar, en condiciones similares al ensayo estándar, otros métodos de análisis de la actividad chaperona. Por ejemplo, la renaturalización de la proteína verde fluorescente (GFP) [Mares *et al.*, 2011]. Además, es conveniente señalar que la estructura proteica asociada a la función chaperona de HuPDI ofrece particularidades únicas, lo que representa una ventaja estratégica para el diseño racional de fármacos con mayor certidumbre terapéutica.

6. CONCLUSIONES

Los péptidos de unión a la proteína HuPDI: HP04, HP51, y HP73, fueron presentados de manera monovalente como secuencia N-terminal fusionada a la proteína de unión a maltosa etiquetada con un hexámero de histidinas (MBP-6xHis). Las proteínas de fusión (HPXX-MBP-6xHis) fueron eficientemente expresadas en el periplasma bacteriano y purificadas adecuadamente mediante cromatografía de afinidad a níquel.

El péptido HP73 exhibe una alta afinidad hacia HuPDI, mostrando una concentración efectiva media (CE_{50}) de 7.6 μ M, en un ensayo de saturación (reconocimiento simple, usando a la proteína HP73-MBP-6xHis como ligando), y una K_D en el rango 10 a 20 μ M, en un ensayo de desplazamiento (reconocimiento competitivo, usando a la proteína HP73-MBP-6xHis como ligando de desplazamiento y al péptido sintético HUP73 como ligando de competencia). Se recomienda el uso de alternativas metodológicas para el cálculo de la K_D (ensayos fluorescentes o técnicas de alta precisión y sensibilidad). Los péptidos HP51 y HP04 mostraron un efecto modulador positivo, de manera reversible y dependiente de la dosis, sobre la actividad reductasa de HuPDI, exhibiendo una respuesta significativa a concentraciones de 1 mM, o mayores, en un ensayo estándar de reducción de insulina (usando los péptidos sintéticos correspondientes como reguladores alostéricos). Con base a estos resultados, es factible proponer (como modelo) que los péptidos interactúan con una región superficial de la HuPDI, cercana al binomio formado por el dominio b' y el *linker-x*, lo cual limita la plasticidad estructural de la proteína, abierta ↔ cerrada, sin bloquear el sitio de unión a sustratos.

Ninguno de los péptidos analizados mostró efecto sobre la actividad chaperona de HuPDI, presentando una respuesta nula, cuando se encuentran en una relación molar 50:1, en un ensayo típico de protección de la agregación de insulina. No obstante, se recomienda analizar el efecto regulatorio usando otras condiciones experimentales, o (inclusive) utilizar otros ensayos de evaluación de la función chaperona; p. ej. renaturalización de la proteína verde fluorescente (GFP).

Finalmente, el presente estudio confirma el potencial que ofrece la técnica de tamizado de péptidos desplegados en bacteriófagos como estrategia para la adecuada selección de moléculas con potencial farmacológico; además, demuestra que la interacción péptido-proteína puede ser útil para: (i) definir regiones específicas en la diana terapéutica, que son susceptibles a regulación, e (ii) identificar propiedades estructurales específicas del ligando, que funcionen como base para el diseño racional fármacos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abromaitis S, Stephens RS. Attachment and entry of Chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase. *PLoS Pathogens*. 2009; 5 (4): e1000357.
- Aghebati-Maleki L, Bakhshinejad B, et al. Phage display as a promising approach for vaccine development. *J Biomed Sci*. 2016; 23 (1): 66.
- Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L. The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1783: 535-48.
- Araki K, Nagata K. Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 3 (11): a007526.
- Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem*. 2012; 81: 767-93.
- Barik S. Megaprimer PCR. *Methods Mol Biol*. 2002; 192: 189-96.
- Bekendam RH, Bendapudi PK, et al. A substrate-driven allosteric switch that enhances PDI catalytic activity. *Nat Commun*. 2016; 7: 12579.
- Benham AM, van Lith M, et al. Ero1-PDI interactions, the response to redox flux and the implications for disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013; 368 (1617): 20110403.
- Benham AM. The protein disulfide isomerase family: key players in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 16 (8): 781-9.
- Bigott-Hennkens HM, Danoon S, et al. In vitro receptor binding assays: general methods and considerations. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2008; 52 (3): 245-253.
- Braakman I, Bulleid N. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*. 2011; 80: 71-99.
- Braakman I, Hebert D. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5: a013201.
- Castellanos-Martínez, Ramón. Aislamiento e identificación de heptapéptidos que reconocen a la proteína PDIA1/P4HB de humano. Tesis de Licenciatura. Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Universidad Autónoma de Baja California. Noviembre de 2014.
- Chiang WC, Chan P, et al. Achromatopsia mutations target sequential steps of ATF6 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114 (2): 400-05.
- Cui W, Li J, Ron D, Sha B. Structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011; 67 (Pt 5): 423-28.
- Cumming RC, Andon NL, et al. Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem*. 2004; 279 (21): 21749-58.
- Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature*. 2003; 426 (6968): 884-90.
- Eirich J, Braig S, et al. A small molecule inhibits protein disulfide isomerase and triggers the chemosensitization of cancer cells. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014; 53 (47): 12960-5.
- Ellgaard L, Ruddock LW. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep*. 2005; 6 (1): 28-32.
- Feige MJ, Hendershot LM. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Curr Opin Cell Biol*. 2011; 23(2):167-75.
- Finka A, Sharma S, Goloubinoff P. Multi-layered molecular mechanisms of polypeptide holding, unfolding and disaggregation by HSP70/HSP110 chaperones. *Front Mol Biosci*. 2015; 2: 29.
- Flaumenhaft R, Furie B, Zwicker JI. Therapeutic implications of protein disulfide isomerase inhibition in thrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015; 35: 16-23.
- Flaumenhaft R, Furie B. Vascular thiol isomerases. *Blood*. 2016; 128 (7): 893-901.
- Fosgerau K, Hoffman T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*. 2015; 20 (1):122-8.
- Galligan JJ, Petersen DR. The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum Genomics*. 2012; 6(1):6.
- Gardner B, Pincus D, et al. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5: a013169.
- Gentilucci L, De Marco R, Cerisoli L. Chemical modifications designed to improve peptide stability: incorporation of non-natural amino acids, pseudo-peptide bonds, and cyclization. *Curr Pharm Des*. 2010; 16 (28): 3185-203.
- Gidalevitz T, Stevens F, Argon Y. Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833 (11): 2410-24.
- Goplen D, Wang J, et al. Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma. *Cancer Res*. 2006; 66 (20): 9895-902.
- Gorres KL, Raines TR. Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2001; 45 (2): 106-24.
- Grek C, Townsend DM. Protein disulfide isomerase superfamily in disease and the regulation of apoptosis. *Endoplasmic Reticulum Stress Dis*. 2014; 1 (1): 4-17.
- Groner B, Weber A, Mack L. Increasing the range of drug targets. *Bioengineered*. 2012; 3 (6):320-5.
- Hatahet F, Ruddock LW. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. 2009; 11 (11): 2807-50.
- Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev*. 2007; 87 (4): 1377-408.
- Helmer D, Schmitz K. Peptides and peptide analogs to inhibit protein-protein interactions. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 917: 147-83.
- Hudson DA, Gannon SA, Thorpe C. Oxidative protein folding: from thiol-disulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med*. 2015; 80: 171-82.
- Hyde-DeRyuscher R, Paige LA, et al. Detection of small-molecule enzyme inhibitors with peptides isolated from phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Chem Biol*. 2000; 7 (1): 17-25.
- Kahn HA, Mutus B. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Front Chem*. 2014; 2: 70.
- Kahn MM, Simizu S, et al. Discovery of a small molecule PDI inhibitor that inhibits reduction of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *ASC Chem Biol*. 2011; 6: 245-51.
- Kammann M, Laufus J, et al. Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acid Res*. 1989; 17 (13): 5404.
- Karala AR, Ruddock LW. Bacitracin is not a specific inhibitor of protein disulfide isomerase. *FEBS J*. 2010; 277 (11): 2454-62.

- Kemmink J, Darby NJ, et al. The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. *Curr Biol*. 1997; 7 (4): 239-245.
- 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 K, Hahm E, Lo J, et al. Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. *Blood*. 2013; 122 (6): 1052-61.
- Kim YE, Hipp M, et al. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem*. 2013; 82: 323-55.
- Kozlov G, Maahtänen P, et al. A structural overview of the PDI family of proteins. 2010; 277:3924-36.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227, 680-685.
- Lin L, Gopal S, et al. Quercetin-3-rutinoside inhibits protein disulfide isomerase by binding to its b'x domain. *J Biol Chem*. 2015; 290 (39): 23543-52.
- Lounnas V, Ritschel T, et al. Current progress in Structure-Based Rational Drug Design marks a new mindset in drug discovery. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2013; 5: e201302011.
- Mares RE, Meléndez-López S, Ramos MA. Acid-denatured Green Fluorescent Protein (GFP) as model substrate to study the chaperone activity of protein disulfide isomerase. *Int J Mol Sci*. 2011; 12 (7): 4625-36.
- Mares RE, Minchaca AZ, et al. Ch 2. PDIA1/P4HB as model of enzyme with molecular chaperone function. In *New Research on Molecular Chaperones*, Jaime Wyatt (Ed). Nova Science Publishers. NY, 2015.
- Mason JM. Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention. *Future Med Chem*. 2010; 2 (12): 1813-22.
- Mavromoustakos T, Durdagu S et al., Strategies in the rational drug design. *Curr Med Chem*. 2011; 18 (17): 2517-30.
- Meusser B, Hirsch C, et al. ERAD: the long road to destruction. *Nature Cell Biol*. 2005; 7 (8): 767-72.
- Molek P, Strukelj B, Bratkovic T. Peptide phage display as a tool for drug discovery: Targeting Membrane Receptors. *Molecules*. 2011; 16: 857-87.
- Mossuto MF. Disulfide bonding in neurodegenerative misfolding diseases. *Int J Cell Biol*. 2013; 2013: 318319.
- Nishikawa S, Brodsky JL, Nakatsukasa K. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem*. 2005; 137 (5): 551-5.
- Noiva R, Freedman R, Lennarz W. Peptide binding to protein disulfide isomerase occurs at a site distinct from the active sites. *J Biol Chem*. 1993; 268 (26): 19210-7.
- Oka OB, Yeoh HY, Bulleid NJ. Thiol-disulfide exchange between the PDI family of oxidoreductases negates the requirement for an oxidase or reductase for each enzyme. *Biochem J*. 2015; 469: 279-88.
- Okumura M, Kadokura H, Inaba K. Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. 2015; 83: 314-22.
- Omidfar K, Daneshpour M. Advances in phage display technology for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2015; 10 (6): 651-69.
- Parakh S, Atkin JD. Novel roles for protein disulphide isomerase in disease states: a double edged sword? *Front Cell Dev Biol*. 2015; 3: 30.
- Pearse B, Hebert D. Lectin chaperones help direct the maturation of glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803 (6): 684-93.
- Pollard TD. MBoC Technical Perspective. *Molec Biol Cell*. 2010; 21: 4061-4067.
- Rajpal G, Schuiki I, et al. Action of protein disulfide isomerase on proinsulin exit from endoplasmic reticulum of pancreatic β -cells. *J Biol Chem*. 2012; 287 (1): 43-7.
- Ramos MA, Mares RE, et al. *Entamoeba histolytica*: biochemical characterization of a protein disulfide isomerase. *Exp parasitology*. 2011; 128 (1): 76-81.
- Rodrigo-Brenni MC, Gutierrez E, Hegde RS. Cytosolic quality control of mislocalized proteins requires RNF126 recruitment to Bag6. *Molecular Cell*. 2014; 55 (2): 227-37.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY. 2011.
- Scheper GC, van der Knaap MS, Proud CG. Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease. *Nat Rev Genet*. 2007; 8 (9): 711-23.
- Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*. 2011; 10: 128-134.
- Serve O, Kamiya Y, et al. Redox-dependent domain rearrangement of protein disulfide isomerase coupled with exposure of its substrate-binding hydrophobic surface. *J Mol Biol*. 2010; 369 (2): 361-74.
- Sharda A, Kim S, et al. Defective PDI release from platelets and endothelial cells impairs thrombus formation in Hermansky-Pudlak syndrome. 2015; 125 (10): 1633-43.
- Shen J, Prywes R. ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6. *Methods*. 2005; 35 (4): 382-9.
- Smith M, Ploegh H, Weissman J. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*. 2011; 334 (6059): 1086-90.
- Thorsten YR, Zahng Y, et al. Leaderless polypeptides efficiently extracted from whole cells by osmotic shock. *J Bacteriol*. 1997; 179 (17): 5333-9.
- Troitskaya LA, Kodadek T. Peptides as modulators of enzymes and regulatory proteins. *Methods*. 2004; 32: 406-15.
- Tsai B, Rodighiero C, et al. Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell*. 2001; 104: 937-48.
- Tufo G, Jones AWE, et al. The protein disulfide isomerases PDIA4 and PDIA6 mediate resistance to cisplatin-induced cell death in lung adenocarcinoma. *Cell Death Differ*. 2014; 21 (5): 685-95.
- Vabulas RM, Raychaudhuri S, et al. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2 (12): a004390.
- Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011; 334:1081-5.
- Wan SW, Lin CF, et al. Endothelial cell surface expression of protein disulfide isomerase activates β 1 and β 3 integrins and facilitates dengue virus infection. *J Cell Biochem*. 2012; 113: 1681-91.
- Wang C, Chen S, et al. Plasticity of human protein disulfide isomerase: evidence for mobility around the X-linker region and its functional significance. *J Biol Chem*. 2010; 285 (35): 26788-97.
- Wang C, Li W, et al. Structural insights into the redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19 (1): 36-45.
- Wang CC, Tsou CL. Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes. *FEBS Letters*. 1998; 425: 382-4.
- Wang L, Wang X, Wang CC. Protein disulfide-isomerase, a folding catalyst and a redox-regulated chaperone. *Free Radic Biol Med*. 2015; 83: 305-13.

- Williams DB. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 2006; 119: 615-23.
- Winther JR, Thorpe C. Quantification of thiols and disulfides. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840 (2): 838-46.
- Xu C, Ng DT. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16 (12): 742-52.
- Xu LR, Liu XL, et al. Protein disulfide isomerase interacts with Tau protein and inhibits its fibrillization. *PLoS ONE.* 2013; 8 (10): 1-13.
- Xu S, Butkevich AN, et al. Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109 (40): 16348-53.
- Xu S, Sankar S, Neamati N. Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discov. Today.* 2014; 19 (3): 222-40.
- Yagi-Utsumi M, Satoh T, Kato K. Structural basis of redox-dependent substrate binding of protein disulfide isomerase. *Scientific Reports.* 2015; 5: 13909.
- Yang J, Nune M, et al. Close and allosteric opening of the polipeptide-binding site in a human HSP70 chaperone BiP. *Structure.* 2015; 23 (12): 2191-203.
- Zimmermann R, Eyrisch S, et al. Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808 (3): 912-24.
- Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996; 236 (2): 302-8.