

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

Análisis e Inhibición de la Actividad Oxidasa de la Enzima

Proteína Disulfuro Isomerasa de *Entamoeba histolytica*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. PALOMA DANITZA MAGAÑA CABRALES

Tijuana, B. C.

Octubre de 2009.

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

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

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento de la UNIVERSIDAD
AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA (10^a Convocatoria Interna de Apoyo a
Proyectos de Investigación) y del CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y
TECNOLOGIA (SEP-CONACYT 2004 para Ciencia Básica Proyecto 47554)

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	4
I.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	4
I.1.1. Genética	4
I.1.2. Ciclo biológico.....	5
I.1.3. Morfología	6
I.1.4. Fisiología	7
I.1.5. Patogenia.....	7
I.1.6. Diagnóstico y tratamiento	9
I.2. Vía de secreción de proteínas en células eucariotas	9
I.2.1. Retículo endoplásmico y transporte de proteínas	10
I.2.2. Modificaciones post-traduccionales y control de calidad en el RE	11
I.3. Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI)	11
I.3.1. Organización y dominios	11
I.3.2. La superfamilia de tiorredoxina.....	12
I.3.3. PDI como oxidorreductasa.....	13
I.3.4. Plegamiento oxidativo	13
I.4. Proteína Disulfuro Isomerasa de <i>E. histolytica</i> (<i>EhPDI</i>).....	14
II. JUSTIFICACIÓN.....	17
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
III.1. Hipótesis	19
III.2. Objetivo General	19
III.3. Objetivos Específicos.....	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	20
IV.1 Reactivos.....	20
IV.2 Plásmido, bacterias y medios de cultivo	20
IV.2.1. pQHPDI, plásmido de expresión de <i>EhPDI</i>	20
IV.2.2. Bacterias y medios de cultivo	21
IV.3 Expresión y purificación de la enzima <i>EhPDI</i>.....	21

IV.3.1. Expresión proteica	21
IV.3.2. Lisis celular en condiciones desnaturalizantes	21
IV.3.3. Purificación en condiciones renaturalizantes y reoxidantes	22
IV.3.4. Estabilización de la enzima <i>EhPDI</i> purificada.....	22
IV.4. Lisozima como sustrato.....	23
IV.4.1. Lisozima desnaturalizada y reducida (drLZM).....	23
IV.4.2. Lisozima nativa (nLZM).....	23
IV.4.3. Actividad lítica de lisozima	23
IV.5. Replegamiento oxidativo asistido por <i>EhPDI</i>	24
IV.6. Efecto de la concentración del sustrato en el replegamiento oxidativo asistido por <i>EhPDI</i>.....	25
IV.7. Inhibición del replegamiento oxidativo asistido por <i>EhPDI</i>.....	26
IV.7.1. Inhibición por bacitracina	26
IV.7.2. Inhibición por 5,5'-ditio- <i>bis</i> -(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB, reactivo de Ellman).....	27
IV.7.3. Inhibición por 4,4'-ditio-dipiridina (4-DTDP, <i>Aldrithiol</i> TM -4).....	28
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
V.1. Expresión y purificación de <i>EhPDI</i>.....	29
V.2. La actividad de la lisozima depende de un correcto estado oxidativo.....	29
V.3. La enzima <i>EhPDI</i> exhibe actividad oxidasa	30
V.4. La actividad oxidasa de <i>EhPDI</i> depende de la concentración de lisozima	32
V.5. El antibiótico bacitracina inhibe la actividad oxidasa de <i>EhPDI</i>.....	33
V.6. El reactivo de Ellman inhibe la actividad oxidasa de <i>EhPDI</i>	35
V.7. El reactivo <i>Aldrithiol</i>TM-4 inhibe la actividad oxidasa de <i>EhPDI</i>.....	36
V.8. Los inhibidores de la actividad oxidasa de <i>EhPDI</i> exhiben diferentes CI_{50}	38
VI. CONCLUSIONES	40
VII. REFERENCIAS.....	41

I. INTRODUCCIÓN

El género *Entamoeba* contiene muchas especies, seis de las cuales (*histolytica*, *dispar*, *moshkovskii*, *polecka*, *coli*, *harmanni*) pueden infectar y residir en el lumen intestinal de seres humanos. Sin embargo, *E. histolytica* es la única especie que está asociada a efectos patológicos, las otras especies son consideradas no patógenas.

E. histolytica es un parásito protozooario anaeróbico facultativo de características patógenas para el hombre, quién es el único hospedero, causándole amibiasis, incluyendo colitis amibiana y absceso hepático amibiano [1].

Los análisis moleculares han demostrado que *E. histolytica* es un eucariota inferior, carente de estructuras subcelulares típicas, tales como mitocondrias, retículo endoplásmico y complejo de Golgi. Sin embargo, se ha encontrado evidencia de genes mitocondriales y de una estructura remanente parecida a la mitocondria, así como de una proteína de 51KDa con alta similitud a la secuencia de calreticulina de espinacas, indicando la presencia de un sistema equivalente al retículo endoplásmico.

Morfológicamente, *E. histolytica* y *E. dispar* son indistinguibles; sin embargo, *E. histolytica* es una especie distinta en virtud de sus antígenos únicos. Esta distinción entre *E. histolytica* y *E. dispar* fue caracterizada en gel de electroforesis mediante la movilidad de 4 isoenzimas (L-malato:NADP tioxidorreductasa, glucosa fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa y hexocinasa) [2].

I.1. *Entamoeba histolytica*

I.1.1. Genética

E. histolytica cuenta con un genoma pequeño (aproximadamente de 20 MB) muy repetitivo, con las secuencias codificantes densamente empaquetadas y pocos intrones. El

cariotipo molecular es complejo, con moléculas de ADN desde 227 a 1361 Kb, múltiples moléculas circulares (de 5 a 50 Kb) y un ADN en la mitocondria rudimentaria.

I.1.2. Ciclo biológico

El ciclo de vida de la *E. histolytica* involucra los estadios de trofozoito (activamente metabólico y móvil) y de quiste (forma infectante). El quiste es eliminado en las heces de los individuos infectados, y son viables sólo si se mantienen húmedos y se encuentran en un medio ambiente con condiciones favorables, ya que pueden ser destruidos con rapidez por desecamiento y calor.

La re-infección del mismo individuo o la infección de un nuevo hospedero puede ocurrir de forma directa, por los dedos contaminados (vía de transmisión mano-boca) o de forma indirecta, principalmente a través de los alimentos y bebidas contaminados.

Los quistes ingeridos pasan a través del estómago y el desenquistamiento ocurre en el intestino delgado. Estos microorganismos avanzan hacia el intestino grueso, donde se alimentan y crecen hasta su tamaño máximo. Por ende, los quistes participan tanto en la transmisión como en la reproducción del microorganismo.

Los trofozoitos se desplazan a lo largo del intestino hasta que encuentran las condiciones favorables para la colonización, donde se reproducen por fisión binaria rápida y repetida. En general, esto se produce en el área ileocecal, pero pueden tener lugar en un nivel más bajo del intestino.

Es probable que la invasión tisular sea llevada a cabo por medio lítico y contacto físico. Una vez que los trofozoitos han ingresado en los tejidos, la digestión lítica de las células del hospedero proporciona el alimento para las amibas, lo que les permite avanzar. En ciertas condiciones, algunos trofozoitos pueden invadir al hígado y otros tejidos extra-intestinales. Cuando los trofozoitos son expulsados hacia la luz intestinal, comienza su salida del hospedero, si esta salida no es demasiado rápida pasan por un estadio de prequiste y aparecen en las heces como quistes [3].

La opinión de que existe una cepa no patógena de *E. histolytica* ha sido avalada [2]. Sin embargo, actualmente se acepta que se trata de otra especie, denominada *E. dispar*. Además, se sabe que la virulencia de *E. histolytica* varía con la geografía, la flora bacteriana del intestino, la resistencia y el estado nutricional del hospedero (Figura 1).

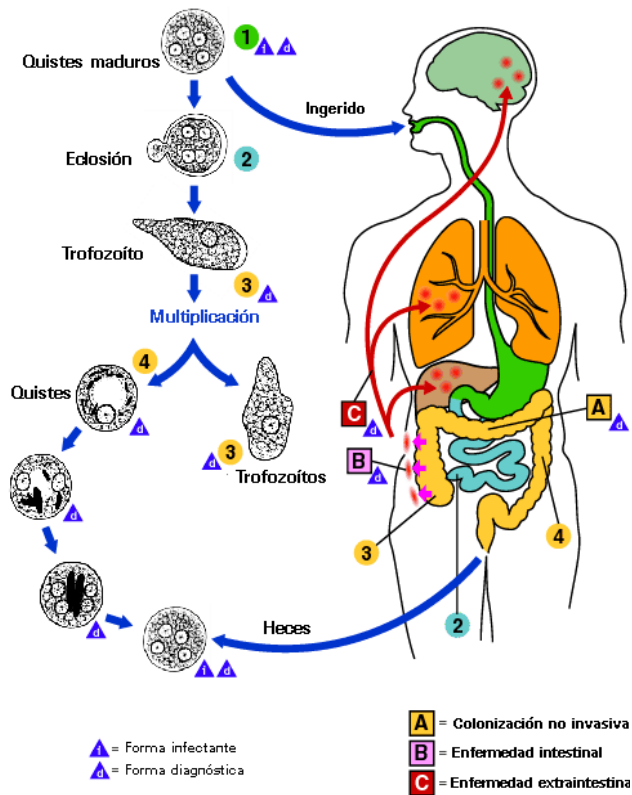


Figura 1. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*.

I.1.3. Morfología

Es posible distinguir varias formas (o estadios) de desarrollo en *E. histolytica*, presentes durante su ciclo de vida (Figura 2):

El trofozoito es la forma vegetativa y activamente móvil se encuentra en los tejidos y a veces en las heces líquidas. Su tamaño puede variar entre 15 y 30 μm , cuenta con un núcleo esférico de doble membrana con alta concentración de cromatina puntiforme y generalmente concéntrica llamado cariosoma central así como la formación de cromatina en la periferia del núcleo. El trofozoito es un organismo unicelular que se mueve por medio de pseudópodos, con movimientos rápidos y unidireccionales. El citoplasma está dividido en ectoplasma que es hialino y transparente y el endoplasma que es granuloso [3].

El quiste es la forma de resistencia e infectiva del parásito. Contiene de 1 a 4 núcleos, dependiendo de la madurez. Es de forma redondeada, refringente con una



Figura 2. Estadios de desarrollo de *E. histolytica*. Imágenes de microscopía en campo luminoso de un quiste (izquierda) y un trofozoito (derecha).

membrana claramente demarcada. En el citoplasma se pueden ver con frecuencia de 1 a 3 inclusiones de glucógeno, llamados cuerpos cromatidales [2].

I.1.4. Fisiología

E. histolytica se alimenta del bolo alimenticio, de bacterias intestinales, de líquidos intracelulares, y de células que destruye previamente; además, tiene la capacidad de fagocitar eritrocitos. Los trofozoitos tienen proteínas membranales capaces de formar poros en la membrana de las células humanas (destruyéndolas por choque osmótico), y adhesinas que le permiten fijarse a las células de la mucosa, de modo que no sean arrastrados por la diarrea. Además, producen y secretan proteinasas que degradan el medio extracelular humano, permitiéndole invadir otros órganos.

I.1.5. Patogenia

El protozoario parásito intestinal *E. histolytica* infecta aproximadamente a 500 millones de personas en países en vías de desarrollo, ocasionando aproximadamente 40 millones de casos de disentería y abscesos hepáticos amibianos.

La patogénesis en la amibiasis invasiva requiere de la adherencia de los trofozoitos de *E. histolytica* a la superficie de la pared del intestino, de los efectos

citolíticos y proteolíticos en los tejidos, de la resistencia del parásito a los mecanismos de defensa del hospedero. Las características del hospedero influyen también en la susceptibilidad a la enfermedad invasiva.

Los trofozoitos poseen una proteína (lectina) que reconoce los azúcares galactosa y N-acetilglucosamina en la superficie de las células del hospedero. Si la lectina del parásito se une a las glicoproteínas (mucinas) de la mucosa intestinal del hospedero, es probable que ocurra una infección intestinal no invasiva, en cambio, si los trofozoitos penetran la pared de la mucosa del intestino y la lectinas se unen de forma directa a los carbohidratos de la superficie celular, ocurriendo así una cascada de eventos que llevan a la muerte celular y la progresión hacia una enfermedad invasiva. Por tanto, la lectina Gal/NAcGal, es esencial para la sobrevivencia del parásito y para invadir al hospedero. Por otra parte, la incapacidad de este parásito de sintetizar *de novo* purinas y pirimidinas, lo hace completamente dependiente de su habilidad para recuperar estos compuestos esenciales de su hospedero [4].

La actividad citolítica de la *E. histolytica* depende de la función de los microfilamentos del parásito, de la concentración de calcio, de la actividad de la enzima fosfolipasa A parasitaria y del mantenimiento de pH ácido en las vesículas endocíticas amibianas. *E. histolytica* contiene numerosas enzimas proteolíticas, incluyendo colagenasas y proteinasas, las cuales parecen estar involucradas en la destrucción de la matriz extracelular, el anclaje a las células y destrucción de los tejidos.

Los trofozoitos de *E. histolytica* producen disentería cuando se unen al epitelio del colon, lisan las células epiteliales e invaden la pared intestinal. Algunas proteínas amibianas que participan en la invasión tisular son:

- 1) cisteína proteinasas, que son capaces de romper las proteínas de la matriz extracelular;
- 2) una lectina de superficie del parásito, que se une a los carbohidratos de la membrana de las células epiteliales del colon y de los eritrocitos,
- 3) proteínas formadoras de canales “amibaporo”, que inducen la formación de canales en la membrana plasmática de las células epiteliales del colon.

I.1.6. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico se logra mediante exámenes de laboratorio de la materia fecal con microscopio óptico. En algunos casos se requiere de exámenes adicionales, tales como imágenes mediante tomografía axial computarizada (TAC), detección del ADN del parásito mediante PCR, o serología con detección de anticuerpos específicos. La afección se trata por prescripción médica de metronidazol, iodoquinol, paramomicina, furoato de diloxanida y tinidazol. Los abscesos hepáticos avanzados pueden requerir de cirugía [5].

La redefinición de *E. histolytica* (patógena) y *E. dispar* (no patógena); además de la reciente aparición en pacientes de *E. moshkovskii*, ha cambiado drásticamente nuestro conocimiento sobre la prevalencia de diferentes especies de *Entamoeba*. Esto ha motivado al desarrollo de pruebas diagnósticas capaces de distinguir y diferenciar las tres especies de *Entamoeba* encontradas en laboratorios clínicos.

El diagnóstico de la amibiasis invasiva se realiza generalmente mediante la combinación de microscopía de especímenes fecales, pruebas serológicas y, cuando es indicado, colonoscopia y biopsias de lesiones amibianas intestinales o drenado de abscesos hepáticos.

Es evidente que el examen microscópico para detectar y diferenciar las 3 especies de *Entamoeba* es poco confiable: además, se ha demostrado que las pruebas serológicas no son fidedignas para el diagnóstico de la infección en áreas endémicas, ya que el nivel sérico de anticuerpos anti-amibianos permanece elevado por muchos años, haciendo imposible distinguir entre infecciones recientes y anteriores.

Por otra parte, las técnicas de PCR y RT-PCR han mostrado tener una mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la amibiasis; sin embargo, en países en vías de desarrollo estas metodologías resultan incosteables, resultando en una gran desventaja para la salud pública de estos países [1].

I.2. Vía de secreción de proteínas en células eucariotas

En células eucariotas, las proteínas que serán transportadas hacia compartimientos intracelulares o exportados hacia el espacio extracelular siguen una vía endomembranosa

constituida por el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y un conjunto de vesículas que participan en la exo y endocitosis [6].

Del retículo endoplásmico al complejo de Golgi, el transporte se lleva a cabo a través de pequeñas vesículas que se forman por gemación. Estas vesículas se mueven a través del citoplasma de manera dirigida, con frecuencia a lo largo de vías formadas por elementos del citoesqueleto, y luego se fusionan con la membrana de un compartimiento diferente, que acepta tanto la carga soluble de la vesícula como su envoltura membranosa [6].

En la vía secretora, los materiales sintetizados son transportados desde el citosol a diferentes destinos como lisosoma, membrana plasmática o espacio extracelular. Esta vía incluye el flujo de lípidos, carbohidratos y proteínas. Las actividades secretoras celulares pueden dividirse en dos tipos: constitutiva y regulada.

En la secreción constitutiva se transportan materiales desde su sitio de síntesis y se descargan en el espacio extracelular de manera continua. Este proceso contribuye a la formación de matriz extracelular y membrana plasmática. En tanto que, en la secreción regulada se almacenan materiales en vesículas secretorias que permanecen en las regiones periféricas y se descargan en respuesta a un estímulo apropiado [6].

I.2.1. Retículo endoplásmico y transporte de proteínas

Existen dos tipos de retículo endoplásmico (RE): rugoso (RER) y liso (REL). La distinción morfológica entre el RER y el REL consiste en la presencia de ribosomas unidos en el primero y ausencia de los mismos en el último. Los ribosomas se encuentran en la superficie que enfrenta al espacio citosólico [6]. La membrana del RE está organizada como una red laberíntica de túbulos ramificados e interconectados, formando una lámina continua encerrando un espacio interno único, denominado el lumen del RE.

La membrana del RE participa en un mecanismo de selección de polipéptidos nacientes, los cuales pueden ser de dos tipos: proteínas transmembranales, las cuales son parcialmente translocadas a través de la membrana y quedan embebidas en ésta; y proteínas solubles, las cuales son translocadas completamente a través de la membrana y son liberadas en el lumen. Algunas de las proteínas funcionan en el RE, pero otras están destinadas a otros compartimientos, la membrana plasmática o el espacio extracelular [7].

I.2.2. Modificaciones post-traduccionales y control de calidad en el RE

Durante su paso por el RE, los polipéptidos pueden sufrir 5 modificaciones bioquímicas antes de alcanzar su destino final: (i) formación de enlaces disulfuro, (ii) plegamiento correcto, (iii) adición y procesamiento de carbohidratos, (iv) cortes proteolíticos específicos, y (v) ensamblaje de proteínas multiméricas. La formación de enlaces disulfuro, el plegamiento correcto y el ensamblaje de proteínas multiméricas ocurren exclusivamente en el RE.

Solamente aquellas proteínas que están correctamente plegadas y ensambladas son transportadas desde el RE hacia el complejo de Golgi. Aquellas proteínas no ensambladas, sin plegar o incorrectamente plegadas, son retenidas en el RE o regresadas desde el *cis*-Golgi hacia el RE. Posteriormente, proteínas mal plegadas y subunidades de proteínas multiméricas a menudo son transportadas del lumen del RE hacia el citosol, donde son degradadas por el sistema de proteasoma [8].

I.3. Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI)

En células eucariotas, la formación de enlaces disulfuro se lleva a cabo en el lumen del RE, éstos solo se forman en las proteínas de secreción y en el dominio exoplásmico de proteínas membranales. Durante la maduración de proteínas, los enlaces disulfuro están involucrados en la estabilización de la estructura terciaria. En el RE de eucariotas y en el periplasma bacteriano, un elaborado sistema que involucra chaperonas y plegamiento catalítico, asegura que los enlaces disulfuros ocurran entre las cisteínas correctas. En eucariotas, la enzima proteína disulfuro isomerasa (PDI) es una oxidoreductasa que cataliza la formación correcta de enlaces disulfuro en polipéptidos nacientes cuando estos pasan a través del RE (Figura 3).

I.3.1. Organización y dominios

La enzima PDI de mamíferos está organizada en 5 dominios: a, b, b', a' y c; los dominios a y a' son homólogos a la proteína bacteriana tiorredoxina (dominios Trx), los cuales contienen un sitio activo caracterizado por 2 cisteínas (CGHC) que ciclan entre

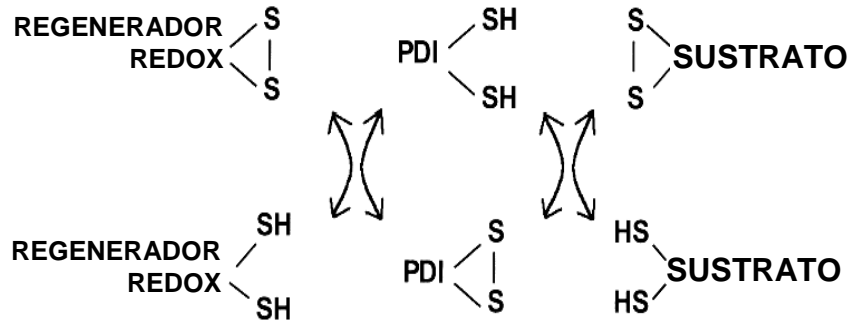


Figura 3. La actividad oxidorreductasa cataliza el intercambio del enlace disulfuro entre PDI y su sustrato. Cuando PDI cataliza la oxidación de dos tioles (presentes en residuos de Cys), ésta se reduce. De igual manera, cuando PDI cataliza la reducción de un enlace disulfuro, ésta se oxida. El estado redox de PDI puede ser regenerado por una enzima (tioredoxina reductasa) o una molécula redox (glutatión).

dos estados oxidativos. Los dominios b y b' adoptan un plegamiento parecido a tioredoxina pero son inactivos [9].

I.3.2. La superfamilia de tioredoxina

PDI como un miembro de la superfamilia de la tioredoxina, se caracteriza por la presencia de uno o más dominios Trx, caracterizados por un sitio activo con el motivo CXXC. Durante la transferencia de equivalentes reductores u oxidantes al sustrato, el sitio activo CXXC cicla entre su estado oxidado (disulfuro) y reducido (ditiol). Existen varios homólogos de PDI en mamíferos, tales como ERp57, ERp72, ERp44 entre otras, pero se estima que la PDI es la que presenta mayor expresión. En *S. cerevisiae*, la secuencia genómica revela otras 4 proteínas con homología a PDI: Eug1p, Mpd1p, Mpd2p, y Eps1p, cada una tiene solo un dominio catalítico con dos cisteínas, ninguna de estas proteínas es esencial y no pueden reemplazar la función de PDI [9].

Escherichia coli también posee homólogos funcionales a PDI, el periplasma bacteriano distingue entre rutas oxidativas y reductivas y, como resultado, las funciones de ditiol/disulfuro oxidasa y reductasa/isomerasa están alojadas en proteínas separadas. DsbA provee actividad ditiol/disulfuro oxidasa, mientras que DsbC/G proveen actividad reductasa o isomerasa. Las proteínas Dsb poseen poca homología con PDI, pero como ésta, poseen dominios que son estructuralmente similares a tioredoxina [15].

I.3.3. PDI como oxidorreductasa

La proteína-disulfuro isomerasa (PDI, EC 5.3.4.1.) es una oxidorreductasa que cataliza las reacciones de oxidación, reducción e isomerización de enlaces disulfuro. En el RE, la PDI cataliza tanto la oxidación como la reducción de disulfuros de los polipéptidos nacientes; mientras que en ambientes reductores (como el citosol, endosomas y la membrana plasmática) PDI cataliza sólo la reducción. La localización subcelular y su función en la biosíntesis de proteínas secretorias e integrales sugiere que PDI juega un papel importante en la vía de secreción de proteínas.

Las proteínas PDI contienen al menos un sitio activo tiorredoxina, caracterizado por la presencia del motivo CXXC. Se ha demostrado que los residuos de cisteína juegan un papel importante en la actividad enzimática: modificaciones bioquímicas de éstas ocasionan inactivación irreversible. Esta metodología ha sido utilizada con éxito para realizar los estudios funcionales de las PDI de humano y levadura [16].

Además, se ha descrito que algunos antibióticos, como bacitracina, y agentes alquilantes, como 5,5'-ditio-bis-(ácido nitrobenzoico), pueden inhibir las actividades enzimáticas de las enzimas PDI [17].

I.3.4. Plegamiento oxidativo

La complejidad del plegamiento de proteínas es a menudo agravado por la baja solubilidad del estado desnaturalizado. En el caso de la lisozima desnaturalizada y reducida, la ineficiencia del replegamiento oxidativo resulta de la presencia de dos rutas cinéticas antagónicas: la agregación proteica que impide el plegamiento y la adquisición de la estructura nativa [11].

PDI es una foldasa residente del RE que cataliza el replegamiento oxidativo de proteínas que contienen disulfuros reducidos. La actividad ditiol/disulfuro oxidasa de PDI se ocupa de formar correctamente enlaces disulfuro en las proteínas sustrato, resultado de la oxidación de dos cisteínas sustrato y la reducción del sitio activo de PDI.

Para proteínas en las cuales la estructura nativa está estabilizada por enlaces disulfuro, el plegamiento correcto de su estructura tridimensional, requiere el acoplamiento de la formación de su estructura terciaria a una oxidación química que

interconecta residuos de cisterna específicos (plegamiento oxidativo) [12]. El plegamiento espontáneo es a menudo lento y puede verse afectado por agregaciones proteicas. En la célula, el plegamiento oxidativo es asistido por enzimas que catalizan la formación de enlaces disulfuro y por chaperonas que inhiben agregaciones hidrofóbicas.

I.4. Proteína Disulfuro Isomerasa de *E. histolytica* (EhPDI)

En células eucariotas, está bien documentado que muchas proteínas secretadas y de membrana plasmática poseen enlaces disulfuro, los cuales son importantes para su estructura y función. En *E. histolytica*, proteínas involucradas en el proceso de adhesión y destrucción de tejidos humanos, como la lectina de unión a galactosa y las proteínas formadoras de poro, contienen enlaces disulfuro que son importantes para su actividad biológica; por tanto, para estos factores de virulencia es importante la oxidación de las cisteínas involucradas en la conformación correcta de su estructura terciaria.

↓

```

1 ATG AAA TTC CTT CTT TTC ACT TTA CTT ACT TTT TTA GTA TCT GCT GAT GTA GTA TCA TTA AAT CCA ACA AAC TTC AAT
1)Met Lys Phe Leu Leu Phe Thr Leu Leu Thr Phe Leu Val Ser Ala Asp Val Val Ser Leu Asn Pro Thr Asn Phe Asn
79 ACT ATT GTT GAT GGA AGT AAA CAT GTT TTT GTT AAG TTT TTT GCT CCA TGG TGT GGA CAT TGC AAA AAA CTT GCT CCA
27)Thr Ile Val Asp Gly Ser Lys His Val Phe Val Lys Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Lys Leu Ala Pro
157 GAA TAT ATT AAA CTT GCT GAT GCT TAC AAA GAT AAA CAA GAC ATT GTA ATT GCT GAA CTT GAT TGT GAC AAT AAA GAC
53)Glu Tyr Ile Lys Leu Ala Asp Ala Tyr Lys Asp Lys Glu Asp Ile Val Ile Ala Glu Leu Asp Cys Asp Asn Lys Asp
235 CAC AAA GAC CTC TGT GGA AAG TTT GGA ATT AGT GGA TTT CCA ACC TTA AAA TTC TTC AGA AAA GGA ACT ACT GAA CCA
79)His Lys Asp Leu Cys Gly Lys Phe Gly Ile Ser Gly Phe Pro Thr Leu Lys Phe Phe Arg Lys Gly Thr Thr Glu Pro
313 ATT GAA TAT GAA GGT GGA AGA ACT GTA GAA GAT CTT TCT CAT TTT ATT CAA GAA AAG ATT CAA CCT AAA GCA CCA TCT
125)Ile Glu Tyr Glu Gly Gly Arg Thr Val Glu Asp Leu Ser His Phe Ile Glu Glu Lys Ile Glu Pro Lys Ala Pro Ser
391 AAT GTT GTT TCA GTA ACA ACT GCT ACA TTT GAT AGT ATT GTA ATG GAC CCA ACT AAA AAT GTC TTT GTT AAA TTC TTT
121)Asn Val Val Ser Val Thr Thr Ala Thr Phe Asp Ser Ile Val Met Asp Pro Thr Lys Asn Val Phe Val Lys Phe Phe
469 GCT CCA TGG TGT GGA CAT TGT AAG GCT CTC GCA CCA AAA TAT ATT GAA GTT AGC AAG ATG TAT GCC GGT GAA GAT GAC
157)Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro Lys Tyr Ile Glu Val Ser Lys Met Tyr Ala Gly Glu Asp Asp
547 CTT GTT GTA GCT GAA GTC GAT TGT ACT GCA AAT CAA GAG ACA TGT AAC AAA TAT GAA GTA CAT GGA TAT CCT ACT TTA
123)Leu Val Val Ala Glu Val Asp Cys Thr Ala Asn Glu Glu Thr Cys Asn Lys Tyr Glu Val His Gly Tyr Pro Thr Leu
625 AAA TCA TTC CCA AAG GGA GAA AAT AAG AAA CCT ATT GCT TAT GAA GGA GGA AGA GAA GTT AAA GAC TTT GTT ACC TAC
205)Lys Ser Phe Pro Lys Gly Glu Asn Lys Lys Pro Ile Ala Tyr Glu Gly Gly Arg Glu Val Lys Asp Phe Val Thr Tyr
703 TTC AAT ACC AAT TAT GGA TAT GAT AGA GAT GAG AAT GGA AAA TTA GGT AAA ACT GCT GGA AGA ATT GCT GAA CTT GAT
235)Phe Asn Thr Asn Tyr Gly Tyr Asp Arg Asp Glu Asn Gly Lys Leu Gly Lys Thr Ala Gly Arg Ile Ala Glu Leu Asp
781 GAC CTT GCT AAA GGA TTT GCT AAT AAA GAA AAT AAA GAT GAA ATT ATA AAA AAA GCT GAG GCA ATT GAA GGA GGA GCT
261)Asp Leu Ala Lys Gly Phe Ala Asn Lys Lys Glu Asn Lys Asp Glu Ile Ile Lys Lys Ala Glu Ala Ile Glu Gly Gly Ala
859 TAT TAC GTT AAA GTC ATG AAA AGA ATT ATT GAG AGA GGA GCA GAT TAT GTA GAA AAA GAA AAG GCT AGA ATC AAT AAA
287)Tyr Tyr Val Lys Val Met Lys Arg Ile Ile Glu Arg Gly Ala Asp Tyr Val Glu Lys Glu Lys Ala Arg Ile Asn Lys
937 ATC TTA GAA AAC CCA TCT ATG AAA GCC AAG AAA ATT GAT GAT TTT ACT AGA AAC TTG AAT GTA CTT GAA GTT TTC TAA
313)Ile Leu Glu Asn Pro Ser Met Lys Ala Lys Lys Ile Asp Asp Phe Thr Arg Asn Leu Asn Val Leu Glu Val Phe ...

```

Figura 4. Secuencias nucleotídica y polipeptídica deducida del gen PDI de *E. histolytica*. Los aminoácidos codificados se muestran en código de tres letras. Con una flecha se señala el punto de corte proteolítico inferido para la enzima peptidasa de señal.

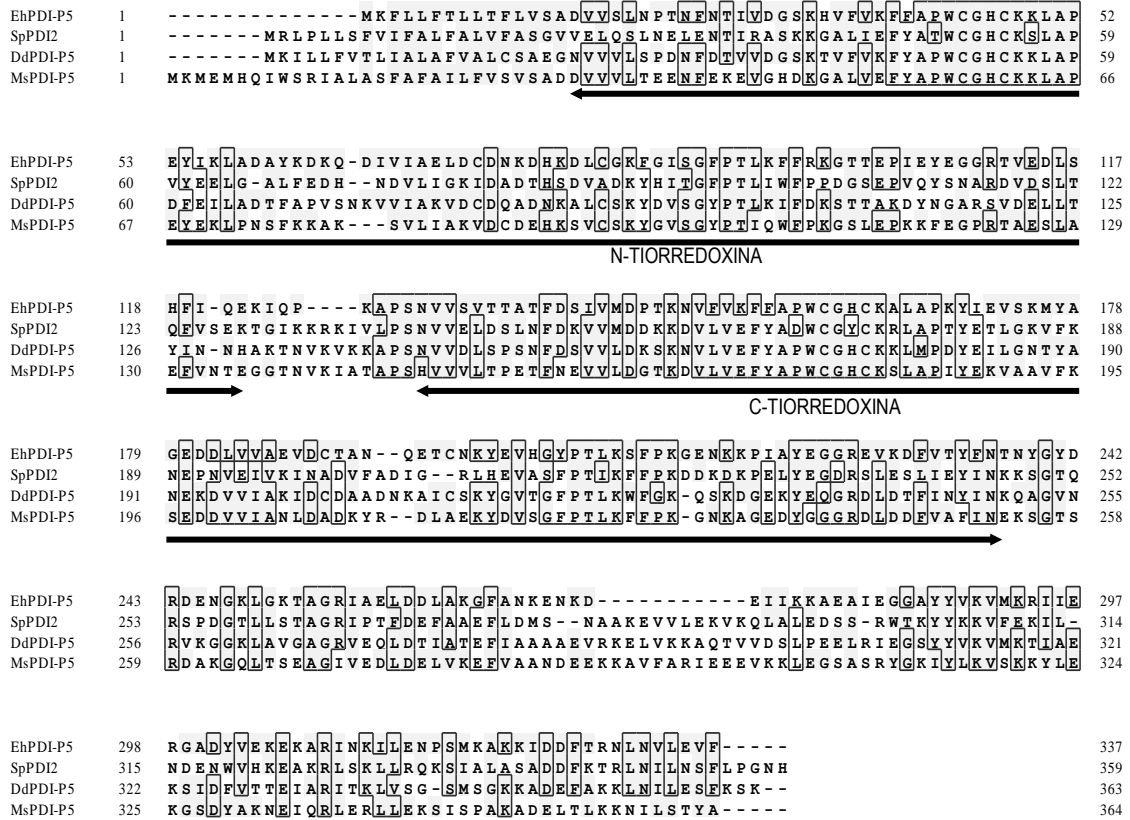


Figura 5. Alineamiento de secuencias polipeptídicas PDI. Los aminoácidos se denotan en el código de una letra. Los aminoácidos idénticos se muestran en cajas y los similares sombreados. Los dominios tioredoxina se indica con una flecha.

Mediante la técnica de amplificación rápida de extremos de DNA complementario o RACE (de las siglas en inglés *Rapid Amplification of cDNA Ends*) se aisló la secuencia de DNA de un gen amibiano que codifica para una proteína con alta homología a proteínas PDI, denominada *EhPDI*. Este gen codifica un polipéptido de 337 aminoácidos, con un peso molecular teórico calculado de 38 kDa. El análisis polipeptídico de la PDI amibiana predice un péptido señal (en el extremo amino terminal) de 15 aminoácidos y dos dominios tioredoxina que presentan el motivo APWCGHCK (Figuras 4 y 5).

La predicción de la estructura tridimensional, basada en la homología de secuencias, muestra que los dominios tioredoxina se pliegan de manera muy similar a sus homólogos mamíferos y bacterianos (datos no publicados). El dominio C-tioredoxina de *EhPDI* ha sido expresado en *E. coli* y utilizado como inmunógeno para

producir anticuerpos policlonales en conejo. Los anticuerpos purificados reconocen una proteína de 35 kDa en un lisado total amibiano [13].

Mediante un ensayo de complementación funcional de la mutante *dsbA* de *E. coli* (equivalente funcional de la actividad disulfuro oxidasa en bacteria), se demostró que *EhPDI* es funcionalmente activa, ya que facilitó la recuperación al 100% de la actividad de la fosfatasa alcalina periplásmica (la cual depende de la actividad disulfuro oxidasa para adquirir su estructura nativa) [14]. Además, un análisis post-genómico reveló que la *EhPDI* es miembro de una superfamilia amibiana de 11 polipéptidos, entre los cuales, algunos exhiben actividad oxidorreductasa predecible [15].

II. JUSTIFICACIÓN

La amibiasis asociada al parásito protozoario intestinal *E. histolytica* continúa siendo un grave problema de salud pública en países subdesarrollados. Las estadísticas indican que la amibiasis ocasiona la muerte de alrededor 40,000 personas anualmente, teniendo como causa principal la infección invasiva, el absceso hepático amibiano y la hemorragia intestinal masiva.

La prevalencia de la amibiasis en países endémicos, es favorecida por el hacinamiento, desnutrición y deficientes hábitos higiénicos, entre otros factores. Además, el tratamiento se complica debido a la falta de recursos e incapacidad para atender a toda la población afectada. Otro aspecto preocupante, son los reportes donde se muestra que el tratamiento con metronidazol puede ser ineficiente y la existencia de diferencias en la sensibilidad a fármacos antiamebianos en cepas de *E. histolytica* aisladas de muestras clínicas. Esta problemática sugiere que el control de la enfermedad podría verse seriamente complicado en un futuro.

Por otra parte, la identificación de factores de virulencia de *E. histolytica*, tales como la lectina de unión a galactosa/N-acetilgalactosamina, las proteínas formadoras de poros y las cisteína proteinasas ha permitido ampliar el conocimiento sobre los mecanismos involucrados en los procesos de infección e invasión extra-intestinal del parásito; sin embargo, la información hasta ahora generada no es suficiente para fines que permitan plantear una solución definitiva a este problema.

Ante este escenario, surge la necesidad de encaminar el tratamiento hacia la búsqueda, generación y creación de fármacos más efectivos; lo cual involucra orientar la investigación hacia la identificación y caracterización de componentes bioquímicos indispensables para la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo del parásito y que además, puedan ser susceptibles de inhibición o inactivación.

El estudio de la enzima PDI cobra importancia dada su amplia distribución y papel multifuncional. En células eucariotas, la PDI es el principal catalizador de enlaces disulfuro en el RE. La formación de enlaces disulfuro es crucial para el plegamiento y

estabilidad de muchas proteínas de secreción; por lo que, la formación lenta o incorrecta de enlaces disulfuro puede llevar a la agregación de proteínas y degradación por proteasas. Su actividad catalítica involucra actividad ditiol/disulfuro oxidasa e isomerasa, pero su participación en el plegamiento correcto de proteínas también exhibe actividad no enzimática, actuando como chaperona para evitar la agregación de sus proteínas blanco y que sean susceptibles de degradación.

Dado que *E. histolytica* cuenta con un sistema de exportación proteica poco desarrollado, en comparación con células eucariotas típicas, el parásito depende en gran medida de su actividad secretora y de las modificaciones bioquímicas que sufren las proteínas en su curso hacia la membrana plasmática o al espacio extracelular; inclusive, el parásito depende de su habilidad para formar enlaces disulfuros correctos en proteínas de exportación, algunas ya identificadas como factores de virulencia. Por tales motivos, estudios sobre efectos de distintos inhibidores sobre la actividad enzimática de PDI amibiana resultan de gran importancia, asumiendo que esta enzima se perfila como potencial blanco farmacológico.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.1. Hipótesis

La enzima proteína disulfuro isomerasa de *E. histolytica* (*EhPDI*) exhibe actividad oxidasa y es posible inhibirla utilizando bacitracina y algunos agentes alquilantes.

III.2. Objetivo General

Evaluar la actividad oxidasa la enzima *EhPDI* mediante un ensayo de replegamiento oxidativo de lisozima desnaturalizada-reducida y determinar el efecto inhibitorio de bacitracina, DTNB y 4-DTDP sobre esta actividad.

III.3. Objetivos Específicos

1. Expresar y purificar la enzima *EhPDI* mediante protocolos estándar de laboratorio.
2. Evaluar la actividad de la enzima *EhPDI* mediante un ensayo de replegamiento oxidativo utilizando la lisozima desnaturalizada-reducida como sustrato.
3. Determinar el efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad oxidasa de la enzima *EhPDI*.
4. Determinar el efecto de bacitracina, 4,4'-ditiopiridina y 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) como inhibidores de la actividad oxidasa de la enzima *EhPDI*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Reactivos

Los reactivos químicos grado BM o BT fueron adquiridos de la compañía Sigma de México. Las enzimas y marcadores de peso molecular fueron obtenidos de la compañía *New England Biolabs*. Los reactivos adquiridos de otras compañías serán indicados en paréntesis.

IV.2 Plásmido, bacterias y medios de cultivo

IV.2.1. pQHPDI, plásmido de expresión de *EhPDI*

El ADN complementario codificante para el polipéptido maduro *EhPDI* fue amplificado mediante PCR a partir del plásmido pBPelB:*EhPDI* y subclonado en el

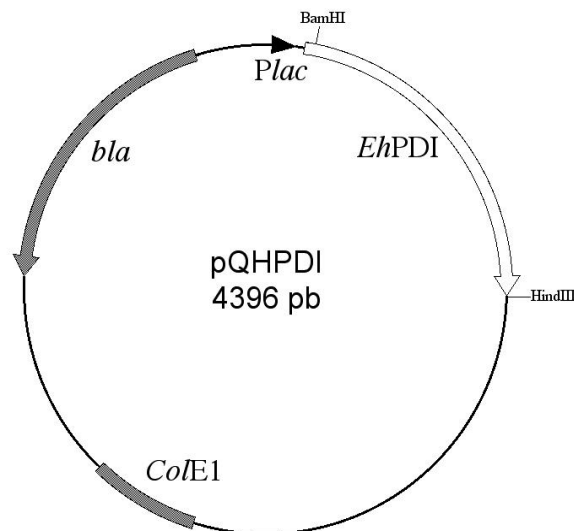


Figura 6. Representación gráfica del plásmido pQHPDI.

vector de expresión bacteriana pQE30 (Qiagen). El plásmido recombinante pQHPDI (Figura 6) permite la expresión soluble de *EhPDI* etiquetada con un hexámero de histidinas en el extremo amino terminal.

IV.2.2. Bacterias y medios de cultivo

La expresión heteróloga de la proteína *EhPDI* fue realizada en cultivos de la bacteria *E. coli* XL1 Blue MRF' (Stratagene). El medio LB fue preparado siguiendo un procedimiento estándar de laboratorio.

IV.3 Expresión y purificación de la enzima *EhPDI*

IV.3.1. Expresión proteica

1. En condiciones estériles, se tomó una colonia de *E. coli* XL1 Blue MRF' que portaba el plásmido pQHPDI y se inoculó en 3 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina (150 µg/mL). El cultivo fue incubado durante la noche a 37 °C y 300 rpm.
2. Al día siguiente, 2.5 mL del cultivo fueron transferidos a 100 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina (150 µg/mL).
3. El cultivo fue incubado durante 2 h a 37 °C y 300 rpm.
4. La expresión proteica fue inducida con IPTG a una concentración final 0.1 mM.
5. El cultivo fue incubado durante 3 h a 37 °C y 300 rpm.
6. El paquete celular fue separado mediante centrifugación durante 10 min a 5,000 rpm y 4 °C. El sobrenadante fue descartado y se conservó el paquete celular en hielo.

IV.3.2. Lisis celular en condiciones desnaturizantes

1. El paquete celular fue resuspendido en 5 mL de amortiguador de lisis (100 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de Tris-HCl; 8 M de urea; 10 mM de imidazol; pH 8.0). La lisis celular fue facilitada mediante agitación en vórtex.

2. La fracción solubilizada fue separada mediante centrifugación durante 10 min a 14,000 rpm y 4 °C.
3. El lisado bacteriano total (soluble y clarificado) fue utilizado para purificar la enzima *EhPDI* mediante cromatografía de afinidad a níquel y exclusión molecular.

IV.3.3. Purificación en condiciones renaturalizantes y reoxidantes

1. Una columna con 0.5 mL de colchón de agarosa-NTA-Ni fue y equilibrarla con 5 volúmenes del amortiguador de lisis.
2. El lisado bacteriano total (LT) fue cargado a la columna y la fracción no pegada fue descartada (NP).
3. La columna fue lavada (adicionalmente) con 5 vol de solución de lisis y el efluente fue descartado.
4. Posteriormente, la columna fue lavada con 10 vol de solución renaturalizante y oxidante (50 mM de NaH₂PO₄; 300 mM de NaCl; 2 mM de GSH; 0.2 mM de GSSG; 10 mM de imidazol; pH 8.0) y el efluente fue descartado (W1).
5. Enseguida, la columna fue lavada con 10 vol de solución de lavado (50 mM de NaH₂PO₄; 300 mM de NaCl; 2 mM de GSH; 0.2 mM de GSSG; 20 mM de imidazol; pH 8.0) y el efluente fue descartado (W2).
6. Finalmente, la proteína fue eluída mediante la adición de 4 a 5 volúmenes de solución de elución (50 mM de NaH₂PO₄; 300 mM de NaCl; 2 mM de GSH; 0.2 mM de GSSG; 250 mM de imidazol; pH 8.0) y las fracciones fueron colectadas en volúmenes de 500 µL (E1-E5).
7. La cromatografía fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Se analizaron muestras de 10 µL de cada una de las fracciones obtenidas (LT, NP, W1, W2, E1-E5).

IV.3.4. Estabilización de la enzima *EhPDI* purificada

1. Una columna de cromatografía de exclusión molecular PD10 (Amersham Biosciencias) fue equilibrada con 25 mL de solución 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0).

2. La solución de proteína *EhPDI* (en un volumen final de 2.5 mL) fue cargada a la columna PD10 y se descartó el efluente.
3. La proteína *EhPDI* fue eluída con 3.5 mL de solución 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0).
4. La concentración final de la solución de *EhPDI* fue determinada mediante espectrofotometría a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar $\epsilon^{0.1\%} = 0.788$ y el peso molecular teórico calculado de 37794 g/mol.

IV.4. Lisozima como sustrato

IV.4.1. Lisozima desnaturalizada y reducida (drLZM)

1. En un microtubo, se mezclaron 10 mg de lisozima (LZM), 0.574 mg de cloruro de guanidinio, 25 μ L de 1 M Tris-HCl (pH 8.6) y 100 μ L de 1 M DTT en un volumen final de 1 mL (se utilizó agua destilada estéril como diluyente). Las concentraciones finales fueron 10 mg/mL de LZM, 6 M de cloruro de guanidinio, 100 mM de DTT y 25 mM de Tris-HCl (pH 8.6).
2. La reacción de desnaturalización y reducción fue llevada a cabo durante 2 h a 37 °C.
3. La concentración de LZM desnaturalizada y reducida fue determinada mediante espectrofotometría a 280 nm, utilizando $\epsilon^{0.1\%} = 2.37$.

IV.4.2. Lisozima nativa (nLZM)

1. En un microtubo, se disolvieron 4 mg de LZM en 2 mL de agua destilada estéril.
2. La concentración de LZM nativa fue determinada mediante espectrofotometría a 280 nm, utilizando $\epsilon^{0.1\%} = 2.63$.

IV.4.3. Actividad lítica de lisozima

1. Se preparó una suspensión celular de *M. lysodeikticus* en amortiguador 0.1 M KH_2PO_4 (pH 6.2) a una concentración final de 0.15 mg/mL.

2. En una microplaca de titulación, se mezclaron 200 μL de la suspensión celular y 20 μL de la muestra de lisozima (nativa o recuperada).
3. La actividad lítica fue evaluada mediante espectrofotometría a 450 nm. La suspensión pierde turbidez dependiente de la cantidad de enzima activa. La velocidad la actividad lítica fue medida en estado estacionario (10 min iniciales).
4. Las unidades de actividad lítica fueron representadas como el cambio de 0.001 de A_{450} por min.

IV.5. Replegamiento oxidativo asistido por *EhPDI*

1. Inmediatamente antes de iniciar el ensayo, la drLZM fue diluída a 400 μM , utilizando 0.1 M de ácido acético como diluyente.
2. La nLZM fue preparada a una concentración final de 20 μM , utilizando agua destilada estéril como diluyente.
3. El amortiguador de replegamiento 5X fue preparado considerando las concentraciones siguientes: 500 mM HEPES (pH 7.0), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA y 25 mM MgCl_2 .
4. La mezcla redox (20X) fue preparada conteniendo 40 mM de glutatión reducido (GSH) y 8 mM de glutatión oxidado (GSSG).
5. Se prepararon varias mezclas de reacción para analizar la actividad de replegamiento oxidativo a diferentes concentraciones de *EhPDI* (0, 5, 10 y 20 μM). La siguiente tabla muestra los volúmenes (μL) de una corrida típica:

	Concentración de <i>EhPDI</i> (μM)		
	5	10	20
5X Amortiguador de replegamiento	40	40	40
drLZM 400 μM	15	15	15
<i>EhPDI</i> 32.9 μM	30.5	61	122
Agua destilada estéril	104.5	74	13
Redox	10	10	10

6. Simultáneamente, se prepararon mezclas control (carentes de *EhPDI*) que contenían 1 μM nLZM y 5 μM de drLZM
7. La mezcla redox (glutaciones) fue la última que se agregó a la reacción.

8. Las concentraciones finales en cada mezcla fueron: 100 mM HEPES (pH 7.0), 10 mM NaCl, 1 mM EDTA 2.5 mM MgCl₂, 30 μM drLZM, 2 mM GSH y 0.4 mM GSSG.
9. Una vez mezclados todos los componentes, las mezclas de reacción fueron incubadas a 37 °C.
10. La cinética de replegamiento oxidativo fue monitoreada durante 1 h, tomando una alícuota de 10 μL cada 10 min.
11. Inmediatamente, las alícuotas fueron mezcladas con 10 μL de ácido acético 0.1 N para detener la reacción.
12. Cabe mencionar que los ensayos fueron realizados por triplicado. Además, se emplearon dos preparaciones de *EhPDI* (32.9 y 43.65 μM); por lo tanto, los volúmenes fueron ajustados de acuerdo a la preparación de enzima utilizada.
13. La cantidad de lisozima recuperada fue determinada mediante un ensayo estándar para la evaluación de la actividad lítica sobre membranas bacterianas (Protocolo IV.4.2.).

IV.6. Efecto de la concentración del sustrato en el replegamiento oxidativo asistido por *EhPDI*

1. Inmediatamente antes de iniciar el ensayo, la drLZM fue diluida a 400 μM, utilizando 0.1 M de ácido acético como diluyente.
2. La nLZM fue preparada a una concentración final de 20 mM, utilizando agua destilada estéril como diluyente.
3. El amortiguador de replegamiento 5X fue preparado considerando las concentraciones siguientes: 500 mM HEPES (pH 7.0), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA y 25 mM MgCl₂.
4. La mezcla redox (20X) fue preparada conteniendo 40 mM de glutatión reducido (GSH) y 8 mM de glutatión oxidado (GSSG).

5. Se prepararon varias mezclas de reacción para analizar la actividad de replegamiento oxidativo a diferentes concentraciones de drLZM (5, 10, 15, 20, 25 y 30 μM). La siguiente tabla muestra los volúmenes (μL) de una corrida típica:

	Concentración de drLZM (μM)					
	5	10	15	20	25	30
5X Amortiguador de replegamiento	40	40	40	40	40	40
<i>EhPDI</i> 32.9 μM	61	61	61	61	61	61
drLZM 400 μM	2.5	5	7.5	10	12.5	15
Agua destilada estéril	86.5	84	81.5	79	76.5	74
Redox	10	10	10	10	10	10

6. Simultáneamente, se prepararon mezclas control (carentes de *EhPDI*) que contenían 1 μM nLZM y 5 μM de drLZM
7. La mezcla redox (glutaciones) fue la última que se agregó a la reacción.
8. Las concentraciones finales en cada mezcla fueron: 100 mM HEPES (pH 7.0), 10 mM NaCl, 1 mM EDTA 2.5 mM MgCl_2 , 10 μM *EhPDI*, 2 mM GSH y 0.4 mM GSSG.
9. Una vez mezclados todos los componentes, las mezclas de reacción fueron colocadas a 37 °C.
10. La cinética de replegamiento oxidativo fue monitoreada durante 1 h, tomando una alícuota de 10 μL cada 10 min.
11. Inmediatamente, las alícuotas fueron mezcladas con 10 μL de ácido acético 0.1 N para detener la reacción.
12. Cabe mencionar que los ensayos fueron realizados por triplicado.
13. La cantidad de lisozima recuperada fue determinada mediante un ensayo estándar de evaluación la actividad lítica sobre membranas bacterianas (Protocolo IV.4.2.).

IV.7. Inhibición del replegamiento oxidativo asistido por *EhPDI*

IV.7.1. Inhibición por bacitracina

1. Inicialmente, la enzima *EhPDI* (20 μM) fue mezclada con diferentes concentraciones de bacitracina. La siguiente tabla muestra los volúmenes (μL) en una corrida típica:

	Concentración de Bacitracina (μM)							
	811	676	540	405	270	135	67	0
Agua destilada estéril	42.2	44.2	46.2	48.2	50.2	52.2	53.2	54.2
43.65 μM <i>EhpDI</i>	45.8	45.8	45.8	45.8	45.8	45.8	45.8	45.8
6.76 mM Bacitracina	12	10	8	6	4	2	1	0

2. La inhibición se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 30 min.
3. La actividad oxidasa de la *EhpDI* fue evaluada siguiendo el Protocolo IV.5.
4. Brevemente, las reacciones de inhibición fueron mezcladas con 40 μL de agua destilada estéril, 40 μL de 5X amortiguador de replegamiento, 10 μL de 400 μM de drLZM y 10 μL de la mezcla redox (iniciador). Inmediatamente, se colectaron alícuotas durante 1 h (10 μL cada 10 min). La actividad lítica recuperada dependiente de la actividad oxidasa remanente fue determinada mediante el Protocolo IV.4.2.
5. Los ensayos de inhibición fueron realizados por triplicado.

IV.7.2. Inhibición por 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB, reactivo de Ellman)

1. Inicialmente, la enzima *EhpDI* (20 μM) fue mezclada con diferentes concentraciones de DTNB. La siguiente tabla muestra los volúmenes (μL) en una corrida típica:

	Concentración de DTNB (μM)							
	1310	1123	936	748	561	374	187	0
Agua destilada estéril	57	60	63	66	69	72	75	78
91.33 μM <i>EhpDI</i>	22	22	22	22	22	22	22	22
6.24 mM DTNB	21	18	15	12	9	6	3	0

2. La inhibición se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 30 min.
3. La actividad oxidasa de la *EhpDI* fue evaluada siguiendo el Protocolo IV.5.
4. Brevemente, las reacciones de inhibición fueron mezcladas con 40 μL de agua destilada estéril, 40 μL de 5X amortiguador de replegamiento, 10 μL de 400 μM de drLZM y 10 μL de la mezcla redox (iniciador). Inmediatamente, se colectaron alícuotas durante 1 h (10 μL cada 10 min). La actividad lítica recuperada

dependiente de la actividad oxidasa remanente fue determinada mediante el Protocolo IV.4.2.

5. Los ensayos de inhibición fueron realizados por triplicado.

IV.7.3. Inhibición por 4,4'-ditio-dipiridina (4-DTDP, Aldrithiol™-4)

1. Inicialmente, la enzima *EhPDI* (20 μ M) fue mezclada con diferentes concentraciones de 4-DTDP. La siguiente tabla muestra los volúmenes (μ L) en una corrida típica:

	Concentración de 4-DTDP (μ M)							
	1526	763	610	457	305	152	76	0
Agua destilada estéril	58	68	70	72	74	76	77	78
91.33 μ M <i>EhPDI</i>	22	22	22	22	22	22	22	22
7.63 mM 4-DTDP	20	10	8	6	4	2	1	0

2. La inhibición se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 30 min.
3. La actividad oxidasa de la *EhPDI* fue evaluada siguiendo el Protocolo IV.5.
4. Brevemente, las reacciones de inhibición fueron mezcladas con 40 μ L de agua destilada estéril, 40 μ L de 5X amortiguador de replegamiento, 10 μ L de 400 μ M de drLZM y 10 μ L de la mezcla redox (iniciador). Inmediatamente, se colectaron alícuotas durante 1 h (10 μ L cada 10 min). La actividad lítica recuperada dependiente de la actividad oxidasa remanente fue determinada mediante el Protocolo IV.4.2.
5. Los ensayos de inhibición fueron realizados por triplicado.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

V.1. Expresión y purificación de *EhPDI*

La enzima *EhPDI* recombinante fue expresada en *Escherichia coli* y exitosamente purificada mediante cromatografía de afinidad a níquel. Posteriormente, la *EhPDI* recombinante fue estabilizada en una solución 20 mM Tris-HCl (pH 8.0).

Durante el desarrollo de este proyecto, varios lotes de *EhPDI* fueron obtenidos a partir de cultivos de 100 mL. Brevemente, las células fueron cosechadas mediante centrifugación, la pastilla celular fue lisada en condiciones desnaturalizantes y la proteína *EhPDI* fue pegada a la columna de agarosa-NTA-níquel. Para favorecer el plegamiento en columna, ésta fue lavada con un amortiguador de condiciones renaturalizantes y oxidantes. Posteriormente, *EhPDI* fue separada de la columna de agarosa-NAT-Ni mediante competencia con imidazol.

La purificación de *EhPDI* fue monitoreada mediante la recolección de muestras de cada fracción y análisis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Como se observa en la Figura 7, fue posible obtener la enzima *EhPDI* con un grado de pureza mayor al 95% (estimado visualmente). Sin embargo, para eliminar los componentes del amortiguador de elusión y estabilizar la proteína, se realizó un intercambio de amortiguadores mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna PD10. Mediante este procedimiento fue posible obtener soluciones de la enzima *EhPDI* a concentraciones entre 30 y 100 μ M.

V.2. La actividad de la lisozima depende de un correcto estado oxidativo

La lisozima de clara de huevo de gallina contiene 4 enlaces disulfuro que son importantes para su actividad lítica. Está bien documentado que los enlaces disulfuro juegan un papel importante en la función de lisozima, ya que cuando están reducidos, su

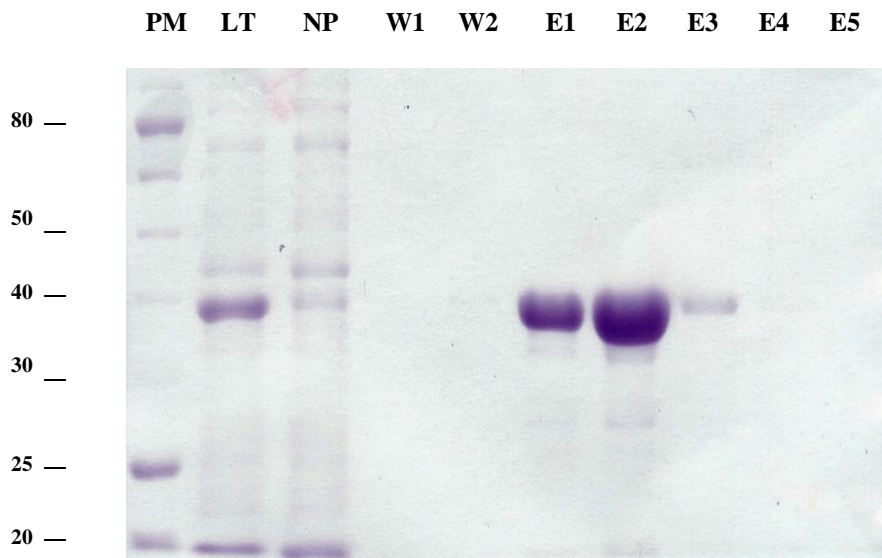


Figura 7. Purificación de *EhpDI* mediante cromatografía de afinidad a níquel. Separación de las fracciones proteicas en 12% SDS-PAGE. PM, marcador de peso molecular (KDa); LT, proteínas totales; NP, fracción no pegada; W1, lavado 1 (10 mM IMZ); W2, lavado 2 (20 mM IMZ); E1 – E5, elusión 1 – 5 (250 mM IMZ).

actividad lítica es nula; por tal motivo, ha sido utilizada como modelo de sustrato para oxidorreductasas con actividad oxidasa.

La lisozima, en su forma desnaturalizada y reducida (drLZM), fue preparada utilizando cloruro de guanidinio (como agente desnaturalizante) y ditioneitol (como agente reductor). La ausencia de actividad lítica fue determinada mediante un ensayo estándar de lisis de membranas bacterianas (Figura 8).

V.3. La enzima *EhpDI* exhibe actividad oxidasa

Para determinar la actividad oxidasa de *EhpDI*, inicialmente se realizó una cinética de replegamiento oxidativo de lisozima desnaturalizada y reducida (30 μM) a diferentes concentraciones de *EhpDI* (5, 10 y 20 μM). El ensayo fue realizado en dos etapas: (1) una cinética de replegamiento oxidativo, en la cual *EhpDI* actúa sobre drLZM

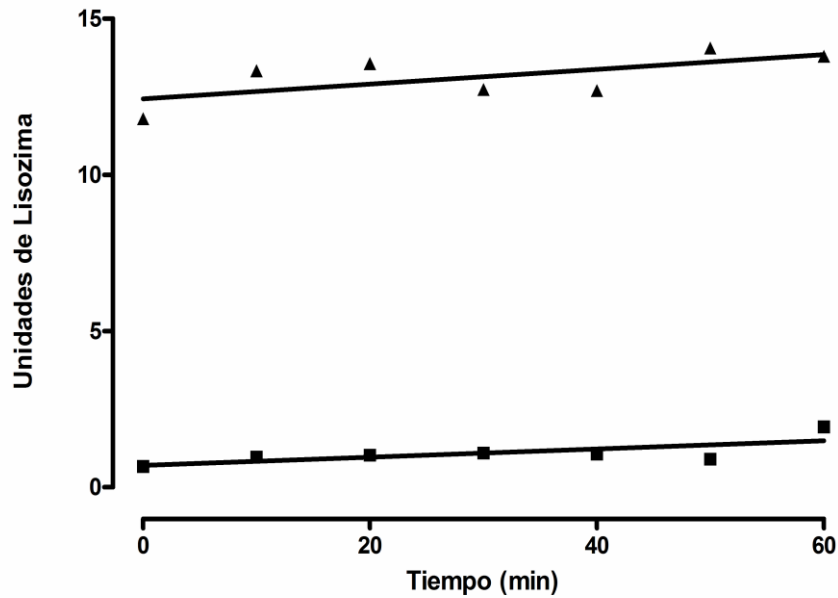


Figura 8. Análisis de la actividad lítica de lisozima desnaturalizada y reducida. Unidades de lisozima presentes de una mezcla de reacción conteniendo (▲) 1 μM nLZM y (■) 5 μM drLZM en ausencia de *EhPDI*. Las unidades de lisozima corresponden al cambio de 0.001 en la A_{450} por min.

convirtiéndola en enzima activa. Esta cinética fue monitoreada durante 60 minutos; y (2) un análisis de la actividad lítica recuperada.

En la Figura 9 (Tabla 1) se puede observar que la enzima *EhPDI* exhibe actividad oxidasa (5, 10 y 20 μM). Cabe mencionar que, en las condiciones de reacción, no se observó replegamiento oxidativo mediado por la mezcla GSH/GSSG (en ausencia de la

Tabla 1. Unidades de lisozima recuperadas mediante replegamiento oxidativo asistido por *EhPDI*, a diferentes concentraciones de oxidoreductasa. Las unidades de lisozima corresponden al cambio de 0.001 en la A_{450} por min. La media y la desviación estándar corresponden a tres experimentos independientes.

Tiempo (min)	<i>EhPDI</i> (μM)		
	5	10	20
0	0	0	0
10	3.50 (0.56)	4.17 (0.93)	5.17 (0.81)
20	5.77 (0.83)	6.93 (1.21)	8.33 (1.80)
30	7.30 (0.72)	8.73 (1.79)	9.50 (1.95)
40	8.57 (1.17)	9.90 (1.93)	10.37 (2.14)
50	9.30 (1.39)	10.43 (1.89)	11.40 (2.72)
60	10.03 (1.64)	11.07 (2.21)	11.63 (2.22)

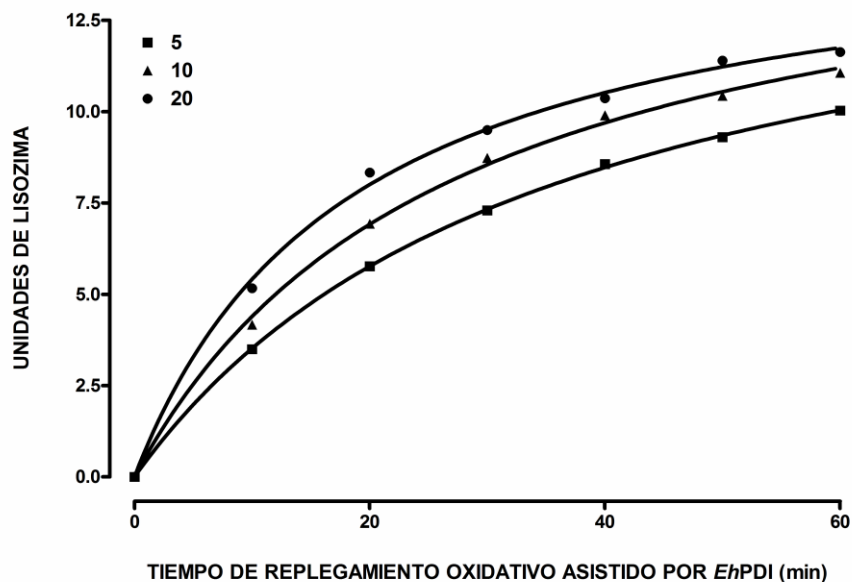


Figura 9. Cinética de replegamiento oxidativo de drLZM asistido por diferentes concentraciones de *EhPDI*. Los símbolos y concentraciones μM de *EhPDI* se indican en la parte superior izquierda. Las unidades de lisozima corresponden al cambio de 0.001 en la A_{450} por min.

enzima *EhPDI*). Además, se puede observar que la velocidad inicial es dependiente de la concentración de *EhPDI*.

V.4. La actividad oxidasa de *EhPDI* depende de la concentración de lisozima

La dependencia de la actividad oxidasa a la concentración de sustrato se realizó mediante ensayos de replegamiento oxidativo asistido por *EhPDI* ($10 \mu\text{M}$) a diferentes concentraciones de lisozima ($5, 10, 15, 20, 25$ y $30 \mu\text{M}$).

En la Figura 10 (Tabla 2) se puede observar que la velocidad enzimática de *EhPDI* es dependiente de la concentración de sustrato (*e.g.* lisozima). Además, se puede predecir que la actividad oxidasa es saturable a altas concentraciones del sustrato.

Tabla 2. Unidades de lisozima recuperadas mediante replegamiento oxidativo asistido por *EhPDI*, a diferentes concentraciones de sustrato. Las unidades de lisozima corresponden al cambio de 0.001 en la A_{450} por min. La media y la desviación estándar corresponden a tres experimentos independientes.

Tiempo (min)	drLZM (μM)					
	5	10	15	20	25	30
0	0	0	0	0	0	0
10	1.15 (0.49)	1.80 (0.30)	2.43 (0.50)	2.67 (1.14)	3.60 (1.04)	4.23 (1.70)
20	2.40 (0.46)	3.63 (0.70)	5.50 (0.61)	5.93 (0.64)	7.45 (0.35)	8.13 (0.51)
30	2.90 (0.50)	3.97 (0.84)	6.17 (0.90)	7.95 (1.77)	8.03 (3.05)	10.85 (2.33)
40	3.13 (0.96)	5.50 (1.30)	7.93 (1.42)	9.63 (3.20)	10.43 (1.55)	12.20 (2.61)
50	3.40 (1.28)	5.93 (0.90)	8.43 (1.40)	10.00 (1.85)	11.70 (1.56)	13.90 (2.26)
60	3.23 (0.95)	5.10 (1.21)	8.30 (2.54)	9.90 (2.40)	12.10 (2.26)	16.13 (3.91)

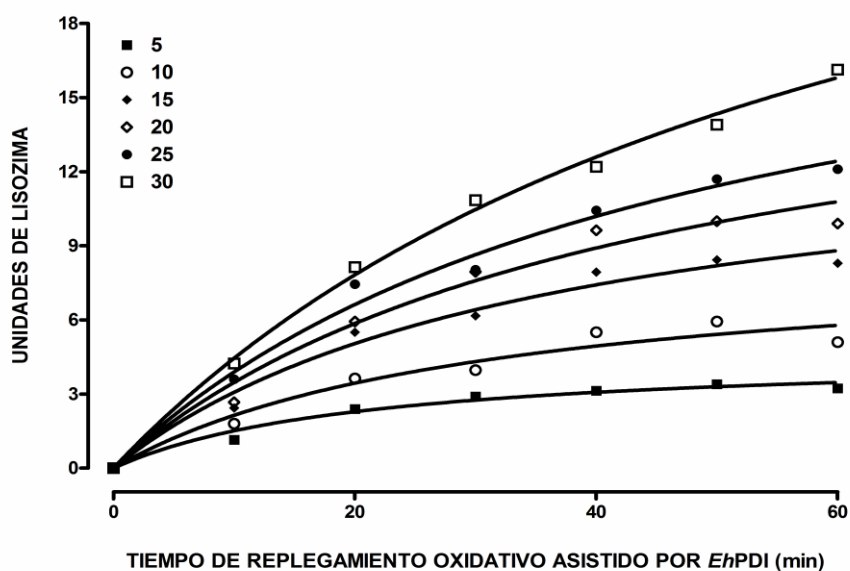


Figura 10. Cinética de replegamiento oxidativo asistido por *EhPDI* a diferentes concentraciones de drLZM. Los símbolos y concentraciones μM de drLZM se indican en la parte superior izquierda. Las unidades de lisozima corresponden al cambio de 0.001 en la A_{450} por min.

V.5. El antibiótico bacitracina inhibe la actividad oxidasa de *EhPDI*

Bacitracina es un antibiótico polipeptídico conocido como inhibidor de enzimas PDI. Para establecer la susceptibilidad de la enzima *EhPDI* a bacitracina, se realizaron ensayos de inhibición a diferentes concentraciones del inhibidor. La enzima *EhPDI* fue pre-incubada con bacitracina durante 30 min. Posteriormente, se evaluó la actividad

oxidasa remanente. Como se puede observar en la Figura 11 (Tabla 3), la actividad oxidasa de *EhPDI* se inhibe al 100 % a una concentración de 405 μM o mayor de bacitracina.

Tabla 3. Unidades de lisozima recuperadas mediante replegamiento oxidativo asistido por *EhPDI*, inhibida por diferentes concentraciones de bacitracina. Las unidades de lisozima corresponden al cambio de 0.001 en la A_{450} por min. La media y la desviación estándar corresponden a tres experimentos independientes.

Tiempo (min)	Bacitracina (mM)							
	0.811	0.676	0.540	0.405	0.270	0.135	0.060	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0.17 (0.23)	0.07 (0.21)	-0.03 (0.15)	-0.03 (0.23)	0.13 (0.64)	1.27 (0.25)	2.00 (0.71)	2.60 (0.61)
20	0.10 (0.26)	0.23 (0.23)	0.07 (0.12)	0.13 (0.06)	0.73 (0.25)	2.97 (0.35)	4.05 (0.35)	4.83 (0.23)
30	0.03 (0.15)	0.50 (0.14)	0.07 (0.12)	0.17 (0.25)	1.13 (0.59)	4.30 (0.52)	5.65 (0.78)	5.97 (1.70)
40	0.00 (0.36)	0.17 (0.31)	0.00 (0.14)	0.23 (0.32)	0.63 (0.29)	4.70 (0.62)	6.80 (1.13)	7.43 (0.90)
50	0.13 (0.06)	0.17 (0.21)	0.10 (0.10)	0.27 (0.31)	1.13 (0.70)	5.03 (0.25)	7.45 (0.64)	8.20 (1.41)
60	0.43 (0.65)	0.43 (0.45)	0.07 (0.15)	0.40 (0.35)	0.93 (0.47)	5.87 (0.15)	9.10 (0.28)	8.15 (0.92)

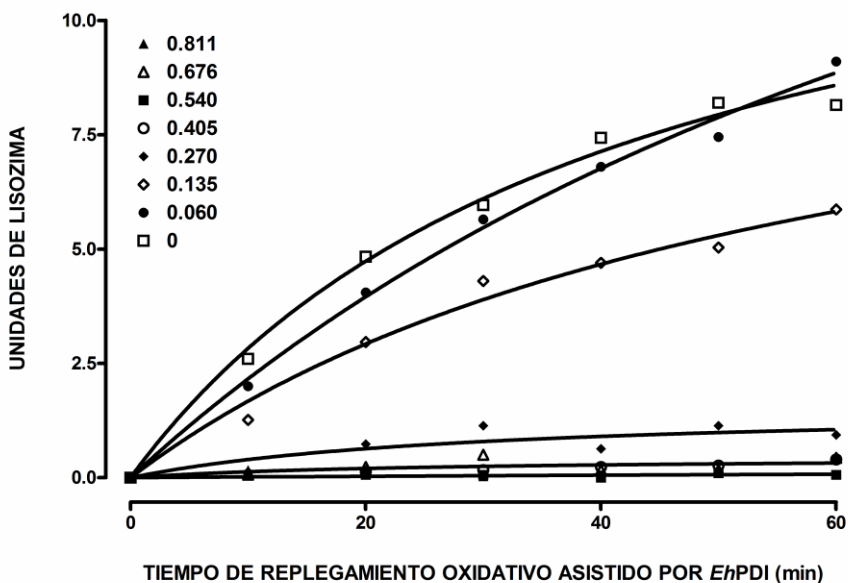


Figura 11. Cinética de replegamiento oxidativo de drLZM asistido por *EhPDI* inhibida a diferentes concentraciones de bacitracina. Los símbolos y concentraciones mM de inhibidor se indican en la parte superior izquierda. Las unidades de lisozima corresponden al cambio de 0.001 en la A_{450} por min.

V.6. El reactivo de Ellman inhibe la actividad oxidasa de *EhPDI*

El agente alquilante de tioles DTNB [5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico), o reactivo de Ellman] es un inhibidor ampliamente utilizado para bloquear el sitio activo de enzimas PDI. A partir de una solución concentrada de DTNB, se realizaron diferentes mezclas de inhibición de la enzima *EhPDI*.

La inhibición fue realizada a temperatura ambiente durante 30 min y, posteriormente, se evaluó la actividad oxidasa remanente.

Como se puede observar en la Figura 12 (Tabla 4), el reactivo de Ellman no inhibe al 100 % la actividad oxidasa de *EhPDI*, ya que se observa actividad remanente a una alta concentración del inhibidor (1.31 mM).

La observación anterior sugiere que la modificación química que sufre el sitio activo puede ser reversible, ya que una de las cisteínas del motivo redox (CXXC) es capaz de actuar como nucleófilo y romper el enlace ditiol formado con el agente alquilante.

Tabla 4. Unidades de lisozima recuperadas mediante replegamiento oxidativo asistido por *EhPDI*, inhibida por diferentes concentraciones de DTNB. Las unidades de lisozima corresponden al cambio de 0.001 en la A_{450} por min. La media y la desviación estándar corresponden a tres experimentos independientes.

Tiempo (min)	DTNB (mM)						
	1.31	0.624	0.499	0.374	0.124	0.062	0
0	0	0	0	0	0	0	0
10	-0.43 (1.19)	1.10 (0.95)	1.90 (0.36)	2.35 (0.35)	2.43 (0.40)	2.77 (0.47)	3.03 (0.67)
20	1.20 (0.17)	2.97 (1.01)	3.40 (1.04)	4.00 (0.71)	4.63 (0.40)	4.70 (0.28)	5.07 (0.47)
30	1.63 (0.40)	3.27 (1.22)	4.70 (0.36)	4.77 (0.64)	6.10 (1.56)	5.77 (0.12)	7.00 (0.36)
40	2.27 (0.40)	4.10 (0.57)	5.50 (0.52)	5.87 (0.75)	7.20 (0.79)	6.60 (0.00)	8.00 (0.85)
50	2.53 (0.06)	5.25 (0.21)	6.60 (0.46)	6.30 (0.85)	7.37 (0.72)	7.35 (0.35)	8.55 (0.64)
60	3.57 (0.45)	6.20 (0.87)	6.55 (0.21)	7.17 (0.81)	7.80 (0.71)	8.17 (0.70)	9.17 (0.85)

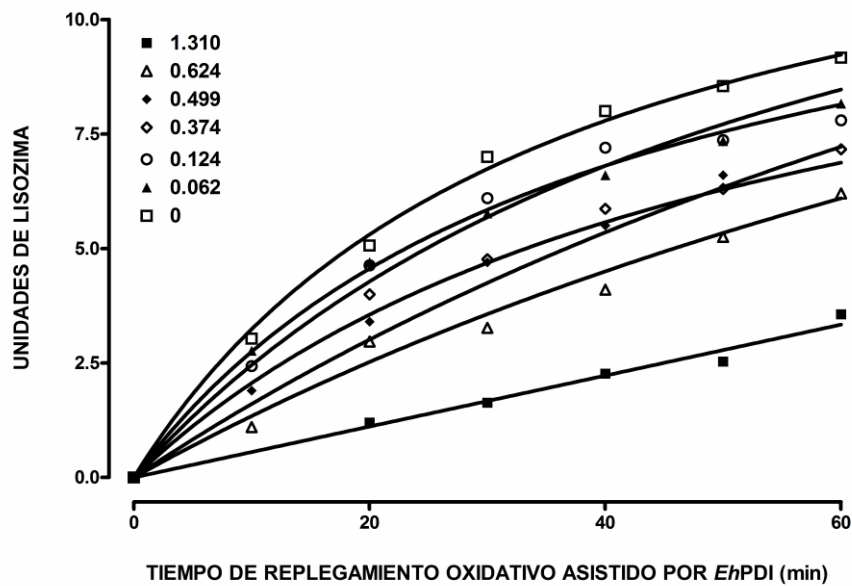


Figura 12. Cinética de replegamiento oxidativo de drLZM asistido por *EhPDI* inhibida a diferentes concentraciones de reactivo de Ellman. Los símbolos y concentraciones mM de inhibidor se indican en la parte superior izquierda. Las unidades de lisozima corresponden al cambio de 0.001 en la A_{450} por min.

V.7. El reactivo *Aldrithiol*TM-4 inhibe la actividad oxidasa de *EhPDI*

Por razones similares a DTNB, el agente alquilante de tioles *Aldrithiol*TM-4 (4,4'-ditio-dipiridina, 4-DTDP) es un inhibidor utilizado para bloquear el sitio activo de enzimas PDI. A partir de una solución concentrada de reactivo de 4-DTDP, se realizaron diferentes mezclas de inhibición de la enzima *EhPDI*.

La inhibición fue realizada a temperatura ambiente durante 30 min y, posteriormente, se evaluó la actividad oxidasa remanente.

Como se puede observar en la Figura 13 (Tabla 5), 4-DTDP no inhibe al 100 % la actividad oxidasa de *EhPDI*, ya que se observa actividad remanente a una alta concentración del inhibidor (1.52 mM).

Tabla 5. Unidades de lisozima recuperadas mediante replegamiento oxidativo asistido por *EhPDI*, inhibida por diferentes concentraciones de *Aldrithiol*TM-4. Las unidades de lisozima corresponden al cambio de 0.001 en la A_{450} por min. La media y la desviación estándar corresponden a tres experimentos independientes.

Tiempo (min)	Aldrithiol TM -4 (mM)					
	0	0.076	0.305	0.457	0.61	1.52
0	0	0	0	0	0	0
10	2.80 (0.40)	2.50 (0.38)	2.10 (0.47)	2.13 (0.45)	1.97 (0.47)	1.30 (0.40)
20	4.77 (0.62)	4.20 (0.35)	4.00 (0.81)	3.63 (0.43)	3.20 (0.10)	2.30 (0.31)
30	6.23 (0.69)	5.63 (0.39)	5.17 (0.86)	4.47 (0.70)	3.83 (0.30)	2.57 (0.63)
40	7.33 (0.98)	6.23 (0.38)	5.93 (0.71)	5.60 (0.46)	4.93 (0.46)	2.90 (0.50)
50	7.43 (1.13)	6.43 (0.15)	6.80 (0.91)	6.43 (0.38)	5.40 (0.23)	3.17 (0.79)
60	8.33 (0.85)	6.77 (0.83)	7.20 (1.01)	6.97 (1.07)	6.10 (0.57)	4.17 (0.58)

Esto sugiere que la modificación química que sufre el sitio activo puede ser reversible, ya que una de las cisteínas del motivo redox (CXXC) es capaz de actuar como

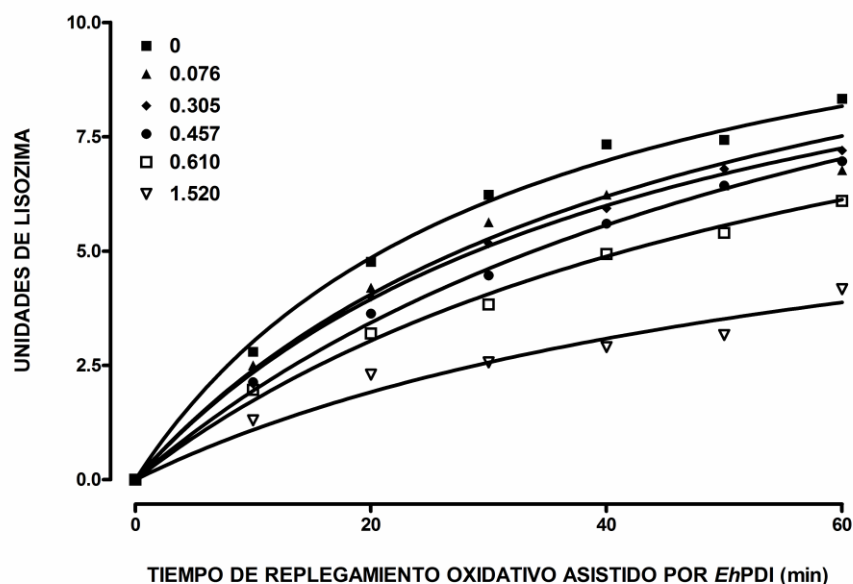


Figura 13. Cinética de replegamiento oxidativo de drLZM asistido por *EhPDI* inhibida a diferentes concentraciones de *Aldrithiol*TM-4. Los símbolos y concentraciones mM de inhibidor se indican en la parte superior izquierda. Las unidades de lisozima corresponden al cambio de 0.001 en la A_{450} por min.

nucleófilo y romper el enlace ditiol formado con el agente alquilante. Además, comparado con el reactivo de Ellman, 4-DTDP es menos eficiente como inhibidor.

V.8. Los inhibidores de la actividad oxidasa de *EhpDI* exhiben diferentes CI_{50}

Como se puede observar en la Figura 14, los tres inhibidores exhiben un perfil de inhibición diferente. Bacitracina, es el mejor inhibidor ya que logra inactivar al 100 % la actividad oxidasa de *EhpDI*. Además, es el que exhibe la menor CI_{50} (172 μ M, Tabla 6).

Por otro lado, los agentes alquilantes exhiben un perfil de inhibición reversible (como ya se mencionó anteriormente). Además, en las condiciones utilizadas, no alcanzan una inhibición superior al 80 %. Finalmente, de los tres inhibidores utilizados para estudiar la actividad oxidasa de *EhpDI*, 4-DTDP es el reactivo que exhibe la menor eficiencia.

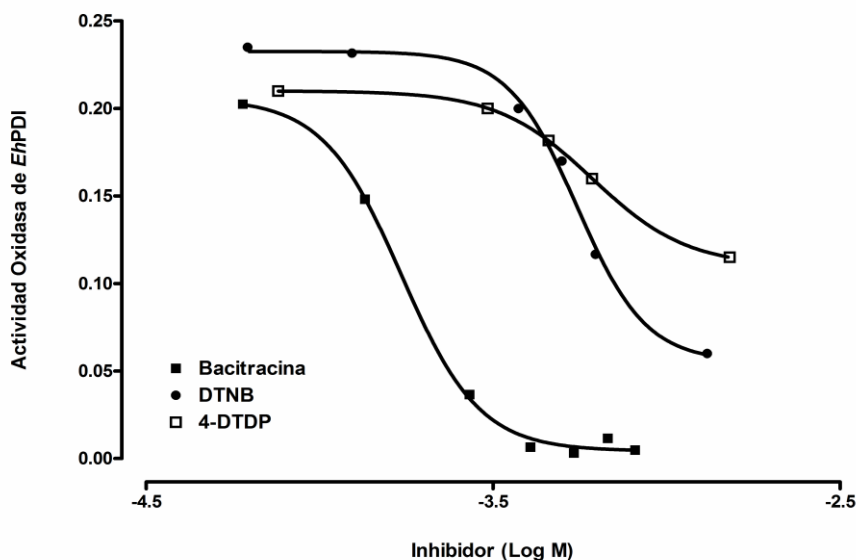


Figura 14. Efecto de inhibidores sobre la actividad oxidasa de *EhpDI*. Los símbolos e inhibidor se indican en la parte inferior izquierda. Las unidades de actividad oxidasa corresponden al cambio en las unidades de lisozima recuperada por min de replegamiento oxidativo asistido por *EhpDI* (en el estado estacionario de la actividad enzimática).

Tabla 6. Efecto de inhibidores sobre la actividad oxidasa de *EhpDI*. El valor μM de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) y el intervalo de confianza al 95 % se muestra para cada inhibidor.

	CI_{50}	IC 95 %
Bacitracina	172.0	152.3 - 194.2
DTNB	552.1	466.2 - 653.9
<i>Aldrithiol</i>TM-4	611.3	580.2 - 644.2

VI. CONCLUSIONES

1) Mediante el plásmido de expresión citosólica pQHPDI, que contiene la región codificante del péptido maduro para la PDI amibiana etiquetada con hexámero de histidinas en el extremo amino-terminal, fue posible expresar la proteína recombinante a partir de extractos bacterianos, seguida de dos procesos de purificación: afinidad a metales (Ni) y exclusión molecular (PD-10). Los rendimientos obtenidos (mayor a 95 %) señalan que los procedimientos aplicados fueron los adecuados para cumplir exitosamente la etapa de expresión y purificación de *EhPDI*.

2) El procedimiento de reducción y desnaturalización de lisozima empleando los agentes químicos DTT y cloruro de guanidinio fue adecuadamente aplicado para inactivar a lisozima. En las condiciones de nuestro ensayo, no se observó replegamiento oxidativo de lisozima catalizado por los agentes redox (GSH/GSSG) en ausencia de enzima; sin embargo, a concentraciones de 5, 10 y 20 μM de *EhPDI* se lograron recuperaciones significativas de lisozima, indicando que *EhPDI* exhibe actividad oxidasa *in vitro*.

3) La actividad oxidasa de la enzima *EhPDI* es dependiente de la concentración de sustrato; aun más, se puede predecir que se logra la saturación enzimática a concentraciones mayores de 30 μM del sustrato, lisozima desnaturalizada y reducida.

4) La actividad oxidasa de la enzima *EhPDI* puede ser inhibida por el antibiótico bacitracina y los agentes alquilantes (4-DTDP, DTNB). Las concentraciones inhibitorias se encuentran en el orden micromolar (μM); sin embargo, los agentes alquilantes no inhiben al 100 % la actividad oxidasa de *EhPDI*.

5) La enzima *EhPDI* reportada en este trabajo es la primera proteína estudiada a nivel bioquímico que participa en el mecanismo de formación y rearrreglo de enlaces disulfuro en el parásito *E. histolytica*. Además, esta enzima *EhPDI* puede ser utilizada con fines farmacológicos (diseño de inhibidores) y biotecnológicos (replegamiento asistido *in vitro* de proteínas).

VII. REFERENCIAS

- [1] Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):511-32.
- [2] Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone (Elsevier). 6th Edition. 2004.
- [3] Klatt EC. Robbins y Cotran: Atlas de anatomía patológica. Elsevier. 1a Edición. 2007.
- [4] McGugan GC Jr, Joshi MB, Dwyer DM. McGugan GC, Joshi MB, Dwyer DM. Identification and biochemical characterization of unique secretory nucleases of the human enteric pathogen, *Entamoeba histolytica*. J Biol Chem. 2007;282(43):31789-802.
- [5] Bansal D, Malla N, Mahajan RC. Drug resistance in amoebiasis. Indian J Med Res. 2006;123(2):115-8.
- [6] Karp G. Biología Celular y Molecular. McGraw Hill. 2001.
- [7] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. Garland. 4th Edition. 2002.
- [8] Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Molecular Cell Biology. W H Freeman. 4th Edition. 1999.
- [9] Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. Biochim Biophys Acta. 2004;1699(1-2):35-44.

- [10] Puig A, Lyles MM, Noiva R, Gilbert HF. The role of the thiol/disulfide centers and peptide binding site in the chaperone and anti-chaperone activities of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem.* 1994;269(29):19128-35.
- [11] Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Methods in Enzymology.* 1998; 290:26-50.
- [12] Ramos MA, Alagón A. Molecular cloning of a gene encoding a PDI-like protein from *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* 2000;31(4):S173-5.
- [13] Ramos MA, Sanchez-Lopez R, Mares RE, Olvera F, Alagón A. Identification of an *Entamoeba histolytica* gene encoding a protein disulfide isomerase that functionally complements the *dsbA* mutation in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;143(2):236-40.
- [14] Ramos MA, Mares RE, Magaña PD, Ortega JE, Cornejo-Bravo JM. In silico identification of the protein disulfide isomerase family from a protozoan parasite. *Comput Biol Chem.* 2008;32(1):66-70.
- [15] Nakamoto H, Bardwell JC. Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the *Escherichia coli* periplasm. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1694(1-3):111-9.
- [16] Stafford JS, Lund PA. Mutagenic studies on human protein disulfide isomerase by complementation of *Escherichia coli* *dsbA* and *dsbC* mutants. *FEBS Lett.* 2000;466(2-3):317-22.
- [17] Kallis GB, Holmgren A. Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1980;255(21):10261-5.