UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Q u í m i c o F a r m a c o b i ó l o g o

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD REDUCTASA Y CHAPERONA DE LA ENZIMA PROTEÍNA DISULFURO ISOMERASA DE *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C O F A R M A C O B I Ó L O G O

P R E S E N T A

ANALLELÍ ELISA MALVÁEZ VÁZQUEZ

Tijuana, B. C. **Mayo de 2011.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFRONIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.011/11
Tijuana, Baja California
Mayo 05/11

C. MALVAEZ VAZQUEZ ANALLELI ELISA
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

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

es propuesto por el **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra**

quién será responsable de la calidad de trabajo que usted presenta, referido al tema: "**Análisis de la actividad reductasa y chaperona de la enzima proteína disulfuro isomerasa de Saccharomyces cerevisiae**"
el cual deberá desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

1.- INTRODUCCIÓN
11.- ANTECEDENTES
111.- METODOS EXPERIMENTALES
1V.- ZONA DE ESTUDIOS
V.- RESULTADOS
VI.- CONCLUSIONES
VII- REFERENCIAS

Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Asesor

Q. Noemi Hernández Hernández
Sub- Director

Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

Con todo mi amor a esa persona que siempre ha estado conmigo, y que desde que la conocí, ha sido la luz de mi vida, mi inspiración y mi motor para seguir adelante, que siempre está conmigo y que me da su cariño incondicional

Fátima (MOMITO) Malváez, *Te dedico el fruto de mi esfuerzo, por no solo ser mi hermana sino también, mi mejor amiga.*

Espero ser un buen ejemplo para ti.

Te Amo con todo mi corazón HERMANITA

Les agradezco sinceramente:

Primero a esa fuerza más grande que yo DIOS.

A mis padres **Lourdes Vázquez y Elias Malváez,** que siempre me han dado todo su apoyo.

A mi asesor de tesis el **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra,** que me ha enseñado, que siempre se puede y que ha hecho que crezca en mi ese amor a la ciencia, y que no ha dejado que muera en mi esa curiosidad que me hace seguir teniendo sed de respuestas y nuevos conocimientos, y por ser un ejemplo a seguir no solo en el campo científico.

A la **Dra. Rosa Elena Mares Alejandre**, por todo su apoyo incondicional y por brindarme su amistad sincera.

Al **Dr. José Manuel Cornejo Bravo, Dr. Samuel Guillermo Meléndez López, y al Dr. Iván Córdova Guerrero** por sus acertados consejos.

A las Profesoras, **Hortensia Maximiliano, Guillermina Mecate y Antonia Martínez**, que forjaron las bases de dedicación y empeño en mí y a los profesores **José Antemio Cazares y Javier Borja** quienes me iniciaron en este camino científico

A mi compañero y amigo **Rodrigo Lameda Díaz Conde,** por acompañare durante mi paso por la universidad, por no dejarme desistir en esta carrera hasta alcanzar mis metas, y por iniciar este proyecto conmigo.

A todos los compañeros y amigos que conocí en mi paso por el **Lab. De Biotecnología,** por brindarme su amistad sin condiciones y por ser parte de la mejor etapa de mi vida.

A todos Ustedes MUCHAS GRACIAS

El presente trabajo de investigación fue realizado en el

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA

de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

Bajo la Dirección y Tutoría del

DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA.

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento de la

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

(Financiamiento No. 47554, Ciencia Básica SEP-CONACYT 2004).

Tabla de Contenido

Índice de Figuras 6

Índice de Tablas 8

Abreviaturas 9

1. INTRODUCCIÓN 10

1.1. *Saccharomyces cerevisiae* 10

1.1.1. Ciclo de vida 11
1.1.2. Ciclo celular 12
1.1.3. Vía de secreción 15

1.2. Plegamiento de proteínas 16

1.2.1. Plegasas y chaperonas 17
1.2.2. Plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico 17
1.2.3. Plegamiento de proteínas en otros compartimentos 18
1.2.4. Plegamiento de proteínas in vitro 18

1.3. Proteína disulfuro isomerasa 20

1.3.1. Superfamilia de tiorredoxinas 21
1.3.2. Familia de proteínas disulfro isomerasa 22
1.3.3. Actividad como oxidorreductasa 22
1.3.4. Función como chaperona y anti-chaperona 24
1.3.5. Otras funciones celulares 25

1.4. PDI de *Saccharomyces cerevisiae* 25

1.4.1. Familia PDI de S. cerevisiae 25
1.4.2. Genética y bioquímica de ScPDI1 26
1.4.3. Localización y función celular de ScPDI1 27
1.4.4. ScPDI1 como proteína esencial de S. cerevisiae 28

2. JUSTIFICACIÓN 29

3. OBJETIVOS 30

3.1. Objetivo general 30

3.2. Objetivos específicos 30

4. MATERIALES Y MÉTODOS 31

4.1. Reactivos químicos y soluciones 31

4.2. Reactivos biológicos y estuches comerciales 31

4.3. Medios de cultivo y células bacterianas 32

4.3.1. Medios de cultivo 32
4.3.2. Escherichia coli XL1 Blue MRF´ 33
4.3.3. Preparación de células de E. coli termocompetentes 33

4.4. Plásmidos y oligonucleótidos sintéticos 34

4.4.1. pCT38 34
4.4.2. pQE30 34
4.4.3. Oligonucleótidos sintéticos 35

4.5. Obtención del gen *Sc*PDI1 36

4.5.1. Amplificación mediante PCR del gen ScPDI1 36
4.5.2. Purificación del producto de PCR ScPDI1 36

4.6. Obtención del plásmido pQE30 37

4.7. Obtención del plásmido pQYPDI 38

4.7.1. Digestión endonucleolítica de PPCR ScPDI1 y pQE30 38
4.7.2. Purificación de los productos de la digestión endonucleolítica 39
4.7.3. Construcción del plásmido pQYPDI 39
4.7.4. Transformación bacteriana. 40
4.7.5. Selección y análisis de transformantes estables 40
4.7.6. Caracterización molecular de pQYPDI. 41

4.8. Análisis de expresión de la proteína recombinante *Sc*PDI1 41

4.8.1. Preparación de cultivos analíticos 41
4.8.2. Obtención de lisados bacterianos totales 42
4.8.3. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 43

4.9. Expresión y purificación de la proteína recombinante ScPDI1. 44

4.9.1. Preparación de cultivos preparativos 44
4.9.2. Obtención de lisados bacterianos preparativos 44
4.9.3. Purificación de ScPDI1 mediante cromatografía de afinidad a níquel ... 45
4.9.4. Purificación de ScPDI1 mediante cromatografía de exclusión molecular 46
4.9.5. Cuantificación de la proteína recombinante ScPDI1 46

4.10. Análisis de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 recombinante 47

4.10.1. Evaluación de la actividad enzimática 47
4.10.2. Efecto de la concentración de enzima 48
4.10.3. Efecto de la concentración de sustrato 49
4.10.4. Efecto del pH 51

4.11. Análisis de inhibición de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 52

4.11.1. Bacitracina como inhibidor 52
4.11.2. Efecto de la concentración de bacitracina 53

4.12. Análisis de la función como chaperona de *Sc*PDI1 55

4.12.1. Ensayo de protección insulina 55
4.12.2. Efecto de vancomicina sobre la función chaperona 56

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES 58

5.1. El gen pdi1 de levadura, codificante para *Sc*PDI1 58

5.2. Clonación de la secuencia nucleotídica codificante para *Sc*PDI1 59

5.3. Caracterización molecular de pQYPDI 60

5.4. pQYPDI, el plásmido de expresión de *Sc*PDI1 61

5.5. Expresión y purificación de la proteína recombinante ScPDI1 61

5.6. Análisis de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 63

5.7. Efecto del pH sobre la actividad reductasa de *Sc*PDI1 67

5.8. Bacitracina como inhibidor de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 67

5.9. *Sc*PDI1 como chaperona molecular 68

5.10. Vancomicina como inhibidor de la función chaperona de *Sc*PDI1 69

6. CONCLUSIONES 71

7. BIBLIOGRAFIA 72

ANEXO. Tablas de Resultados. 74

Índice de Figuras

Figura 1. Células de *Saccharomyces cerevisiae* visualizadas mediante microscopia electrónica. 10

Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*. 12

Figura 3. Representación esquemática del ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*. 14

Figura 4. Representación esquemática de la vía de secreción en células eucariotas. 16

Figura 5. Representación esquemática de la organización de dominios de la enzima PDI de rata. 21

Figura 6. Representación esquemática de la oxidación e isomerización (rearreglo) de enlaces disulfuro en sustratos polipeptídicos catalizados por PDI. 23

Figura 7. Representación esquemática de la reducción de enlaces catalizada por PDI, en azul se muestra la enzima y en rojo so sustrato. 24

Figura 8. Esquema de la organización de dominios y estructura 3D de la enzima PDI1 de *S. cerevisiae*. 27

Figura 9. Representación circular del plásmido pCT38. 34

Figura 10. Representación circular del plásmido pQE30. 35

Figura 11. Secuencia nucleotídica y polipeptídica de la enzima PDI1 de *S. cerevisiae*. 58

Figura 12. Separación electroforética del producto de PCR *Sc*PDI1. 59

Figura 13. Separación electroforética de los productos de digestión para la liberación del inserto (*Sc*PDI1) de 7 clonas estables (C1-C7). 60

Figura 14. Separación electroforética de los productos de digestión para la caracterización del inserto (*Sc*PDI1) de 4 clonas estables (C1-C4). 61

Figura 15. Representación circular del plásmido pQYPDI, secuencia polipeptídica de la proteína recombinante ScPDI1 y algunas de sus propiedades fisicoquímicas relevantes. 62

Figura 16. Separación electroforética de proteínas de los lisados bacterianos totales de 4 clonas (C1-C4) de expresión de la proteína recombinante *Sc*PDI1. 63

Figura 17. Separación electroforética y análisis de las fracciones colectadas durante la purificación de la *Sc*PDI1 recombinante mediante cromatografía de afinidad a níquel. 64

Figura 18. Representación gráfica del análisis comparativo de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 y *Eh*PDI. 65

Figura 19. Representación gráfica del análisis dosis-dependiente de la actividad reductasa en relación a la concentración de *Sc*PDI1. 65

Figura 20. Representación gráfica del análisis mediante la ecuación Lineweaver-Burk de la actividad reductasa de la enzima *Sc*PDI1 con respecto a la concentración de insulina. 66

Figura 21. Representación gráfica del análisis pH-dependiente de la actividad reductasa de *Sc*PDI1. 67

Figura 22. Representación gráfica del análisis de inhibición de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 por el antibiótico bacitracina. 68

Figura 23. Representación gráfica del análisis de la actividad chaperona de *Sc*PDI1. 69

Figura 24. Representación gráfica del análisis de inhibición de la actividad chaperona de *Sc*PDI1 por vancomicina. 70

Índice de Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *Sc*PDI1.....35

Tabla 2. Mezcla reacción de PCR para amplificar el gen *Sc*PDI1.....36

Tabla 3. Mezclas y procedimiento de digestión de PPCR *Sc*PDI1 y pQE30. 38

Tabla 4. Mezcla de reacción para la ligación y construcción de pQYPDI. 40

Tabla 5. Soluciones para purificar la proteína recombinante *Sc*PDI1 mediante cromatografía de afinidad a níquel, en condiciones nativas. 45

Tabla 6. Análisis comparativo de la actividad reductasa de las enzimas PDI de levadura (*Sc*PDI1) y amiba (*Eh*PDI).....74

Tabla 7. Análisis de la actividad reductasa a diferentes concentraciones de *Sc*PDI1. 74

Tabla 8. Actividad reductasa a diferentes concentraciones de insulina. 75

Tabla 9. Actividad reductasa a diferentes valores de pH. 75

Tabla 10. Análisis de inhibición de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 por bacitracina. 76

Tabla 11. Análisis de la actividad chaperona de *Sc*PDI1. 76

Tabla 12. Análisis de inhibición de la actividad chaperona de *Sc*PDI1 por vancomicina. 77

Abreviaturas

A_{650}	Absorbancia a 650 nm
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
ATP	Trifosfato de adenosina
BM	Biología molecular
dNTPs	Desoxi-nucleótidos triosfatados
DTT	Ditiotreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ácido etilendiaminotetrácetico
Eh	*Entamoeba histolytica*
*Eh*PDI	PDI de *E. histolytica*
et al.	Y colaboradores (del latín *et allos*)
h	Hora(s)
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido
Kb	Kilopar(es) de base(s)
KDa	Kilodalton(es)
M, mM, µM	Molar, milimolar, micromolar
min	Minuto(s)
mL, µL	Mililitro(s), microlitro(s)
p.e.	Por ejemplo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Par(es) de bases
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PPCR	Producto de PCR
PPI	Peptidil prolil (*cis*/*trans*) isomerasa
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
Sc	*Saccharomyces cerevisiae*
ScPDI	PDI de *S. cerevisiae*
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Trx	Tioredoxina
ufc	Unidad(es) formadora(s) de colonia(s)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo eucariótico unicelular simple, mitocondriado y con una pared celular rígida. Esta levadura es ampliamente utilizada en las industrias panadera y cervecera, por cual ha sido llamada también “levadura de pan” (ver Figura 1). En investigación, *S. cerevisiae* es uno de los modelos más adecuados para el estudio de problemas biológicos, ya que se trata un sistema eucariótico con un genoma relativamente pequeño (fácil de manipular) y de rápido crecimiento, lo que facilita la replicación celular y el aislamiento de mutantes. Además, por su baja patogenicidad para humanos, es posible su manipulación con las mínimas precauciones [Alberts *et al*., 2006].

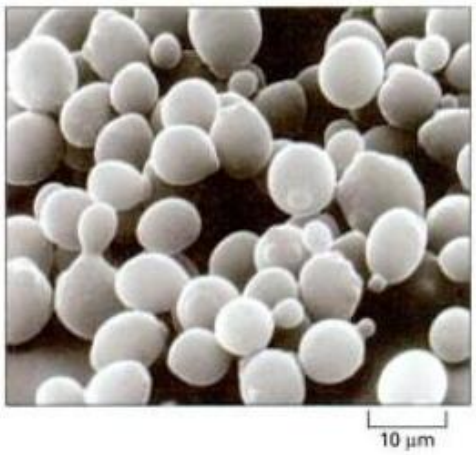


Figura 1. Células de *Saccharomyces cerevisiae* visualizadas mediante microscopia electrónica.

Tomado de Alberts *et al.*, 2006.

1.1.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *S. cerevisiae* posee dos fases, una vegetativa (o asexual) y otra sexual. Durante la fase vegetativa, la levadura se divide por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una "yema o brote" en la célula madre; posteriormente, ocurre la división nuclear, la síntesis de la pared y, finalmente, la separación de las dos células. Este ciclo puede ocurrir en cultivos de células diploides o haploides, y por tanto se puede experimentar con cultivos estables haploides o diploides [Berck *et* al, 2005].

Por otro lado, *S. cerevisiae* posee dos tipos sexuales: células "a" que producen el factor de apareamiento '*a*', el cual es una feromona peptídica que indica la presencia de células "a" a células del sexo opuesto. Las células "a" no responden al factor de apareamiento '*a*', pero sí lo harán en presencia del factor de apareamiento 'α'; que, de igual manera, es una feromona que produce el otro tipo de células, llamadas "α". El fenotipo sexual de *S. cerevisiae* está determinado por un par de alelos: MATa y MATα. Ambos tipos celulares se reproducen de forma asexual, por gemación; sin embargo, en condiciones muy determinadas, la forma diploide es capaz de reproducirse sexualmente [Berck *et* al, 2005].

Las células haploides pueden reproducirse de forma sexual: sí una célula "a" se encuentra con una célula "α" se fusionarán formando una sola célula, la cual también sufrirá una fusión de núcleos, obteniéndose una célula diploide "a/α" estable. la cual también será capaz de reproducirse de forma asexual. Por otro lado, cuando las condiciones exteriores son desfavorables para la duplicación y el crecimiento de las células diploides, sobreviene la división por meiosis, rindiendo

cuatro esporas haploides, dos de tipo sexual “a” y dos de tipo sexual “α” (ver Figura 2) [Berk *et al.*, 2005].

1.1.2. Ciclo celular

El ciclo celular es una sucesión ordenada de procesos mediante los cuales una célula crece y se divide en dos. La célula debe completar cuatro funciones durante el ciclo celular: crecer, replicar el DNA, segregar los cromosomas en dos conjuntos iguales y dividirse. El ciclo celular se ha dividido en cuatro fases: la fase S (sintética), en la cual se replica el ADN, la fase M (mitótica), en la que se segregan los cromosomas y se divide la célula, y dos fases G (G1 y G2), que separan el final de la mitosis del inicio de la replicación (G1) y el final de la replicación del inicio de

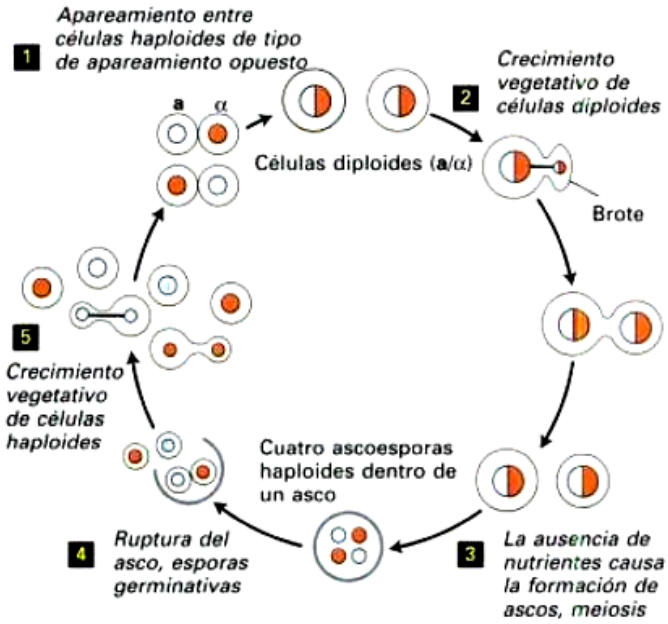


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tomado de Berk, *et al*., 2005.

la mitosis (G2) [Jiménez, 2002].

Uno de los organismos de mayor utilidad en la comprensión de los diversos aspectos del ciclo celular ha sido *S. cerevisiae*, en este microorganismo el principal control durante el ciclo celular está situado al final de la fase G1, en un punto llamado “START”, el cual coordina el crecimiento con la división celular: la célula solo entrará en un nuevo ciclo celular si ha alcanzado un tamaño crítico y las condiciones medioambientales son apropiadas. Además, en este punto de control, la célula puede seguir cualquiera de estas dos vías: una ejecutar “START” y comprometerse con una nueva ronda de división, o detener el ciclo celular en G1, dando lugar a la entrada en fase G0, o la esporulación, dependiendo del tipo celular y de la severidad de la limitación de nutrientes. Por otro lado, las células haploides responden a la presencia de feromonas deteniendo su ciclo celular y activando el proceso de conjugación [Martínez, 2006].

Una vez ejecutado el “START”, se ponen en marcha los diferentes procesos post-START: la gemación, la duplicación del huso acromático y el inicio de la replicación del DNA. La formación de la “yema o brote” implica la polarización del cito esqueleto de actina y la secreción direccional de componentes necesarios para la formación de la pared celular. El crecimiento de la “yema o brote” sucede en dos fases: inicialmente, presenta un crecimiento apical y polarizado; más tarde, cuando la “yema o brote” alcanza la tercera parte de su tamaño final, el crecimiento se hace isotrópico, produciéndose deposiciones de pared celular uniformemente por toda la “yema o brote”. Este último proceso se produce al final de la fase S y durante la

mitosis. Por tal motivo, la aparición y el tamaño de la “yema o brote” sirven como marcadores de las diferentes fases del ciclo celular [Martínez, 2006].

Por su parte, la mitosis se subdivide en 4 fases: profase, metafase, anafase y telofase. Los cromosomas se condensan durante la profase, se alinean con el huso en metafase, se separan en dos durante la anafase y se descondensan en la telofase. En *S. cerevisiae*, a diferencia de los eucariotas superiores, la mitosis se caracteriza por ser cerrada ya que la membrana nuclear no desaparece. Por último, al final de la mitosis se lleva a cabo la citocinesis. Durante la citocinesis se produce la contracción del anillo de actomiosina, se refuerza la pared celular y se hidroliza la quitina, dando lugar a la separación de las dos células, siendo la célula hija algo más pequeña que la madre (ver Figura 3) [Müller-Esterl, 2009].

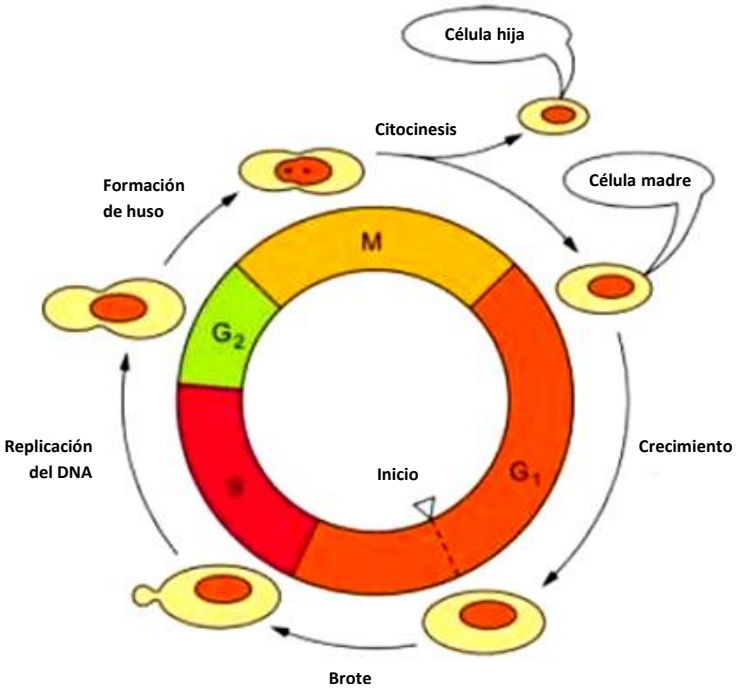


Figura 3. Representación esquemática del ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tomado de Müller-Esterl, 2009.

1.1.3. Vía de secreción

En células eucariotas, las proteínas son transportadas hacia compartimientos intracelulares o exportados hacia el espacio extracelular por medio de un sistema endomembranoso. Dicho transporte se realiza desde el retículo endoplásmico hacia el complejo de Golgi, el cual 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. En la vía de secreción, los materiales sintetizados son transportados desde el citosol hacia diferentes destinos, tales como lisosoma, membrana plasmática o espacio extracelular. Esta vía incluye el flujo de lípidos, carbohidratos y proteínas. [Karp, 2006].

Las actividades secretoras de las células pueden dividirse en dos tipos: constitutiva y regulada (ver Figura 4). En la secreción constitutiva, las proteínas se transportan 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 las proteínas se almacenan en vesículas secretorias que permanecen en las regiones periféricas y se descargan en respuesta a un estímulo apropiado [Anelli y Sitia, 2008].

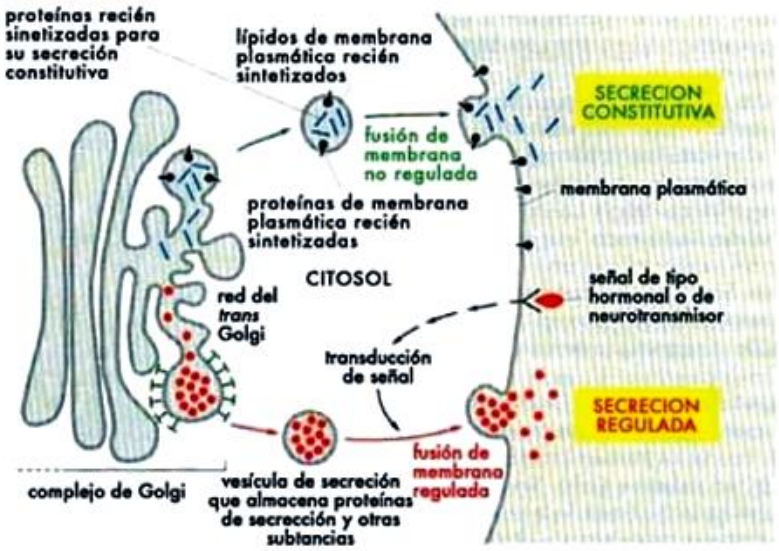


Figura 4. Representación esquemática de la vía de secreción en células eucariotas.

Tomado de Müller-Esterl, 2009.

1.2. Plegamiento de proteínas

El proceso mediante el cual una cadena polipeptídica recién sintetizada adopta una conformación única y termodinámicamente más estable, conocida como estado nativo, se le denomina plegamiento proteico. Dentro de las células, el plegamiento es asistido por catalizadores biológicos que aceleran el proceso y chaperonas que inhiben la agregación, evitando el plegamiento incorrecto de las proteínas. Actualmente, se ha demostrado que algunas enfermedades en humanos, tales como Alzheimer y enfisema, pueden ser ocasionadas por un plegamiento incorrecto de algunas proteínas, el cual conduce a una pérdida de sus funciones. [Wilkinson y Gilbert, 2004].

1.2.1. Plegasas y chaperonas

Aunque la información precisa para que una proteína pueda plegarse correctamente reside en su secuencia primaria, el interior de la célula está tan repleto de proteínas que aparecen problemas de agregación, pues los intermediarios del plegamiento pueden tener expuestas regiones hidrófobas que pueden unirse formando complejos de proteínas mal plegadas. Para evitar esto, durante el plegamiento de proteínas se lleva a cabo un estricto “control de calidad”, el cual es llevado a cabo por medio de proteínas auxiliares del correcto plegamiento, cuya principal función es evitar que se formen agregados. Tales proteínas han sido agrupadas en la familia de plegasas y chaperonas [Fasio y Sitia, 2008]. Entre las funciones atribuidas a esta familia de proteínas está prevenir e inhibir el plegamiento incorrecto de proteínas, de tal manera que se evite o reduzca el riesgo de citotoxicidad celular [Anelli y Sitia, 2008].

1.2.2. Plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico

El plegamiento de proteínas tiene varios niveles de regulación, uno de los más importantes se localiza en el retículo endoplásmico [Fassio y Sitia, 2002]. Cuando las proteínas nacientes llegan al lumen de retículo endoplásmico (RE), éstas pueden sufrir una serie de modificaciones bioquímicas que favorecen su plegamiento, tal como la remoción del péptido señal, la formación de enlaces disulfuro, la isomerización de residuos de prolina y la N-glicosilación; estas modificaciones son catalizadas por enzimas (foldasas) y asistidas por chaperonas [Anelli y Sitia, 2008].

1.2.3. Plegamiento de proteínas en otros compartimentos

Además del RE, existen el plegamiento de proteínas puede llevarse a cabo en otros compartimentos, tales como complejo de Golgi, los lisosomas, y las mitocondrias; incluso, es posible el plegamiento en el citosol (específicamente para aquellas proteínas cuyo destino final es tal compartimiento) [Anelli y Sitia, 2008].

1.2.4. Plegamiento de proteínas in vitro

In vivo, una proteína puede alcanzar su forma nativa con rapidez y alta eficiencia; sin embargo, *in vitro*, no es suficientemente rápido como a nivel celular [Westphal *et al*., 1999]. Habitualmente, la expresión de proteínas se lleva a cabo en modelos bacterianos, ya que su paraplasma contiene las características medioambientales necesarias para tal fin.

Uno de los modelos bacterianos más utilizados es *Escherichia coli,* ya que es un microorganismo fácil de manejar y exhibe baja patogenicidad. Sin embargo, frecuentemente la expresión periplásmica no es eficiente, por lo que es necesario intentar la expresión citosólica, lo cual puede presentar algunos inconvenientes, tal como la formación de cuerpos de inclusión y la ausencia de enlaces disulfuro por su estado altamente reductor; por tal motivo, las proteínas carecen de actividad biológica y requieren de solubilización y replegamiento *in vitro* para recuperar su estado biológicamente activo. Generalmente, los cuerpos de inclusión se solubilizan en altas concentraciones de agentes desnaturalizantes (p.e. urea y clorhidrato de guanidinio) y la presencia de agentes reductores (p.e. 2-mercaptoetanol y

ditiotreitol). Posteriormente, los agentes denaturalizantes y reductores deben ser removidos, lentamente en presencia de agentes oxidantes (p.e. glutationes) [Wilkinson y Gilbert, 2004; Singh y Panda, 2005].

Rutinariamente, el replegamiento de proteínas *in vitro* es un procesamiento engorroso que, la mayoría de las veces, puede rendir una recuperación muy baja de proteína activa. Los métodos tradicionales de replegamiento *in vitro* involucran cuatro etapas: (i) aislamiento de cuerpos de inclusión, (ii) solubilización de los agregados proteicos, (iii) replegamiento de las proteínas solubilizadas, y (iv) purificación de la forma activa. De éstas, la solubilización y el replegamiento son las etapas cruciales.

Habitualmente, los agregados proteicos se solubilizan usando soluciones con altas concentraciones (6–8 M) de agentes caotrópicos (p.e. urea o clorhidrato de guanidinio) y, ocasionalmente, suplementadas con (i) detergentes (p.e. dodecil sulfato de sodio o N-lauroil sarcosina de sodio), que evitan las interacciones hidrofóbicas proteína-proteína; (ii) agentes reductores (p.e. 2-mercaptoetanol o ditiotreitol), que mantienen los residuos de cisteína en su estado reducido y previenen la formación de enlaces disulfuro no nativos (intra o intermolecular) en soluciones con pH alcalino; y (iii) un agente quelante (p.e. EDTA), que previene la oxidación de cisteínas catalizada por metales.

Por otro lado, el replegamiento de proteínas con múltiples enlaces disulfuro requiere un procedimiento más elaborado; específicamente, en presencia de concentraciones óptimas de un par de agentes redox (p.e. glutationes, GSH/GSSH). Recientemente, se ha popularizado el uso de aditivos que favorecen el

replegamiento y mejoran la recuperación de proteína activa; tal como se ha observado con la adición de L- arginina (0.4 – 1.0 M), la cual reduce la agregación proteica [Singh y Panda, 2005].

Como ya se describió, el plegamiento de proteínas *in vitro* puede ser, en un medio ambiente óptimo, espontáneo; sin embargo, en muchos casos no procede eficientemente debido a que algunas reacciones son lentas, tales como la formación de enlaces disulfuro y la isomerización de prolinas. *In vivo*, estas reaciones son catalizadas por enzimas que pertenecen a la familia de tiorredoxinas (PDI en eucariotas y Dsb en procariotas) y por la enzima peptidil-prolis cis-trans isomerasa (PPI), respectivamente [Shin, 2001]. Además, es importante mencionar el papel de las chaperonas, las cuales pueden desempañar diferentes funciones.

En *E. coli*, las chaperonas IbpA e IbpB participan como sujetadoras del sustrato, las chaperonas DnaK y GroEL/GroES como plegadoras dependientes de ATP, y las chaperonas ClpB y HtpG como desagregadoras y promotoras de la solubilización [Jhamb *et al*., 2008; Sahdev *et al*., 2008]. Recientemente, las nuevas estrategias de producción de proteínas recombinantes consideran la co-expresión *in vivo* de plegasas y chaperonas o la asistencia al replegamiento *in vitro* mediante sistemas solubles o en fase solida [Sahdev *et al*., 2008].

1.3. Proteína disulfuro isomerasa

La enzima proteína disulfuro isomerasa (PDI) es una oxidorreductasa eucariótica que asiste el plegamiento de proteínas catalizando la reducción,

oxidación e isomerización de enlaces disulfuro en polipéptidos nacientes durante su paso por el retículo endoplasmico [Kimura *et al*., 2004].

1.3.1. Superfamilia de tiorredoxinas

Las tiorredoxinas (Trx) son proteínas que actúan como ditiol-disulfuro oxidorreductasas, están presentes en casi todos los organismos y son esenciales para la vida en los mamíferos [Wilkinson y Gilbert, 2004]. Existe un gran número de Trx, las cuales se agrupan en una superfamilia y se caracterizan por contener uno o más sitios activos con el motivo estructural CXXC. Durante la catálisis, el estado redox de la enzima depende el estado redox de la proteína sustrato; específicamente, el sitio activo de la Trx cicla entre sus estados oxidado y reducido, dependiendo de la función bioquímica requerida; es decir, los sitios activos CXXC en su estado oxidado (disulfuro) son buenos agentes oxidantes, lo cual facilita la formación del enlace disulfuro en el sustrato; por el contrario, los sitios activos CXXC en su estado reducido (ditiol) son buenos agentes reductores, lo cual facilita la ruptura del disulfuro del sustrato [Holmgren, 1979].

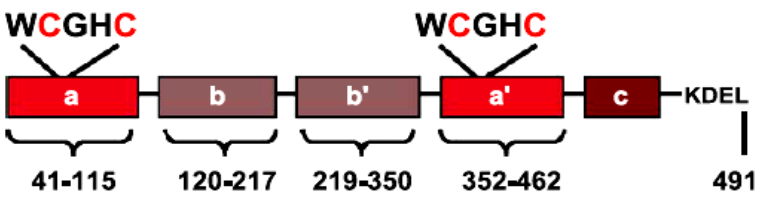


Figura 5. Representación esquemática de la organización de dominios de la enzima PDI de rata.

Tomado de Wilkinson y Gilbert, 2004.

1.3.2. Familia de proteínas disulfro isomerasa

Las enzimas PDI son un grupo de tiorredoxinas localizadas en el retículo endoplásmico de células eucariotas. Como cualquier otra tiorredoxina, las enzimas PDI son auxiliares del correcto plegamiento de polipéptidos, ya que además de su actividad oxidorreductora, pueden exhibir otras funciones, tales como chaperona y anti-chaperona.

De las más estudiadas, la familia PDI de mamíferos se caracteriza por presentar una arquitectura organizacional de 5 dominios: a, b, b', a' y c (ver Figura 5); los dominios a y a' son homólogos de las Trx, contienen sitios activos independientes CXXC (en la secuencia WCGHCK) y participan en la actividad oxidorreductora, los dominios b y b' son similares a Trx, pero carecen de sitio activo y, por ende, son enzimáticamente inactivos; además, presenta un dominio c, caracterizado por ser rico en residuos de aminoácidos ácidos y contener la secuencia de retención en el retículo endoplásmico KDEL [Wilkinson y Gilbert, 2004].

1.3.3. Actividad como oxidorreductasa

La función principal de la proteína PDI es actuar como oxidorreductasa, oxidando o rearreglando enlaces disulfuro de polipéptidos nacientes, durante el paso de éstos por el retículo endoplásmico (ver Figura 6) [Gruber *et al*., 2006]. Para esta función, PDI debe catalizar la oxidación o isomerización de enlaces disulfuro, lo cual depende tanto de la posición en el equilibrio de la reacción total como del

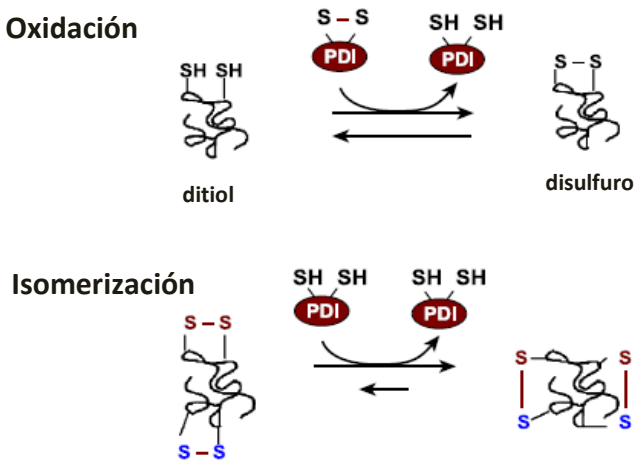


Figura 6. Representación esquemática de la oxidación e isomerización (rearreglo) de enlaces disulfuro en sustratos polipeptídicos catalizados por PDI.

Tomado de Wilkinson y Gilbert, 2004.

estado redox del sitio activo y del medio ambiente celular [Wilkinson y Gilbert, 2004].

Uno de los factores que delimitan la actividad oxidorreductora de PDI es su estado redox: (i) en su estado oxidado, el disulfuro se transfiere al sustrato; por lo tanto el sitio activo queda reducido; por otro lado, (ii) en su estado reducido, el disulfuro del sustrato pueden ser reducido y el sitio activo queda en su estado oxidado. Se ha observado que la esta actividad oxidasa requiere únicamente de los dominios a y a', y que gran parte de la catálisis puede ser atribuida a la alta reactividad del sitio activo CXXC formando un enlace disulfuro [Wilkinson y Gilbert, 2004].

Además de las actividades oxidasa e isomerasa, PDI puede exhibir actividad reductora. En ésta, PDI se encuentra en su estado reducido y, posteriormente, reduce el enlace disulfuro del sustrato (ver Figura 7). La actividad reductasa de PDI

está ligada al control de calidad de proteínas mal plegadas. Estudios recientes confirman las interacciones especificas entre PDI y sus sustrato; y como parte del control de calidad en el RE, las actividades de reducción y oxidación se llevan a cabo simultáneamente, para mantener su equilibrio redox [Fassio y Sitia, 2001]; además, una mezcla de glutationes mantiene el equilibrio redox del medio intracelular [Westphal *et al,* 1999].

1.3.4. Función como chaperona y anti-chaperona

Otra de las funciones de PDI dentro de la célula es su participación en el control de calidad de la vía de secreción de proteínas como chaperona y anti-chaperona: su función de una chaperona molecular es unirse a proteínas desplegadas o parcialmente plegadas evitando la formación de agregados; mientras que su papel como anti-chaperona es facilitar el agregamiento de sustratos a concentraciones de sustrato elevadas [Puig y Gilbert, 1994; Lodish *et el*., 2005].

Para la actividad como chaperona molecular, PDI no requiere de las cisteínas de sus sitios activos; sin embargo, si se trunca el sitio activo del dominio C-terminal se pierde esta actividad, sugiriendo que éste influye en la actividad chaperona. Por

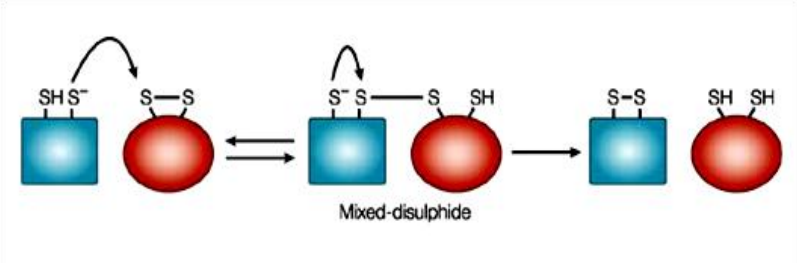


Figura 7. Representación esquemática de la reducción de enlaces catalizada por PDI, en azul se muestra la enzima y en rojo so sustrato.

Tomado de Sevier y Kaiser, 2002.

otro lado, la actividad chaperona se observa cuando PDI se encuentra concentraciones 1/5 o 1/10 con respecto a su sustrato, lo cual evita que las proteínas nacientes formen agregados y se precipiten, resultando tóxicas para la célula [Wilkinson y Gilbert, 2004].

1.3.5. Otras funciones celulares

La PDI también está presente en la superficie celular, aun cuando carece de algún dominio o motivo clásico de unión a membrana, aunque encuentra en concentraciones muy inferiores a las determinadas en el retículo endoplásmico. La PDI de la membrana celular se ha involucrado en el mantenimiento del estatus reductivo de esta membrana y en procesos que incluyen adhesión celular.

En el caso de la PDI humana, se le ha involucrado en la maduración de las plaquetas, transporte de oxido nítrico, modulación de la actividad de la trombospondina e interacción con el ectodominio del receptor de la tirotropina [Ryser *et al*., 1997].

1.4. PDI de *Saccharomyces cerevisiae*

1.4.1. Familia PDI de S. cerevisiae

La familia de enzimas PDI de la levadura *S. cerevisiae,* al igual que en mamíferos, se encuentran en el lumen del retículo endoplásmico y ayudan en el correcto plegamiento de proteínas nacientes. Esta familia está compuesta por 5 proteínas, con al menos un potencial sitio activo CXXC y una etiqueta de retención

al retículo endoplásmico HDEL [Gething, 1997] [Vitu *et al*, 2009]: la enzima PDI1/YCL043C, codificada por el gen *pdi1* (GenBank™ NM_001178688), la cual es esencial para la supervivencia [Farquhar *et al*, 1991]; las enzimas homólogas MPD1/YOR288C y MPD2/YOL088C, codificadas por los genes *mpd1* (GenBank™ NM_001183707) y *mdpd2* (GenBank™ NM_001183342), respectivamente, las cuales aunque poseen actividad disulfuro isomerasa, no son esenciales [Gething, 1997]; la enzima EUG1/YDR518W, codificada por el gen *eug1* (GenBank™ NM_001180826), la cual, a diferencia de las proteínas MPD, puede tener efecto sobre el correcto desarrollo de la levadura, por lo que puede ser considerada como una proteína esencial [Tachibana y Stevens, 1992]; y, por último, la enzima ERO1/YML130C, codificada por el gen *ero1* (GenBank™ NM_001182493), la cual es una de las proteínas más importantes en esta familia, ya que es la encargada de oxidar a la enzima PDI1 y a otras proteínas [Vitu *et al*, 2009].

1.4.2. Genética y bioquímica de ScPDI1

El gen codificante para la enzima PDI1 de *S. cerevisiae* (*Sc*PDI1) está localizado en el cromosoma III (*locus* YCL043C). El polipéptido precursor de la *Sc*PDI1 es de 522 aminoácidos y un peso molecular calculado de 58.23 KDa. Estructuralmente, *Sc*PDI1 contiene un péptido señal (28 aminoácidos) en el extremo N-terminal y una secuencia de retención en el RE (HDEL) en el extremo C-terminal. El polipéptido maduro (aminoácidos 29-522 y un peso molecular calculado de 55.35 KDa) contiene dos dominios Trx activos, comprendidos entre los aminoácidos 29 –

141 y 356 – 485 (definidos como a y a') y dos dominios Trx inactivos (definidos como b y b') (ver Figura 8) [Westphal *et al*., 1999].

1.4.3. Localización y función celular de ScPDI1

La enzima *Sc*PDI1 se encuentra primordialmente como proteína residente del RE. En este compartimiento, *Sc*PDI1 participa en el correcto plegamiento de polipéptidos nacientes, asistiendo en la oxidación/isomerización de enlaces disulfuro; además, está involucrada en glicosilación, hidroxilación de prolinas y transferencia de triglicéridos [Gunther *et al*., 1993].

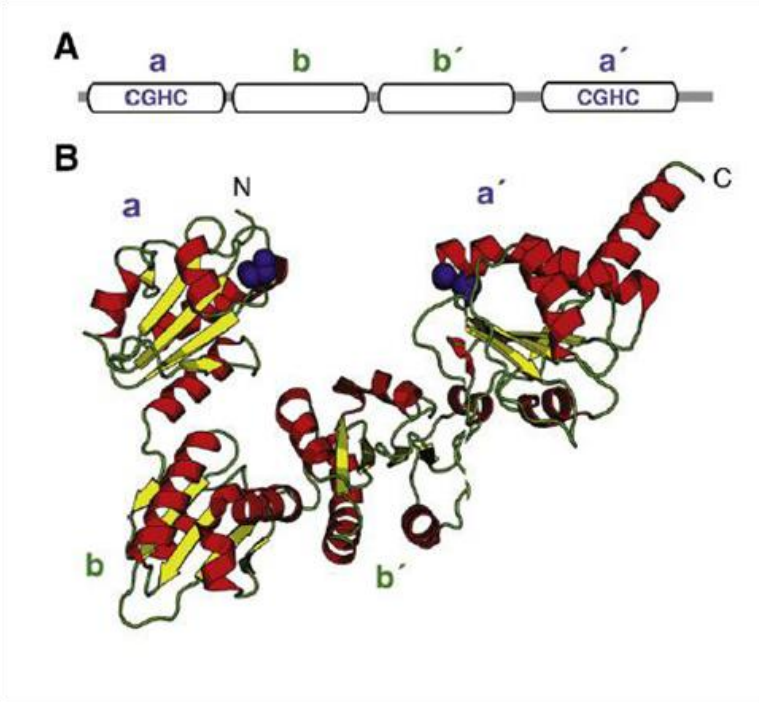


Figura 8. Esquema de la organización de dominios y estructura 3D de la enzima PDI1 de *S. cerevisiae*.

Tomado de Appenzeller-Herzog, 2008.

1.4.4. ScPDI1 como proteína esencial de S. cerevisiae

Para la levadura *S. cerevisiae*, la función que realiza la enzima *Sc*PDI1 es considera como esenciales; es decir, su función no puede ser sustituida por otra enzima paráloga. Por otro lado, cuando el gen *pdi1* es mutado (sustituyendo las cisteínas de los sitios activos) o eliminado, se ha observado un fenotipo alterado en la membrana (mayor porosidad), lo que hace más vulnerable a la levadura y, finalmente, exhibe un fenotipo letal [Farquhar *et al*., 1991].

2. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas PDI son proteínas importantes para la biología celular de muchos organismos, ya que juegan un papel crucial en la vía de secreción; principalmente como asistente del correcto plegamiento de polipéptidos en su paso por el retículo endoplásmico.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la enzima PDI1 es una proteína esencial, ya que su ausencia influye en el desarrollo celular, e incluso, puede ser letal. La enzima *Sc*PDI1 representa un excelente modelo para el estudio de su actividad, tanto enzimática como asistente del plegamiento (chaperona); además, puede ser un control excelente para el estudio de otras enzimas PDI homólogas.

Además, la levadura es un organismo modelo factible para estudios relacionados con toxicidad de fármacos que actúan directamente sobre la enzima PDI1, u otras homólogas, inhibiendo sus actividades o bloqueándolas. Esto favorecido por sus características celulares y moleculares (ampliamente conocidas), su baja patogenicidad y gran capacidad de reproducción *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Analizar las propiedades bioquímicas de las funciones reductasa y chaperona de la enzima recombinante PDI1 de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*PDI1) mediante ensayos *in vitro* de reducción y de protección de agregación de insulina.

3.2. Objetivos específicos

1. Obtener la enzima *Sc*PDI1 mediante protocolos estándar de clonación molecular y expresión-purificación bioquímica de proteínas.
2. Evaluar la actividad redutasa de la enzima *Sc*PDI1 mediante un ensayo de reducción de insulina.
3. Determinar las constantes enzimáticas de la actividad reductasa de la enzima *Sc*PDI1.
4. Determinar el efecto inhibitorio de bacitracina y otros inhibidores sobre de la actividad reductasa de la enzima *Sc*PDI1.
5. Evaluar la actividad chaperona de la enzima *Sc*PDI1 mediante un ensayo de protección de la agregación de insulina inducida por ditiotreitol.
6. Determinar el efecto inhibitorio de vancomicina sobre la actividad chaperona de la enzima *Sc*PDI1.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos químicos y soluciones

Los reactivos químicos y soluciones comerciales, grado biología molecular, fueron obtenidos de diferentes proveedores; por tal motivo, se identificarán apropiadamente en el manuscrito.

4.2. Reactivos biológicos y estuches comerciales

Para la reacción de PCR se usó la enzima *Taq* ADN polimerasa, el amortiguador recomendado por el proveedor (*Roche*), una mezcla comercial de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) (*New England Biolabs*). Para las digestiones endonucleolíticas se usaron las enzimas de restricción *Bam*HI, *Pst*I, EcoRV, *Hind*III y *Hpa*II, en conjunto con los amortiguadores recomendados por el proveedor (*New England Biolabs*). Para la ligación se utilizó la enzima T4 ADN ligasa y el amortiguador recomendado por el proveedor (*Roche*). Para la electoforesis de ADN se usaron los marcadores de peso molecular *DNA Ladder 1Kb* y λ-*Hind*III (*New England Biolabs*). Para la purificación de productos de PCR y de ADN plasmídido se utilizaron los estuches comerciales *QIAquick® PCR Purification Kit* y *QIAprep® Spin Miniprep Kit*, respectivamente (*Qiagen*).

Para los lisados bacterianos totales se usó el estuche comercial *CelLytic*® B Plus (*Sigma*). Para la purificación de la proteína recombinante, etiquetada con un hexámero de histidinas, se utilizó una columna de agarosa-NTA-níquel (*Qiagen*) (cromatografía de afinidad a metales) y una columna de *Sephadex*® G-25 PD-10 (*Pharmacia*) (cromatografía de exclusión molecular). Para el análisis de proteínas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970] y se utilizaron los marcadores de peso molecular *Protein Marker Broad Range* y *Pre-stained Marker Broad Range* (*New England Biolabs*). Para los ensayos de actividad reductasa se utilizó como sustrato la insulina de páncreas de bovino (*Sigma*) o la insulina recombinante humana *Humulin*® R (*Eli Lilly & Co*). Para los ensayos de inhibición de la actividad reductasa se usó el antibiótico bacitracina (*Sigma*). Para evaluar actividad chaperona se utilizó la insulina recombinante humana *Humulin*® R (*Eli Lilly & Co*). Para los ensayos de inhibición de la actividad chaperona se utilizó el antibiótico vancomicina (Sector Salud, SSA). La enzima *Eh*PDI fue usada como control en los ensayos de actividad reductasa (reserva de proteínas recombinantes del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC).

4.3. Medios de cultivo y células bacterianas

4.3.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo LB y 2X YT fueron preparados de acuerdo a protocolos estándar de laboratorio [Sambrook *et al*., 1989].

4.3.2. *Escherichia coli XL1 Blue MRF´*

La cepa *E. coli* XL1 Blue MRF´ (*Stratagene*) fue usada para los experimentos de clonación molecular y expresión proteica.

4.3.3. Preparación de células de E. coli termocompetentes

1. 2 mL de medio líquido LB fueron inoculados con una colonia (o 10 µL de una suspensión bacteriana en glicerol al 15%) de la cepa *E. coli* XL1-Blue MRF´ y se incubaron durante la noche a 37 °C y 300 rpm.
2. Al día siguiente, 2 mL de medio líquido LB fueron inoculados con 40 µL del cultivo joven y se incubaron durante 2-3 h a 37 °C y 300 rpm (hasta lograr una DO_{600} de 0.4-0.6).
3. 1 mL del cultivo fue transferido a un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min.
4. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular fue resuspendido en 500 µL de cloruro de calcio 50 mM (estéril).
5. La suspensión celular fue mantenida en hielo durante 5 min. y, posteriormente, centrifugada a 5,000 rpm durante 5 min.
6. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular fue resuspendido en 100 µL de cloruro de calcio 50 mM (estéril).
7. La suspensión celular se mantuvo en hielo hasta su aplicación en el protocolo de transformación mediante choque térmico.

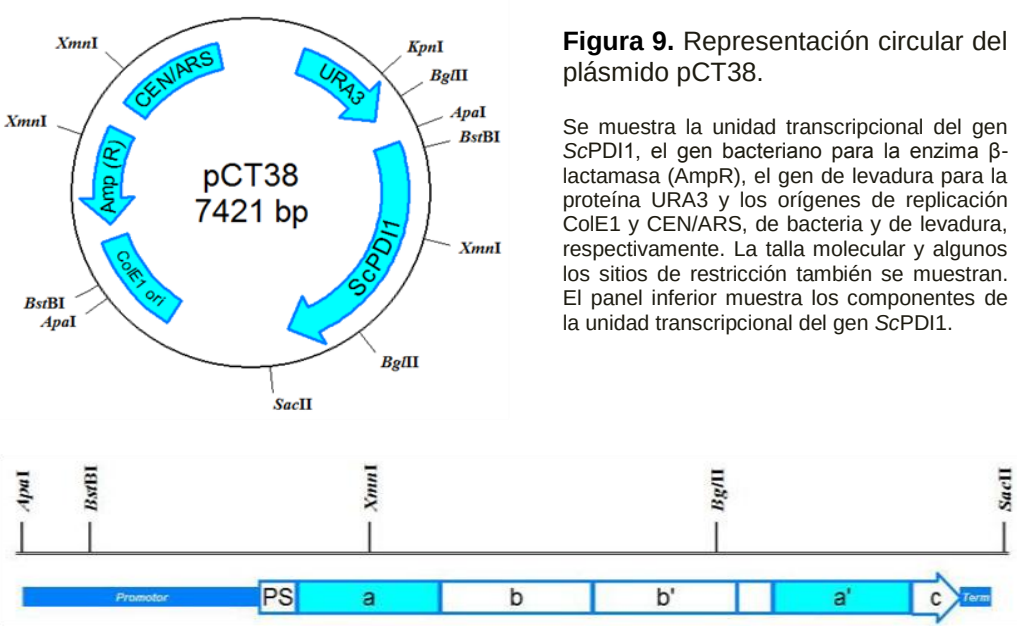


Figura 9. Representación circular del plásmido pCT38.

Se muestra la unidad transcripcional del gen *Sc*PDI1, el gen bacteriano para la enzima β-lactamasa (AmpR), el gen de levadura para la proteína URA3 y los orígenes de replicación ColE1 y CEN/ARS, de bacteria y de levadura, respectivamente. La talla molecular y algunos los sitios de restricción también se muestran. El panel inferior muestra los componentes de la unidad transcripcional del gen *Sc*PDI1.

4.4. Plásmidos y oligonucleótidos sintéticos

4.4.1. pCT38

El plásmido centromérico pCT38 (ver Figura 9), el cual contiene la unidad transcripcional para la expresión del gen *pdi1* de *S. cerevisiae*, fue obtenido de la reserva de plásmidos del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

4.4.2. pQE30

El plásmido pQE30 (*Qiagen*) es un vector de altos índices de expresión proteica, el cual posee el promotor/terminador T5/*Lac*O e incorpora un hexámero de histidinas en el extremo amino terminal, lo que permite una rápida purificación proteínas recombinantes; además, como marcador de selección posee el gen que

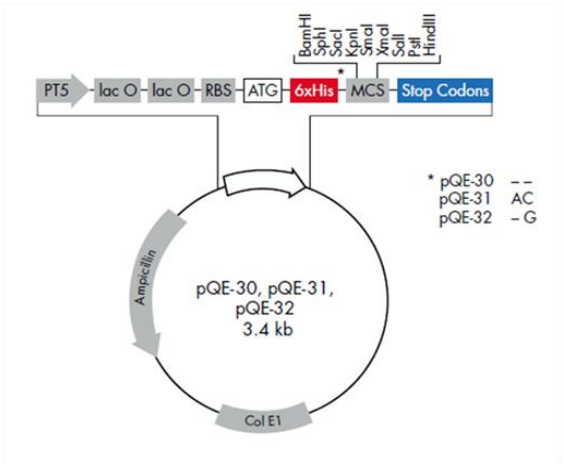
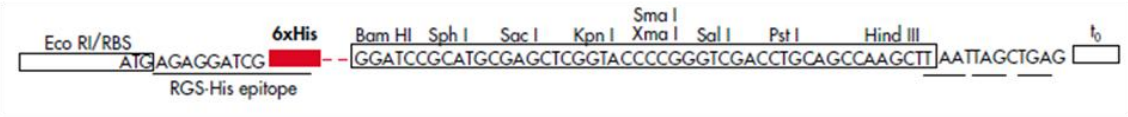


Figura 10. Representación circular del plásmido pQE30.

Se muestran el origen de replicación (ColE1) y el gen bacteriano para la enzima β-lactamasa (AmpR). En el panel superior se muestran los componentes de la unidad transcripcional: el promotor-operador T5/lacO, la secuencia de unión a ribosoma, el sitio de clonaciones múltiple (MCS), la secuencia codificante para el hexámero de histidinas (6xHis) y los codones de inicio y paro. El panel inferior muestra la secuencia del MCS.



codifica para la β-lactamasa, la cual confiere resistencia a ampicilina a las transformantes estables (ver Figura 10).

4.4.3. Oligonucleótidos sintéticos

Para la reacción de PCR, se utilizaron dos oligonucleótidos sintéticos (Eurofins MWG/Operon), los cuales fueron diseñados, utilizando como molde la secuencia del gen *pdi1* de *S. cerevisiae* (GenBank™ NM_001178688), para amplificar la secuencia codificante para el péptido maduro de *Sc*PDI1 (ver Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *Sc*PDI1.

Nombre	Secuencia nucleotidica (5'-3')	Endonuclesa
ScPDIF	acactc*ggatcc*CAACAAGAGGCTGTGGCC	*Bam* HI
ScPDIR	acactc*ctgcag*TTACAATTCATCGTGAATGGC	*Pst* I

4.5. Obtención del gen *Sc*PDI1

4.5.1. Amplificación mediante PCR del gen ScPDI1

1. En un microtubo de 0.5 mL, se preparó una mezca de PCR (ver Tabla 2).

Tabla 2. Mezcla reacción de PCR para amplificar el gen *Sc*PDI1.

Componentes	µL
H_2O destilada estéril	34.5
10X Amortiguador para PCR	5
2.5mM dNTPs	4
10 µM ScPDIF	2
10 µM ScPDIR	2
pCT38 [1-2 ng/µL]	2
Taq ADN polimerasa [5 U/µL]	0.5

2. La reacción fue realizada en un termociclador (*Techne*® PHC3). Las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial (2 min a 94 ºC); 35 ciclos de amplificación exponencial (20 seg a 94 ºC, 20 seg a 55 ºC, 1.5 min a 72 ºC); y 1 ciclo de extensión final (7 min a 72 ºC).
3. Una muestra de 5 µL de la reacción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. Para visualizar el producto, el gel fue teñido con bromuro de etidio (como agente intercalante).

4.5.2. Purificación del producto de PCR ScPDI1

1. El producto de PCR fue mezclado con 5 vol de amortiguador PB.
2. La mezcla fue transferida a una columna *QIAquick*® *spin column* y centrifugada durante 1 min a 13,000 rpm. El efluente fue descartado.

3. La columna fue lavada con 750 µL de amortiguador PE y centrifugada durante 1 min a 13,000 rpm.
4. Los remanentes fueron removidos mediante una centrifugación adicional.
5. El producto de PCR fue recuperado mediante elución con 30 µL de amortiguador EB y centrifugación durante 1 min a 13,000 rpm.
6. 5 µL fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

4.6. Obtención del plásmido pQE30

1. 2 mL de medio LB, suplementado con 150 µg/mL de ampicilina (*Sigma*), fueron inoculados con una colonia bacteriana portadora del plásmido pQE30 (*Qiagen*). El cultivo fue incubado durante la noche a 37 °C y 300 rpm.
2. La pastilla celular fue preparada 1.5 mL del cultivo mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 2min.
3. La pastilla celular fue resuspendida en 250 µL de la solución P1.
4. La suspensión celular fue lisada mediante la adición de 250 µL de la solución P2 y mezclada rápidamente por inversión.
5. Inmediatamente, la mezcla fue neutralizada mediante la adición de 350 µL de la solución N3 y mezclada rápidamente por inversión.
6. La fracción insoluble (proteínas) fue separada mediante centrifugación durante 10 min a 13,000 rpm.
7. El sobrenadante fue transferido a una columna *QIAquick® spin column* y centrifugado durante 1 min a 13,000 rpm. El efluente fue descartado.

8. La columna fue lavada con 500 µL de solución PB y centrifugación durante 1 min a 13,000 rpm. El efluente fue descartado.
9. La columna fue adicionalmente lavada con 750 µL de solución PE y centrifugación durante 1 min a 13,000 rpm. El efluente fue descartado.
10. Los remanentes fueron removidos mediante una centrifugación adicional.
11. El plásmido fue recuperado mediante elución con 100 µL de amortiguador EB y centrifugación durante 1 min a 13,000 rpm.
12. 5 µL fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

4.7. Obtención del plásmido pQYPDI

4.7.1. Digestión endonucleolítica de PPCR ScPDI1 y pQE30

1. Tanto el PPCR *Sc*PDI1 como el plásmido pQE30 fueron digeridos con las endonucleasas *Bam*HI y *Pst*I de acuerdo a las mezclas y procedimientos de la Tabla 3.

Tabla 3. Mezclas y procedimiento de digestión de PPCR *Sc*PDI1 y pQE30.

Componentes	µL	Componentes	µL
PPCR *Sc*PDI1	16	pQE30	16
10X Amortiguador NEB3	2	10X Amortiguador NEB3	2
*Bam*HI (10 U/µL)	1	*Bam*HI (10 U/µL)	1
*Pst*I (10 U/µL)	1	*Pst*I (10 U/µL)	1
2 h a 37 °C		*1.5 h a 37°C*	
		bCIP (1 U/µL)	1
		30 min 37 °C	

2. Posteriormente, los fragmentos de digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.
3. Los fragmentos de tamaño esperado fueron cortados, pesados y conservados en un microtubo.

4.7.2. Purificación de los productos de la digestión endonucleolítica

1. Los fragmentos de gel fueron redisueltos en 3 vol de solución QG (relación 100 mg = 100 µL), mediante incubación a 50 °C durante 10 min. Posteriormente, se añadió 1 vol de isopropanol y se mezcló por inversión.
2. La mezcla fue transferida a una columna *QIAquick® spin column* y centrifugada a 13,000 rpm durante 1 min. El efluente fue descartado.
3. Después, la columna fue lavada con 750 µL de solución PE y centrifugada a 13,000 rpm durante 1 min. El efluente fue descartado.
4. Los remanentes fueron removidos mediante una centrifugación adicional.
5. El plásmido fue recuperado mediante elución con 30 µL de amortiguador EB y centrifugación durante 1 min a 13,000 rpm.
6. 5 µL fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

4.7.3. Construcción del plásmido pQYPDI

1. Los fragmentos PPCR *Sc*PDI1/*Bam*HI-*Pst*I y pQE30/*Bam*HI-*Pst*I fueron mezclados y ligados de acuerdo a la Tabla 4.
2. La mezcla fue incubada durante 4 h a temperatura ambiente.

Tabla 4. Mezcla de reacción para la ligación y construcción de pQYPDI.

Componentes	µL
PPCR *Sc*PDI1/*Bam*HI-*Pst*I	6
pQE30//*Bam*HI-*Pst*I	2
10X Amortiguador de ligasa	1
T4 ADN ligasa (1 U/µL)	1

4.7.4. Transformación bacteriana.

1. 5 µL de la ligación fueron mezclados con 100 µL de una suspensión de células termocompetentes. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min.
2. Enseguida, la mezcla se incubó a 42 °C durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo durante 5 min.
3. Las células fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de medio 2X YT e incubación durante 30 min a 37 °C.
4. 100 y 900 µL de las células transformadas fueron sembradas en cajas con medio LB agar, suplementado con 150 µg/mL de ampicilina.
5. Los cultivos fueron incubados durante la noche a 37 °C.

4.7.5. Selección y análisis de transformantes estables

1. Al día siguiente de la transformación bacteriana, aleatoriamente se seleccionaron 7 ufc y se inocularon en 2 mL de medio LB liquido, suplementado con 150 µg/mL de ampicilina.
2. Los cultivos se incubaron durante la noche a 37 °C, con agitación (300 rpm).

3. Posteriormente, el ADN plasmídico fue purificado utilizando el estuche comercial *QIAprep™ Spin Miniprep Kit* (Qiagen), siguendo las recomendaciones del proveedor (ver sección 4.6.).
4. Los plásmidos purificados fueron analizados mediante digestión con 5 U de las endonucleasas *Bam*HI y *Pst*I y electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.
5. Los plásmidos que presentaron el patrón esperado; es decir, liberaron un fragmento correspondiente al gen *Sc*PDI1, fueron considerados como positivos (pQYPDI).

4.7.6. Caracterización molecular de pQYPDI.

1. Los plásmidos pQYPDI fueron caracterizados mediante restricción con las endonucleasas *Eco*RV, *Hind*III, *Hpa*I (*New England Biolabs*): mezclas conteniendo 5U enzimáticas y 400-500 ng de plásmido fueron preparadas en la solución amortiguadora recomendada por el proveedor.
2. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo durante 1 h a 37 °C.
3. Los fragmentos de digestión fueron separados y analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.
4. El patrón de restricción obtenido fue comparado con el esperado.

4.8. Análisis de expresión de la proteína recombinante *Sc*PDI1

4.8.1. Preparación de cultivos analíticos

1. Cultivos semilla fueron preparados mediante la adición de 2 mL de medio LB, suplementado con 150 µg/mL de ampicilina, a tubos que contenían 0.5 mL de

células que portaban el plásmido pQYPDI. Los cultivos fueron incubados durante la noche a 37 °C, con agitación (300 rpm).

2. Al día siguiente, se preparó un cultivo de inducción de la siguiente manera: 80 µL del cultivo joven fueron inoculados en 4 mL de medio LB, suplementado con 150 µg/mL de ampicilina.
3. Los cultivos fueron incubados durante 2 h a 37 °C, con agitación (300 rpm).
4. Posteriormente, se prepararon fracciones de 2 mL de cada cultivo pre-inducido. Una fracción se mantuvo tal cual (sin inductor, SI) y la otra fue suplementada con 2 µL de 1 M IPTG (isopropil-ß-D-1-tiogalactopiranósido, *Sigma*) (con inductor, CI).
5. Las fracciones fueron incubadas durante 4 h a 37 °C y agitación (300 rpm), para permitir la expresión proteica.

4.8.2. Obtención de lisados bacterianos totales

1. 1 mL de cultivo, de cada fracción SI y CI, fue transferido a un microtubo.
2. La pastilla celular fue separada mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 2 min. El sobrenadante fue removido.
3. La pastilla celular fue resuspendida en 100 µL de agua destilada y 100 µL de una solución de carga 2X para SDS-PAGE (10% glicerol, 2.5% SDS, 50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 5% β-mercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol) [Laemmli, 1970].
4. Las muestras fueron desnaturalizadas a 95º C durante 10 min y, posteriormente, analizadas mediante SDS-PAGE.

4.8.3. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

1. Las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), siguiendo un protocolo estándar de laboratorio [Laemmli, 1970].
2. El gel de poliacrilamida fue preparado en sistema *Mini-Protean*® III (*Biorad*), siguiendo las instrucciones recomendadas por el proveedor.
    a. Para la preparación del gel separador al 12%, se mezclaron los siguientes componentes: *upper buffer*, 1.5 mL; sol. de acrilamilamida al 30%, 2.4 mL; agua desionizada, 2.1 mL; persulfato de amonio al 25%, 0.01 mL; TEMED (Biorad), 0.005 mL.
    b. Para la preparación del gel concentrador al 4%, se mezclaron los siguientes componentes: *lower buffer*, 0.63 mL; sol. de acrilamilamida al 30%, 0.33 mL; agua desionizada, 1.54 mL; persulfato de amonio al 25%, 0.005 mL; TEMED (Biorad), 0.0025 mL.
3. 10 µL de muestra fueron cargados y separados mediante electroforesis.
4. Durante el paso de las proteínas por las dos fases del gel, la migración electroforética se realizó a 80 V (gel concentrador) y 120 V (gel separador).
5. La electroforesis de detuvo a las 2 h o hasta que el colorante salió del gel.
6. Las proteínas fueron teñidas durante 1 h en sol. de *Coomassie* (25% isopropanol, 10% ácido acético, 0.2% azul de Coomassie R-250) y desteñidas durante la noche en sol. alcohol-ácida (10% isopropanol, 10% ácido acético).

4.9. Expresión y purificación de la proteína recombinante ScPDI1.

4.9.1. Preparación de cultivos preparativos

1. 2 mL de medio LB, suplementado con 150 µg/mL de ampicilina, fue inoculado con 10 µL de una suspensión celular que porta el plásmido pQYPDI y expresa la proteína *Sc*PDI1 recombinante.El cultivo fue incubado durante la noche a 37 °C, con agitación (300 rpm).
2. Al día siguiente, 100 mL de medio LB, suplementado con 150 µg/mL de ampicilina, fue inoculado con 2 mL del cultivo joven (dilución 1:50). El cultivo fue incubado durante 2 h a 37 °C, con agitación (300 rpm).
3. Posteriormente, la expresión proteica fue inducido mediante la adición de 10 µL de 1 M IPTG (concentración final 0.1 mM). El cultivo fue incubado durante 4 h a 37 °C y agitación (300 rpm).
4. La pastilla celular fue recuperada mediante centrifugación a 4,500 rpm durante 15 min (10 °C) y conservada en congelación.

4.9.2. Obtención de lisados bacterianos preparativos

1. La pastilla celular, descongelada a temperatura ambiente, fue resuspendida en 5 mL de sol. *CelLytic*® B (Sigma).
2. La lisis fue favorecida mediante la adición de 100 µL de lisozima (10 mg/mL), 2 µL de benzonasa (250 U/µL) y 50 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas.
3. Posteriormente, la mezcla fue agitada levemente (*rocking*) durante 30-60 min.

4. El lisado bacteriano fue recuperado mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 15 min. Los restos celulares fueron descartados y el sobrenadante fue conservado en refrigeración.

4.9.3. Purificación de ScPDI1 mediante cromatografía de afinidad a níquel

1. La proteína recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad a níquel, en condiciones nativas, siguiendo un protocolo estándar (*The QIAexpressionist® Manual*, *Qiagen*).
2. Las soluciones para la purificación fueron preparadas como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Soluciones para purificar la proteína recombinante *Sc*PDI1 mediante cromatografía de afinidad a níquel, en condiciones nativas.

Componentes	Lavado (mL)	Elución (mL)	[Final]
1 M Tris-HCl, pH 8.0	5	1	0.10 M
3 M NaCl	5	1	0.30 M
2.5 M Imidazol, pH 8.0	0	1	0.25 M
H_2O desionizada	40	7	Cbp

3. A una columna de cromatografía con 1 mL de resina agarosa-NTA-Ni (*Qiagen*) fue lavada con 5 mL de solución de lavado.
4. Enseguida, la columna fue cargada con el lisado bacteriano total y, posteriormente, lavada con 10 mL de solución de lavado.
5. Finalmente, la proteína recombinante fue recuperada con 5 mL de solución de elución y recolectada en fracciones de 0.5 mL.

6. Para el seguimiento de la cromatografía, se colectaron muestras del lisado bacteriano total (LBT), de la fracción no pegada (FNP), del lavado (W), y de las 6 primeras eluciones (E1-E6).
7. Las muestras fueron mezcladas con un volumen de 2X amortiguador de carga para SDS-PAGE, desnaturalizadas durante 10 min a 95 ºC y analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (ver sección 4.8.3.).
8. Las fracciones con mayor concentración de la proteína *Sc*PDI1 fueron mezcladas y conservadas en refrigeración.

4.9.4. Purificación de ScPDI1 mediante cromatografía de exclusión molecular

1. La proteína recombinante fue purificada mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna PD-10 (*Sephadex*® G-25, *Pharmacia*), siguiendo un protocolo proporcionado por el proveedor.
2. La columna fue lavada con 25 mL de una solución 20 mM Tris-HCl, pH 8.0.
3. Enseguida, la muestra fue cargada y el efluente fue descartado.
4. La fracción proteica fue eluída con 3.5 mL de solución 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) y el efluente fue recolectado.

4.9.5. Cuantificación de la proteína recombinante ScPDI1

1. La concentración de proteína fue calculada mediante espectroscopía UV, considerando el coeficiente de extinción molar calculado (ε_{280} = 49,655 M^{-1} cm^{-1}; 0.86 mg/mL) (*ProtParam Tools*, *www.expasy.ch/tools/protparam.html*).

2. La proteína fue diluida 1:20, usando agua destilada estéril como diluyente.
3. La absorbancia a 280 fue registrada (por duplicado) y la media fue sustituida en la ecuación de Lambert-Beer ($C = {A}/{\varepsilon}$).

4.10. Análisis de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 recombinante

4.10.1. Evaluación de la actividad enzimática

1. Se utilizaron preparaciones purificadas de *Sc*PDI1 (20.54 µM) y *Eh*PDI (40.965 µM). Además, se preparó una solución 5 µM *Sc*PDI1.
2. Una solución de insulina de bovino (*Sigma*), a una concentración de 1.744 mM, fue preparada en 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). A partir de ésta, se preparó una solución 1 mM insulina. También se obtuvo una solución de insulina recombinante humana (0.783 mM) (*Humulin*® R, *Eli Lilly & Co*).
3. A partir de soluciones concentradas, se prepararon las siguientes soluciones: 0.2 M NaH_2PO_4, pH 7.0; 0.2 M EDTA, pH 8.0; y 6 mM DTT (ditiotreitol).
4. Una mezcla de sustrato (MS) fue preparada como se muestra en la siguiente tabla.

Componentes	µL
0.2 M NaH_2PO_4, pH 7.0	350
0.2 M EDTA, pH 8.0	7
1.744 mM Insulina	52.5
H_2O destilada	80.5

5. En una microplaca, se prepararon 6 mezclas de reacción, como se muestra en la siguiente tabla (volúmenes en µL).

Pocillo	MS	H_2O Destilada	20.54 µM *Sc*PDI1	40.965 µM *Eh*PDI	6 µM DTT	PDI [µM]
A	70	30	-	-	-	**-**
B	70	25	-	-	5	**0.0**
C	70	20.1	4.9	-	5	**0.1**
D	70	15.2	9.8	-	5	**0.2**
E	70	22.5	-	2.5	5	**0.1**
F	70	20	-	5	5	**0.2**

6. Las reacciones se llevaron a cabo en 100 µL; sin embargo, el DTT se añadió al final (debido a que es el iniciador de la reacción). Las concentraciones finales en cada pocillo fueron: 0.1 M NaH_2PO_4, pH 7.0; 2 mM EDTA; 131 µM insulina; 0.3 mM DTT; y 1 ó 2 µM de cada PDI. Los pocillos A y B corresponden al blanco y el control de reducción química, respectivamente.
7. Inmediatamente, la microplaca se colocó en un lector y se registraron los valores de absorbancia a 650 nm (A_{650}). La cinética de actividad reductasa fue registrada durante 90 min, con lecturas cada 10 min.
8. La actividad reductasa específica fue valorada considerando la pendiente de la cinética y la cantidad de enzima PDI utilizada en el ensayo.

4.10.2. Efecto de la concentración de enzima

1. Una mezcla de sustrato (MS) fue preparada como se muestra en la siguiente tabla de la derecha.

Componentes	µL
0.2 M NaH_2PO_4, pH 7.0	450
0.2 M EDTA, pH 8.0	9
1.744 mM Insulina	67.5
H_2O destilada	103.5

2. En una microplaca, se prepararon 8 mezclas de reacción, como se muestra en la siguiente tabla (volúmenes en µL).

Pocillo	MS	H_2O destilada	5 µM *Sc*PDI1	6 µM DTT	*Sc*PDI1 [µM]
A	70	30	-	-	**-**
B	70	25	0	5	**0.0**
C	70	23	2	5	**0.1**
D	70	21	4	5	**0.2**
E	70	19	6	5	**0.3**
F	70	17	8	5	**0.4**
G	70	15	10	5	**0.5**
H	70	13	12	5	**0.6**

3. Concentraciones finales en cada pocillo: 0.1M NaH_2PO_4, pH 7.0; 2 mM EDTA; 131 µM insulina; 0.3 mM DTT; y 0 – 0.6 µM *Sc*PDI1. Los pocillos A y B corresponden al blanco y el control de reducción química, respectivamente.
4. La cinética de reacción y la determinación de actividad reductasa se realizó tal como en la sección 4.10.2.
5. A partir de los resultados de tres ensayos independientes, se calculó la EC_{50} (graficando la actividad reductasa en relación a la concentración de *Sc*PDI1, usando el programa *Prism*® v4.03 (*GraphPad Software Inc.).*

4.10.3. Efecto de la concentración de sustrato

1. Una mezcla de enzima (ME) fue preparada como se muestra en la siguiente tabla.

Componentes	µL
0.2 M NaH_2PO_4, pH 7.0	450
0.2 M EDTA, pH 8.0	9
20.54 µM *Sc*PDI1	13.5
H_2O destilada	112.5

2. En una microplaca, se prepararon 8 mezclas de reacción, como se muestra en la siguiente tabla (volúmenes en µL).

Pocillo	ME	H_2O destilada	1 mM Insulina	6 µM DTT	*Sc*PDI1 [µM]
A	65	35	-	-	**-**
B	65	30	0	5	**0**
C	65	25	5	5	**50**
D	65	20	10	5	**100**
E	65	15	15	5	**150**
F	65	10	20	5	**200**
G	65	5	25	5	**250**
H	65	-	30	5	**300**

3. Las concentraciones finales en cada pocillo fueron: 0.1M NaH_2PO_4, pH 7.0; 2 mM EDTA, pH 8.0; 0.3 µM *Sc*PDI1; 0.3 mM DTT; y 0 – 300 µM insulina. El pocillo A corresponde al blanco.
4. La cinética de reacción y la determinación de actividad reductasa se realizó tal como en la sección 4.10.2.
5. A partir de los resultados de tres ensayos independientes, se calcularon los parámetros K_m, V_{max}, y K_{cat} (graficando la actividad reductasa en relación a la concentración de insulina, usando el programa *Prism*® v4.03 (*GraphPad Software Inc.).*

4.10.4. Efecto del pH

1. Una solución amortiguadora universal (1 M), fue preparada conteniendo ácido cítrico, NaH_2PO_4, Tris base, y Na_2CO_4 (pH 5.28).
2. A partir de la solución amortiguadora universal, se prepararon soluciones 0.1 M a diferentes valores de pH (4 – 10), ajustando con 6 N HCl o 10 M NaOH.
3. Para cada valor de pH, se preparó una solución (AU) como se muestra en la siguiente tabla.

Componentes	µL
0.1 M AU, pH X	250
0.2 M EDTA, pH 8	5
H_2O destilada	145

4. En una microplaca, se prepararon 4 mezclas, tal como se indica en la siguiente tabla (volúmenes en µL).

Posillo	AU	H_2O destilada	783 µM Insulina	20.54 µM *Sc*PDI	6 mM DTT
A (pH X)	80	0.7	12.8	1.5	5
B (BCO)	80	15.0	-	-	5
C (CTL1)	80	2.2	12.8	-	5
D (CTL2)	80	13.5	-	1.5	5

5. Las concentraciones finales en cada pocillo fueron: 0.05 M amortiguador universal, pH X; 2 mM EDTA; 100 µM insulina; 0.3 mM DTT; y 0.3 µM *Sc*PDI1. El pocillo B corresponde al blanco, en tanto que C y D corresponden a los controles de efecto del pH sobre insulina y ScPDI1, respectivamente.
6. La cinética de reacción y la determinación de actividad reductasa se realizó tal como en la sección 4.10.2.

7. A partir de los resultados de tres ensayos independientes, se determino el efecto del pH sobre la actividad reductasa (graficando la actividad reductasa en relación al valor de pH, usando el programa *Prism*® v4.03 (*GraphPad Software Inc.).*

4.11. Análisis de inhibición de la actividad reductasa de *Sc*PDI1

4.11.1. Bacitracina como inhibidor

1. Se prepararon dos mezclas: inhibición (CI) y control (SI). Los componentes y concentraciones se muestran en la siguiente tabla (volúmenes en µL).

Componentes	CI	SI	[Final]
20.54 µM ScPDI	4.9	4.9	**1 µM**
6.76 mM Bacitracina	14.8	-	**1 mM**
H2O desilada	80.3	95.1	**cbp**

2. La reacción de inhibición se llevó a cabo durante 30 min a temperatura ambiente.
3. Una mezcla de sustrato (MS) fue preparada como se muestra en la tabla de la derecha.

Componentes	µL
200 mM NaH_2PO_4, pH 7.0	450
200 mM EDTA, pH 8.0	9
783 µM Insulina	115.2
H_2O destilada	10.8

4. La actividad reductasa remanente fue determinada por triplicado en una microplaca. Las mezclas se muestran en la siguiente tabla (volúmenes en µL).

Pocillo	MS	H_2O destilada	CI	SI	6 mM DTT
A	65	35	-	-	-
B	65	30	-	-	5
C	65	-	30	-	5
D	65	-	30	-	5
E	65	-	30	-	5
F	65	-	-	30	5
G	65	-	-	30	5
H	65	-	-	30	5

9. Las concentraciones finales en cada pocillo fueron: 0.1M NaH_2PO_4, pH 7.0; 2 mM EDTA; 100 µM insulina; 0.3 mM DTT; y 0.3 µM *Sc*PDI1.Los pocillos A y B corresponden al blanco y el control de reducción química, respectivamente.
10. La cinética de reacción y la determinación de actividad reductasa se realizó tal como en la sección 4.10.2.
11. La actividad inhibitoria específica fue valorada considerando la pendiente de la cinética enzimática remanente.

4.11.2. Efecto de la concentración de bacitracina

1. Se prepararon mezclas de inhibición como se muestra en la siguiente tabla (volúmenes en µL).

Componentes	A	B	C	D	E	F
20.54 µM *Sc*PDI1	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9
6.76 mM Bacitracina	0	4	8	12	20	40
H_2O destilada	95.1	91.1	87.1	83.1	75.1	55.1
Bacitracina [mM]	**0**	**0.27**	**0.54**	**0.81**	**1.35**	**2.7**

2. La reacción de inhibición se llevó a cabo durante 30 min a temperatura ambiente.
3. La mezcla de sustrato (MS) fue preparada como se muestra en la siguiente tabla.

Componentes	µL
200 mM NaH_2PO_4, pH 7.0	1050
200 mM EDTA, pH 8.0	21
783 µM Insulina	268.8
H_2O destilada	25.2

4. La actividad reductasa remanente fue determinada por triplicado en una microplaca. Las mezclas se muestran en la siguiente tabla (volúmenes en µL).

Pocillo	MS	H_2O destilada	A	B	C	D	E	F	6 mM DTT
A	65	35	-	-	-	-	-	-	-
B	65	30	-	-	-	-	-	-	5
C	65	-	30	-	-	-	-	-	5
D	65	-	-	30	-	-	-	-	5
E	65	-	-	-	30	-	-	-	5
F	65	-	-	-	-	30	-	-	5
G	65	-	-	-	-	-	30	-	5
H	65	-	-	-	-	-	-	30	5

5. Las concentraciones finales en cada pocillo fueron: 0.1M NaH_2PO_4, pH 7.0; 2 mM EDTA; 100 µM insulina; 0.3 mM DTT; 0.3 µM *Sc*PDI1. Los pocillos A y B corresponden al blanco y el control de reducción química, respectivamente.
6. La cinética de reacción y la determinación de actividad reductasa se realizó tal como en la sección 4.10.2.
7. A partir de los resultados, se determinó el efecto de bacitracina sobre la actividad reductasa (graficando la actividad reductasa en relación a la

concentración de inhibidor, usando el programa *Prism*® v4.03 (*GraphPad Software Inc.).*

4.12. Análisis de la función como chaperona de *Sc*PDI1

4.12.1. Ensayo de protección insulina

1. En una microplaca, se prepararon mezclas de protección de insulina, por duplicado, como se muestra en la siguiente tabla (volúmenes en µL).

Componentes	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
0.2 M NaH_2PO_4, pH 7	5	5	5	5	5	5	5	5
1 M NaCl	10	10	10	10	10	10	10	10
783 µM Insulina	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8
20.54 µM *Sc*PDI1	-	-	1.2	2.5	4.9	9.8	19.6	39.2
0.5 M DTT	-	4	4	4	4	4	4	4
H_2O destilada	72.2	68.2	67	65.7	63.3	58.4	48.6	29
***Sc*PDI1 [µM]**	**-**	**0**	**0.25**	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**8**

2. Las reacciones se llevaron a cabo en 100 µL, a temperatura ambiente; sin embargo, el volumen de DTT se añadió al final (debido a que es el iniciador de la reacción). Las concentraciones finales en cada pocillo fueron: 10 mM NaH_2PO_4, pH 7; 2 100 mM NaCl; 100 µM insulina; y 20 mM DTT. El pocillo A corresponde al blanco.
3. Inmediatamente, la microplaca se colocó en un lector y se registraron los valores de absorbancia a 650 nm (A_{650}). La cinética de actividad chaperona fue registrada durante 60 min, con lecturas cada 10 min.
4. La actividad chaperona fue valorada considerando el valor máximo de precipitación, graficando la A_{650} en relación a la concentración de *Sc*PDI1,

usando el programa *Prism*® v4.03 (*GraphPad Software Inc.).* A partir de los resultados, se calculó el porcentaje de protección de insulina como valor específico de la actividad chaperona.

4.12.2. Efecto de vancomicina sobre la función chaperona

1. En una microplaca, se prepararon mezclas de inhibición de la actividad chaperona, por duplicado, como se muestra en la siguiente tabla (volúmenes en µL).

Componentes	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
0.2 M NaH_2PO_4, pH 7	5	5	5	5	5	5	5	5
1 M NaCl	10	10	10	10	10	10	10	10
783 µM Insulina	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8
20.54 µM *Sc*PDI1	-	-	19.6	19.6	19.6	19.6	19.6	19.6
5.05 Vancomicina	-	-	-	1	2	3	4	6
0.5 M DTT	-	4	4	4	4	4	4	4
H_2O destilada	72.2	68.2	48.6	47.6	46.6	45.6	44.6	42.6
Vancomicina [µM]	**-**	**-**	**-**	**50.5**	**101**	**151.5**	**202**	**303**

2. Las reacciones se llevaron a cabo en 100 µL, a temperatura ambiente; sin embargo, el volumen de DTT se añadió al final (debido a que es el iniciador de la reacción). Las concentraciones finales en cada pocillo fueron: 10 mM NaH_2PO_4, pH 7; 2 100 mM NaCl; 100 µM insulina; 4 µM *Sc*PDI1; y 20 mM DTT. El pocillo A corresponde al blanco, en tanto B y C corresponden a los controles 0 y 100% de actividad chaperona, respectivamente.
3. Inmediatamente, la microplaca se colocó en un lector y se registraron los valores de absorbancia a 650 nm (A_{650}). La cinética de actividad chaperona fue registrada durante 60 min, con lecturas cada 10 min.

4. La actividad chaperona remanente fue valorada considerando el valor máximo de precipitación, graficando la A_{650} en relación a la concentración de *Sc*PDI1, usando el programa *Prism*® v4.03 (*GraphPad Software Inc.).* A partir de los resultados, se calculó el porcentaje de inhibición de la actividad chaperona.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

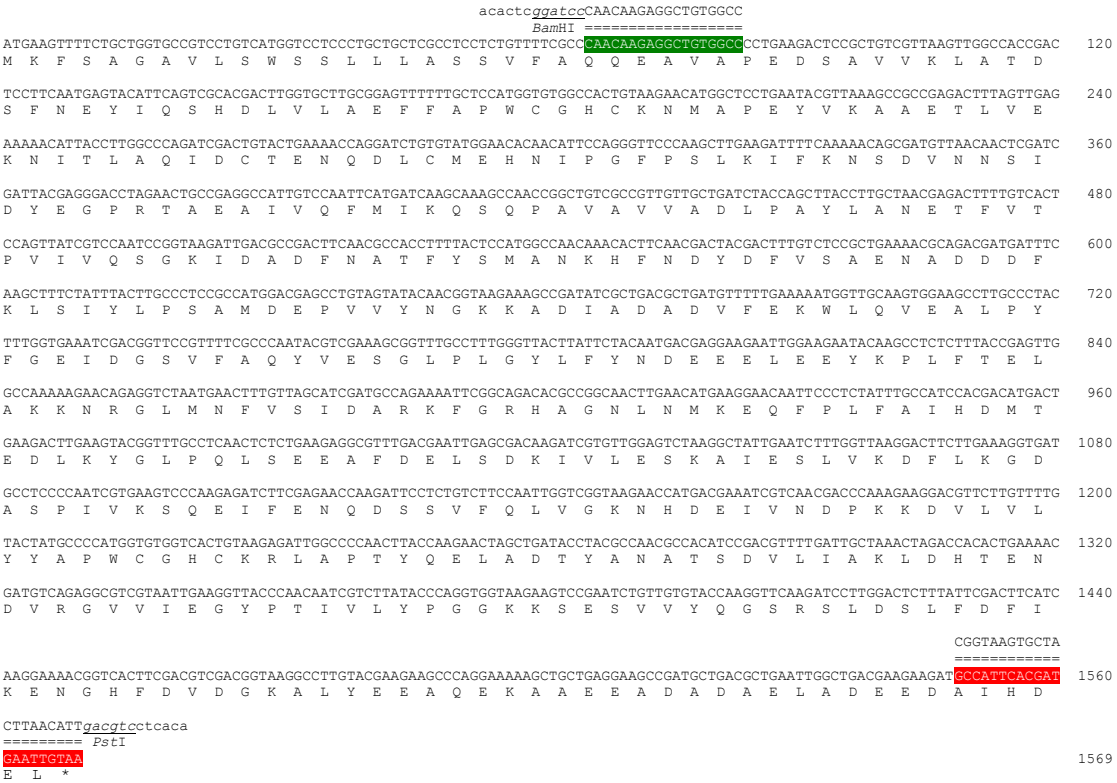


Figura 11. Secuencia nucleotídica y polipeptídica de la enzima PDI1 de *S. cerevisiae*.

Las regiones de hibridación de los oligonucleótidos sintéticos se muestran en cajas coloridas: verde, sentido; rojo, anti-sentido. Además, se muestra la secuencia de los oligonucleótidos y los adaptadores (itálicas).

5.1. El gen pdi1 de levadura, codificante para *Sc*PDI1

El gen de levadura codificante para *Sc*PDI1 (NCBI No. NM_001178688) fue utilizado como molde para el diseño de oligonucleótidos sintéticos (Figura 11).

5.2. Clonación de la secuencia nucleotídica codificante para *Sc*PDI1

La secuencia nucleotídica codificante para el péptido maduro de la enzima proteína disulfuro isomerasa de *S. cerevisiae* (*Sc*PDI1) fue amplificada mediante PCR a partir del plásmido pCT38 [Tachibana y Stevens, 1992]. Como se indica en la Figura 12, un fragmento del tamaño esperado (1,569 pb) fue amplificado, el cual fue purificado posteriormente. El producto de PCR *Sc*PDI1 fue digerido con las endonucleasas *Bam*HI y *Pst*I, y clonado en los mismos sitios del plásmido de expresión bacteriana pQE30, usando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4.

El producto de la ligación fue utilizado para transformación bacteriana (*E. coli* XL1-Blue MRF'). A partir de una décima parte de la transformación, se obtuvieron 73 (ufc) transformantes estables. De éstas, se seleccionaron aleatoriamente 7 colonias y se purificó el plásmido, Como análisis inicial, se realizó un ensayo de

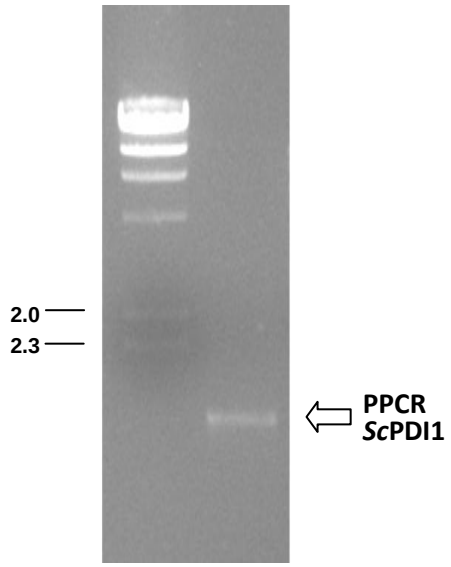


Figura 12. Separación electroforética del producto de PCR *Sc*PDI1.

Gel de agarosa al 2.5%. *λ-HindIII DNA Ladder.* Tallas moleculares en Kb.

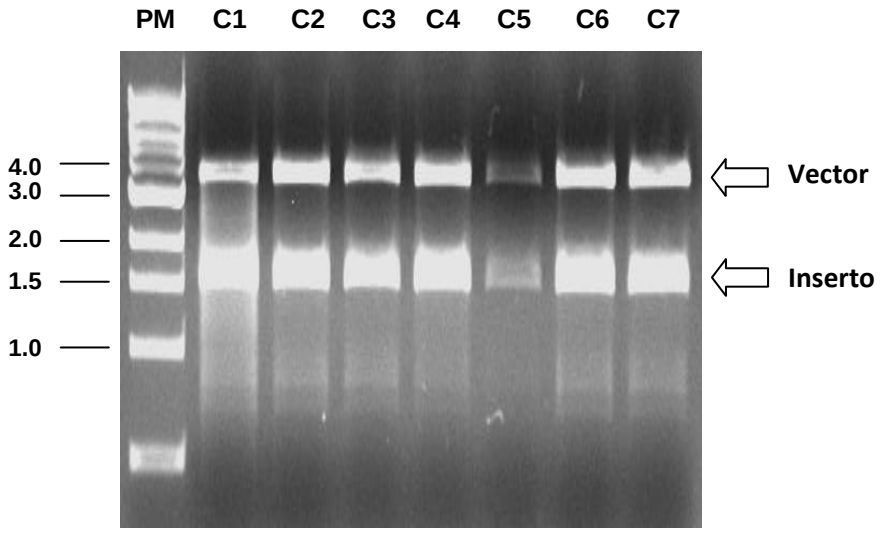


Figura 13. Separación electroforética de los productos de digestión para la liberación del inserto (*Sc*PDI1) de 7 clonas estables (C1-C7).

Gel de agarosa al 2.5%. *1Kb DNA Ladder.* Tallas moleculares en Kb.

liberación endonucleolítica del inserto (*Sc*PDI1), usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I. Como se observa en la Figura 13, todas las ufc analizadas poseen el patrón de restricción esperado; es decir, liberan el inserto (*Sc*PDI1), por lo tanto, fueron consideradas como clonas positivas (portadoras del plásmido pQYPDI).

5.3. Caracterización molecular de pQYPDI

La caracterización del plásmido pQYPDI de 4 clonas positivas (C1-C4) se realizó con las endonucleasas *Eco*RV (1), *Hind*III (2), y *Hpa*II (3). Mediante un análisis *in silico*, se determinaron los fragmentos de digestión esperados (*Eco*RV: 4936 pb; *Hind*III: 3676, 937, 283 pb; *Hpa*II: 963, 764, 538, 527, 408, 404, 242, 236, 190, 147, 128, 110, 76, 67, 42, 34, 34, 26 pb). Como se infiere de la Figura 14, las 4 clonas exhiben un patrón de restricción similar y concordante con el esperado.

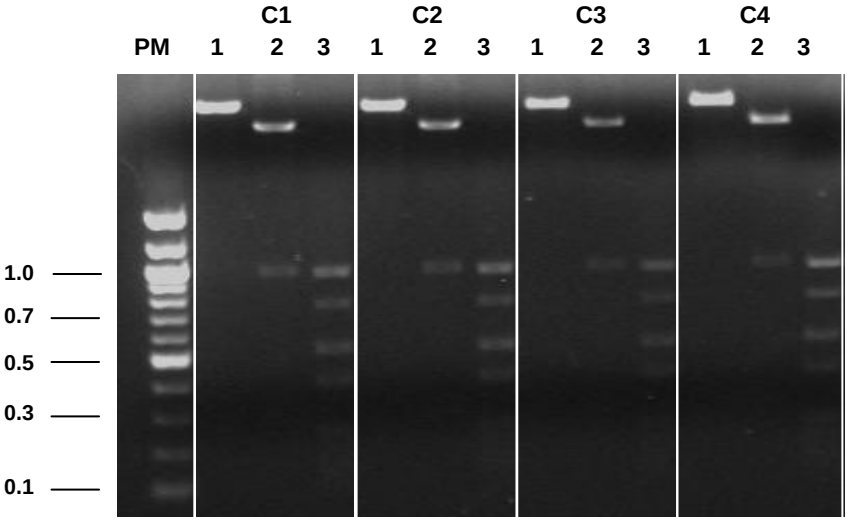


Figura 14. Separación electroforética de los productos de digestión para la caracterización del inserto (*Sc*PDI1) de 4 clonas estables (C1-C4).

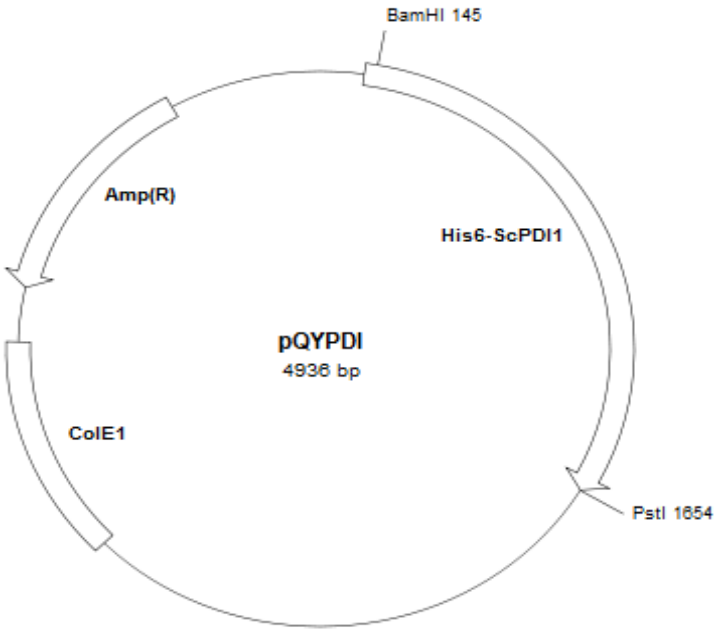
Gel de agarosa al 2.5%. *100-bp DNA Ladder*. Tallas moleculares en Kb.

5.4. pQYPDI, el plásmido de expresión de *Sc*PDI1

Mediante el uso de herramientas de bioinformática, se realizó un análisis *in silico* del plásmido pQYPDI (ver Figura 15). La secuencia del gen *pdi1* de S. cerevisiae se encuentra fusionada (en fase) a la secuencia codificante para el hexámero de histidinas. El control de la expresión está regulado por la fusión T_5/*lacO*. Teóricamente, ScPDI1 recombinante es de aprox. 57 KDa.

5.5. Expresión y purificación de la proteína recombinante ScPDI1

Inicialmente, los estudios de expresión analítica (pequeña escala) fueron realizados utilizando 4 clonas (C1-C4). La expresión de *Sc*PDI1 recombinante fue



MRGSHHHHHH GSQQEAVAPE DSAVVKLATD SFNEYIQSHD LVLAEFFAPW CGHCKNMAPE 60
YVKAAETLVE KNITLAQIDC TENQDLCMEH NIPGFPSLKI FKNSDVNNSI DYEGPRTAEA 120
IVQFMIKQSQ PAVAVVADLP AYLANETFVT PVIVQSGKID ADFNATFYSM ANKHFNDYDF 180
VSAENADDDF KLSIYLPSAM DEPVVYNGKK ADIADADVFE KWLQVEALPY FGEIDGSVFA 240
QYVESGLPLG YLFYNDEEEL EEYKPLFTEL AKKNRGLMNF VSIDARKFGR HAGNLNMKEQ 300
FPLFAIHDMT EDLKYGLPQL SEEAFDELSD KIVLESKAIE SLVKDFLKGD ASPIVKSQEI 360
FENQDSSVFQ LVGKNHDEIV NDPKKDVLVL YYAPWCGHCK RLAPTYQELA DTYANATSDV 420
LIAKLDHTEN DVRGVVIEGY PTIVLYPGGK KSESVVYQGS RSLDSLFDFI KENGHFDVDG 480
KALYEEAQEK AAEEADADAE LADEEDAIHD EL 512

PM: 57.371 KDa; pI: 4.50; Coef. de Extinción (280 nm) = 49,655 M^{-1} cm^{-1}; Abs (1 mg/mL, 280 nm) = 0.866.

Figura 15. Representación circular del plásmido pQYPDI, secuencia polipeptídica de la proteína recombinante ScPDI1 y algunas de sus propiedades fisicoquímicas

inducida por IPTG (Figura 16). Los resultados muestran una banda de 57 KDa (tamaño esperado para la *Sc*PDI1 recombinante) en los carriles correspondientes a los cultivos inducidos, la cual no se observó en ausencia del inductor.

Posteriormente, *Sc*PDI1 recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad níquel a partir de lisados totales bacterianos a partir de una pastilla de 500 mL de cultivo inducido con 0.1 mM de IPTG. Una muestra de cada fracción cromatográfica fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

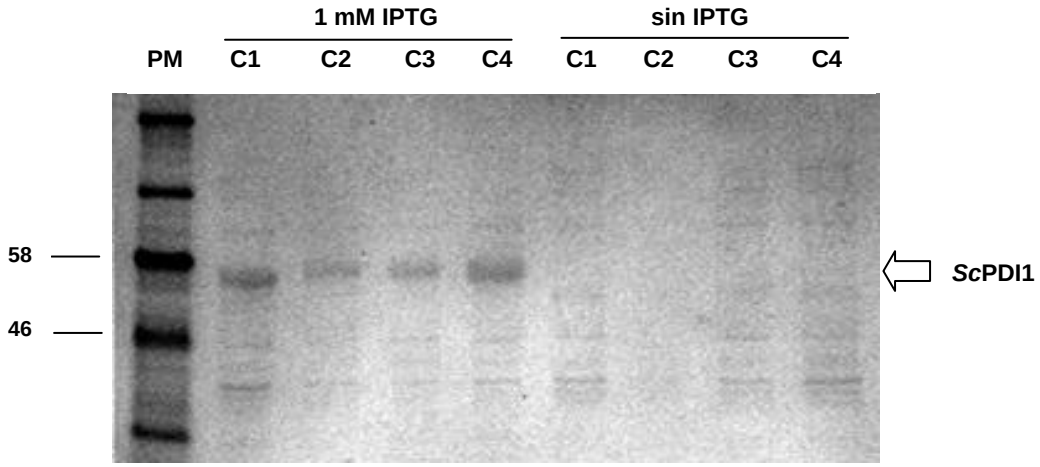


Figura 16. Separación electroforética de proteínas de los lisados bacterianos totales de 4 clonas (C1-C4) de expresión de la proteína recombinante *Sc*PDI1.

Gel de SDS/poliacrilamida al 12%. *Prestained Protein Marker, Broad Range*. Tallas moleculares en KDa.

Como se nota en la Figura 17, en las eluciones E1 y E2 se recupera suficiente proteína *Sc*PDI1 recombinante; sin embargo, también se observa en la fracción NP. Por tal motivo, y para aumentar la eficiencia de la recuperación, se realizaron dos corridas cromatográficas por cada lisado total bacteriano.

Finalmente, a partir de 5 mL de una solución conteniendo la proteína *Sc*PDI1 purificada, dos lotes (2.5 mL cada uno) fueron purificados mediante cromatografía de exclusión molecular. La proteína *Sc*PDI1 recombinante fue recuperada y cuantificada, obteniéndose preparaciones de 20.54 y 18.52 µM, respectivamente.

5.6. Análisis de la actividad reductasa de *Sc*PDI1

La actividad reductasa fue valorada utilizando un ensayo turbidimétrico estándar que se basa en el aumento de la turbidez (A_{650}) ocasionado por la

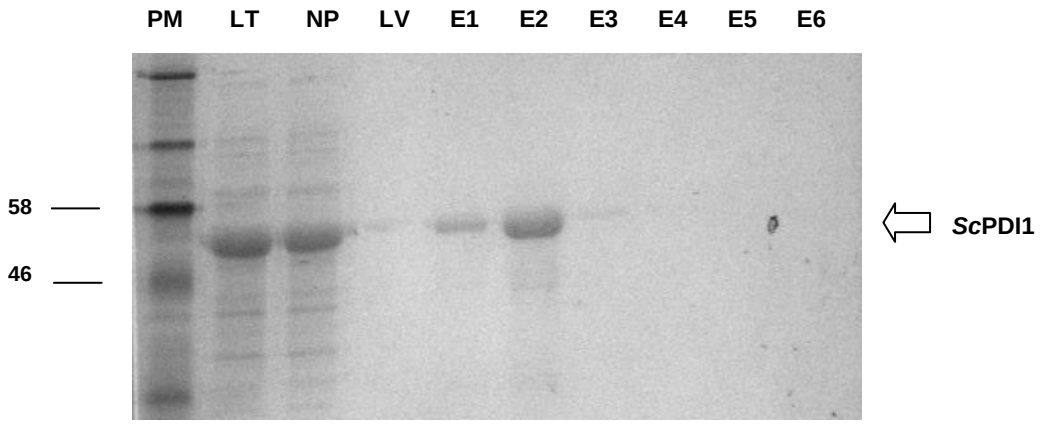


Figura 17. Separación electroforética y análisis de las fracciones colectadas durante la purificación de la *Sc*PDI1 recombinante mediante cromatografía de afinidad a níquel.

Gel de SDS/poliacrilamida al 12%. *Pre-stained Protein Marker, Broad Range*. Tallas moleculares en KDa. LT, lisado total; NP, no pegado; LV, lavado; E, elución.

precipitación de la cadena B de insulina, por acción de la reducción de los enlaces disulfuro que contienen esta molécula.

Inicialmente, se determinó la actividad reductasa de *Sc*PDI1 mediante un análisis comparativo con la PDI amibiana (*Eh*PDI). Como se muestra en la Tabla 6 (ver Anexo) y la Figura 18, la enzima *Sc*PDI1 exhibe actividad reductasa comparable con la observada para *Eh*PDI; sin embargo, es de notar una saturación temprana en la cinética de reducción asistida por *Sc*PDI1, lo que se puede interpretar como interferencia por actividad chaperona. Aun con este efecto, se calculó una actividad reductasa específica (aparente) de 3.6×10^{-3} UA_{650} min^{-1} μM^{-1}, muy similar al valor observado para *Eh*PDI (4.1×10^{-3} UA_{650} min^{-1} μM^{-1}).

La interferencia por actividad chaperona fue demostrada mediante ensayos con diferentes concentraciones de *Sc*PDI1 (0 – 1.4 µM). Los resultados indicaron que la actividad chaperona de *Sc*PDI1 interfería con su actividad reductasa a

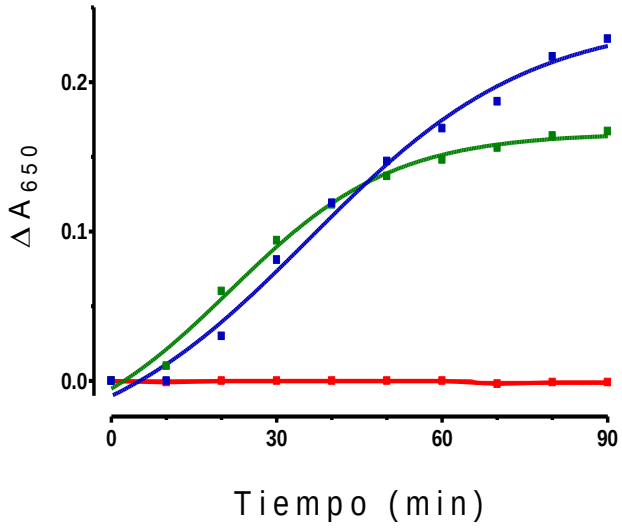


Figura 18. Representación gráfica del análisis comparativo de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 y *Eh*PDI.

Se muestra la cinética de reducción de insulina (131 µM) en ausencia de enzima (rojo) y asistido por 1 µM *Sc*PDI1 (verde) o 1 µM *Eh*PDI (azul).

concentraciones enzimáticas > 0.8 µM; por lo tanto, el análisis de la actividad reductasa fue realizado a concentraciones < 0.6 µM.

Para evaluar el efecto de la concentración de enzima sobre la actividad reductasa, se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de *Sc*PDI1 (0 – 0.6 µM). El análisis estadístico mostró un perfil hiperbólico típico, indicando que la actividad reductasa exhibe un patrón dosis-dependiente con respecto a la

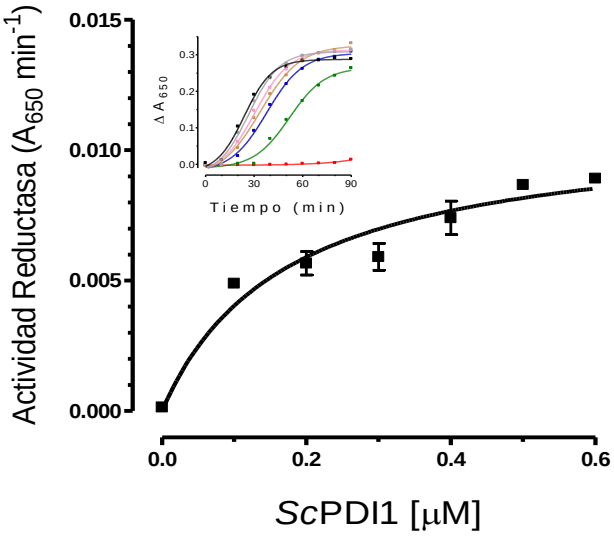


Figura 19. Representación gráfica del análisis dosis-dependiente de la actividad reductasa en relación a la concentración de *Sc*PDI1.

En el panel principal se representa el comportamiento dosis-dependiente de la reducción de insulina (131 µM) asistido por diferentes concentraciones de *Sc*PDI1. En el panel interno se muestra la cinética de reducción a concentraciones (µM) de *Sc*PDI1: 0, rojo; 0.1, verde; 0.2, azul; 0.3, café; 0.4, rosa; 0.5, gris; 0.6, negro.

concentración de enzima (Tabla 7, ver Anexo, y Figura 19). Con esto, se calculó una concentración efectiva media (CE_{50}) de 0.172 µM.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad reductasa. Usando diferentes concentraciones de insulina (0 – 200 µM) se realizaron cinéticas de reducción asistida por *Sc*PDI1 y se determinaron las velocidades enzimáticas (Tabla 8, ver Anexo). A partir de éstas, se calcularon los parámetros K_m y V_{max}. Como se ilustra en la Figura 20, mediante una análisis Lineweaver-Burk, la actividad reductasa presenta una tendencia dosis-dependiente. A partir de éste, se calcularon los valores de 201 µM para K_m y 14.15 x 10^{-3} UA_{650} min^{-1} para V_{max}.

Adicionalmente, la constante K_{cat} fue calculada ($K_{cat}=V_{max}/E_t$) considerando la concentración *Sc*PDI1 en los ensayos (0.3 µM). La K_{cat} aparente es de 47.2 x 10^{-3} [UA_{650}/µM] min^{-1}; es decir, cada unidad micromolar de *Sc*PDI1 es capaz de reducir insulina y producir 0.0472 UA_{650} por min. Además, considerando la relación K_{cat}/K_m, se calculó una eficiencia enzimática aceptable (3.914 [UA_{650}/µM] M^{-1} s^{-1}).

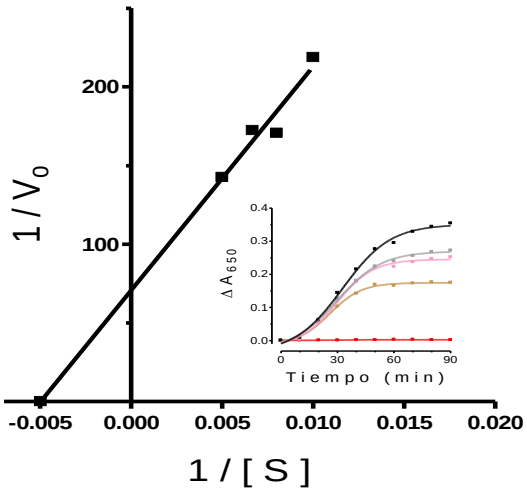


Figura 20. Representación gráfica del análisis mediante la ecuación Lineweaver-Burk de la actividad reductasa de la enzima *Sc*PDI1 con respecto a la concentración de insulina.

En el panel principal se representa el doble reciproco de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 ($1/V_o$) en relación a la concentración de insulina (1/[S]). En el panel interno se muestra la cinética de reducción a diferentes concentraciones (µM) de insulina: 0, rojo; 100, café; 125, rosa; 150, gris; 200, negro.

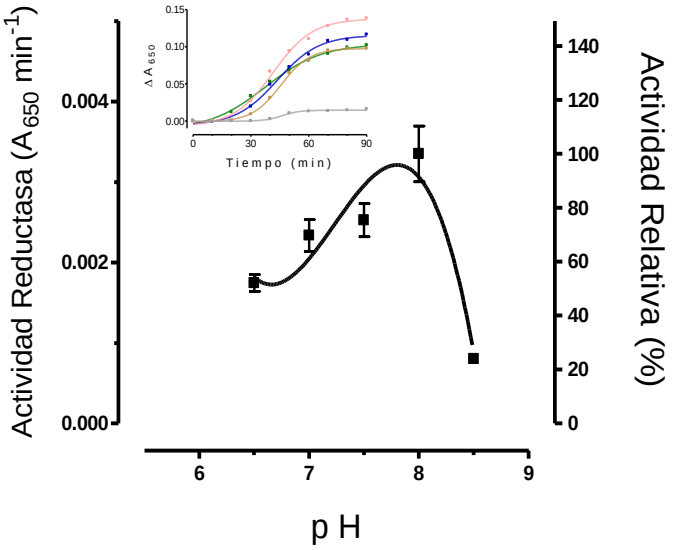


Figura 21. Representación gráfica del análisis pH-dependiente de la actividad reductasa de *Sc*PDI1.

En el panel principal se representa el comportamiento pH-dependiente de la reducción de insulina (131 µM) asistido por *Sc*PDI1. En el panel interno se muestra la cinética de reducción a pH: 6.5, verde; 7.0, azul; 7.5, café; 8.0, rosa; 8.5, gris.

5.7. Efecto del pH sobre la actividad reductasa de *Sc*PDI1

Para analizar el efecto del pH sobre la actividad reductasa de *Sc*PDI1, se realizaron ensayos en diferentes valores de pH. La actividad reductasa fue valorada en un rango de pH de 4 a 10; sin embargo, se detectó precipitación de insulina en valores de pH < 6.5 y ausencia de actividad en valores de pH > 8.5. Las cinéticas de reducción y las velocidades enzimáticas obtenidas (a valores de pH 6.5 – 8.5) se muestran en la Tabla 9 (ver Anexo). Como se muestra en la Figura 21, la máxima actividad reductasa se observa a pH 8.0 y el rango de actividad > 75% a pH 7.0 - 8.0.

5.8. Bacitracina como inhibidor de la actividad reductasa de *Sc*PDI1

El efecto inhibitorio de bacitracina sobre la actividad reductasa de *Sc*PDI1 fue analizado mediante ensayos de actividad enzimática en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor (Tabla 10, ver Anexo). Como se ilustra en la Figura

22, la actividad reductasa de *Sc*PDI1 (0.3 µM) disminuye con respecto al aumento de la concentración de bacitracina; exhibiendo un patrón dosis-dependiente con un perfil sigmoideo típico. Mediante este análisis, se determinó una CI_{50} de 0.935 mM. Además, considerando los valores de K_m (0.201 mM) y sustrato (0.1 mM de insulina), bacitracina mostró K_i aparente de 0.624 mM.

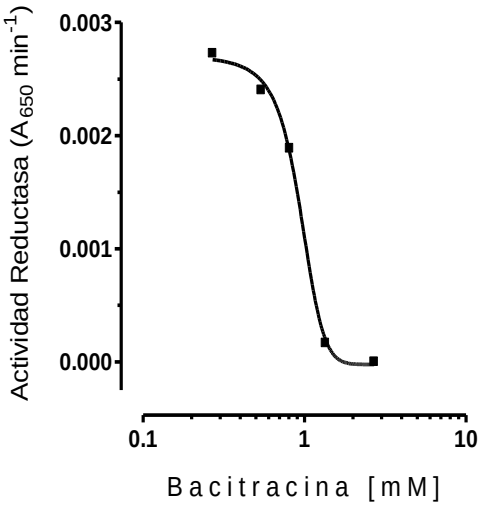


Figura 22. Representación gráfica del análisis de inhibición de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 por el antibiótico bacitracina.

5.9. *Sc*PDI1 como chaperona molecular

La actividad de *Sc*PDI1 como molécula chaperona fue valorada mediante un ensayo que mide la habilidad de prevenir la agregación insulina (Scheibel *et al*., 1998). La actividad relativa de *Sc*PDI1 como chaperona fue determinada utilizando la fórmula: % protección = $[(A_o - A) / A_o] \times 100$, donde A_o y A representan la absorbancia de saturación aparente (usualmente después de los 30 min) en ausencia y presencia de *Sc*PDI1, respectivamente (Spinozzi *et al*., 2006).

Como se observa en la Tabla 11 (ver Anexo), las cinéticas de agregación y los porcentajes de protección confirman que *Sc*PDI1 posee una de las actividades mostradas por las chaperonas moleculares. Aun más, como se puede constatar en

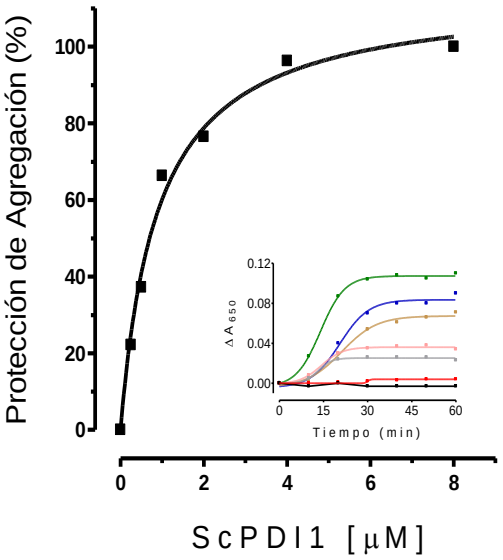


Figura 23. Representación gráfica del análisis de la actividad chaperona de *Sc*PDI1.

En el panel principal se representa el comportamiento dosis-dependiente de la protección de la agregación de insulina (100 µM) asistido por diferentes concentraciones de *Sc*PDI1. En el panel interno se muestra la cinética de agregación de insulina a concentraciones de *Sc*PDI1 (µM): 0, verde; 0.25, azul; 0.5, café; 1.0, rosa; 2.0, gris; 4.0, rojo; 8.0, negro.

la Figura 23, esta actividad es dosis dependiente, con perfil hiperobólico típico. A partir de este análisis, se determinó que *Sc*PDI1 posee una K_d de 0.897 µM.

5.10. Vancomicina como inhibidor de la función chaperona de *Sc*PDI1

El efecto inhibitorio de vancomicina sobre la función chaperona de *Sc*PDI1 fue analizado mediante ensayos de protección de la agregación de insulina en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor (Tabla 12, ver Anexo). Como se indica, las cinéticas y el porcentaje de inhibición demuestran que vancomicina interfiere en la actividad chaperona de *Sc*PDI1.

Aun más, como se muestra en la Figura 24, la actividad inhibición de la actividad chaperona aumenta con respecto al aumento de la concentración de vancomicina; exhibiendo la primera parte de un patrón dosis-dependiente con un perfil sigmoideo típico. Desafortunadamente, no se lograron valores de inhibición > 50%; por lo que la no fue posible calcular los parámetros de IC_{50} y K_i.

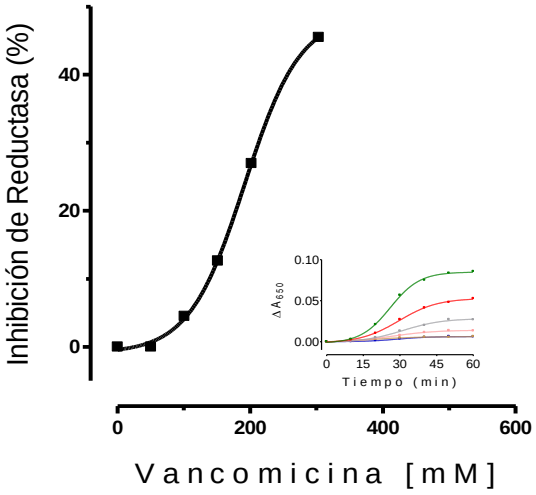


Figura 24. Representación gráfica del análisis de inhibición de la actividad chaperona de *Sc*PDI1 por vancomicina.

En el panel principal se representa el comportamiento dosis-dependiente de la inhibición de la función chaperona de *Sc*PDI1 (protectora de la agregación de insulina) por diferentes concentraciones de vancomicina. En el panel interno se muestra la cinética de agregación de insulina a concentraciones de vancomicina (µM): 0, verde; 50.5, rojo; 101, gris; 151.5, rosa; 202, café; 303, azul.

6. CONCLUSIONES

Mediante una reacción de PCR, en la que se utilizaron oligonucleótidos sintéticos y el plasmido pCT38, fue posible clonar la secuencia codificante para el polipéptido maduro de la proteína disulfuro isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*PDI1). Este fragmento fue clonado directamente en el vector pQE30, el cual permite la expresión citosólica de proteínas recombinantes (etiquetadas en el extremo N-terminal) en la bacteria *Escherichia coli*.

La proteína recombinante *Sc*PDI1 fue purificada a partir de lisados bacterianos totales, obtenidos de patillas celulares de cultivos inducidos con 0.1 mM de IPTG. Mediante protocolos estándar de purificación, cromatografía de afinidad a níquel y exclusión molecular, se logró obtener a ScPDI1 en niveles de purificación mayores a 95%.

En un análisis preliminar, se demostró que la proteína recombinante *Sc*PDI1 presenta actividad reductasa *in vitro,* muy similar a la mostrada por la enzima PDI amibiana (*Eh*PDI), en las misma condiciones experimentales. Mediante el análisis del efecto de las concentraciones de enzima sobre la actividad reductasa, se observó que existe interferencia de la función chaperona de ScPDI1 a concentraciones enzimáticas mayores a 0.8 µM. Así, a partir de la actividad reductasa valorada en diferentes concentraciones de enzima (0 – 0.6 µM) se calculó una CE_{50} de 0.172 µM.

Los parámetros cinéticos de K_m y V_{max} fueron determinados mediante un análisis enzimático tipo Lineweaver-Burk usando los valores recíprocos de la velocidad enzimática y la concentración de sustrato, obtenidos de ensayos de actividad reductasa con diferentes concentraciones de sustrato. Los valores de K_m (201 µM) y V_{max} (14.15×10^{-3} UA_{650} min^{-1}) fueron obtenidos a partir de los datos ajustados a una regresión lineal. Además, los valores calculados para la K_{cat} (47.2×10^{-3} [UA_{650}/µM] min^{-1}) y para la relación K_{cat}/K_m (3.914 [UA_{650}/µM] M^{-1} s^{-1}) demuestran que *Sc*PDI1 exhibe eficiente actividad reductasa.

El análisis del efecto de bacitracina demostró que la actividad reductasa de *Sc*PDI1 puede ser inhibida por este antibiótico. Este análisis señaló que bacitracina tiene una CI_{50} de 0.935 mM y una Ki aparente de 0.624 mM. Por otro lado, el análisis del efecto del pH mostró que la actividad reductasa de *Sc*PDI1 está limitada a un rango de pH (6.5 – 8.5); aun más, el máximo de actividad se observó a pH 8.0, con actividad mayor a 75% entre 7.0 y 8.0.

Finalmente, la función de *Sc*PDI1 como chaperona molecular fue demostrada mediante un ensayo de protección de agregación de insulina. El análisis de actividad a diferentes concentraciones de *Sc*PDI1 arrojó una K_d de 0.897 µM. Además, se demostró que el antibiótico vancomicina puede actuar como inhibidor de la actividad reductasa, observándose casi un 50% de inhibición a una concentración de 303 mM.

7. BIBLIOGRAFIA

Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Introducción a la biología celular. 2da. Edición, Editorial Panamericana. 2006.

Anelli T, Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway. EMBO J. 2008; 27(2): 315-27.

Ehrnsperger M, Gaestel M, Buchner J. Analysis of chaperone properties of small Hsp's. Methods Mol Biol. 2000; 99: 421-9.

Farquhar R, Honey N, Murant SJ, Bossier P, Schultz L, Montgomery D, Ellis RW, Freedman RB, Tuite MF. Protein disulfide isomerase is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. 1991; 108(1): 81-9.

Fassio A, Sitia R. Formation, isomerisation and reduction of disulphide bonds during protein quality control in the endoplasmic reticulum. Histochem Cell Biol. 2002; 117(2): 151-7.

Folch-Mallol JL, Garay-Arroyo A, Lledías F, Covarrubias AA. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Rev. Latinoam. Microbiol. 2004; 46 (1-2): 24-46.

Gething MJ. Guidebook to molecular chaperones and protein-folding catalysts. 1st. Edition, Sambrook and Tooze publication at Oxford University Press. 1998.

Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. Trends Biochem Sci. 2006; 31(8): 455-64.

Gunther R, Srinivasan M, Haugejorden S, Green M, Ehbrecht IM, Kuntzel H. Functional replacement of the *Saccharomyces cerevisiae* Trg1/Pdi1 protein by members of the mammalian protein disulfide isomerase family. J Biol Chem. 1993; 268(11): 7728-32.

Holmgren A. Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. J Biol Chem. 1979; 254(18): 9113-9.

Jhamb K, Jawed A, Sahoo DK. Immobilized chaperones: A productive alternative to refolding of bacterial inclusion body proteins. Process Biochemistry. 2008; 43: 587–97.

Jones EW, Pringle JR. The molecular and cellular biology of yeast *Saccharomyces*, Vol. 2: Gene Expression. Cold Spring Harbor Monograph Series (21B). 1993.

Kimura T, Hosoda Y, Kitamura Y, Nakamura H, Horibe T, Kikuchi M. Functional differences between human and yeast protein disulfide isomerase family proteins. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 320(2): 359-65.

Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. Biología celular y molecular. 5ta. Edición, Editorial Médica Panamericana. 2005

Moroder L, Buchner J. Oxidative folding of peptides and proteins. Series: RSC Biomolecular Sciences, Royal Society of Chemistry. 2009.

Puig A, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme. J Biol Chem. 1994; 269(10): 7764-71.

Roth RA Bacitracin: an inhibitor of the insulin degrading activity of glutathione-insulin transhydrogenase. Biochem Biophys Res Commun. 1981; 98(2): 431-8.

Sahdev S, Sunil K. Khattar SK, Saini KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol Cell Biochem. 2008; 307: 249–64

Shin H-C. Protein folding, misfolding, and refolding of therapeutic proteins. Biotechnol. Bioprocess Eng. 2001; 6: 237-43

Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. J Biosci Bioeng. 2005; 99(4):303-10.

Werner ME. Bioquímica: Fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Editorial Reverte, 2009.

Westphal V, Darby NJ, Winther JR. Functional properties of the two redox-active sites in yeast protein disulphide isomerase *in vitro* and *in vivo*. J Mol Biol. 1999; 286(4): 1229-39.

Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. Biochim Biophys Acta. 2004; 1699(1-2): 35-44.

ANEXO. Tablas de Resultados.

Tabla 6. Análisis comparativo de la actividad reductasa de las enzimas PDI de levadura (*Sc*PDI1) y amiba (*Eh*PDI).

Valores de A_{650} de un experimento simple. RQ, reducción química (sin enzima).

	Tiempo (min)									
Reacción	**0**	**10**	**20**	**30**	**40**	**50**	**60**	**70**	**80**	**90**
RQ	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.002	-0.001	-0.001
1 µM *Sc*PDI1	0.000	0.010	0.060	0.094	0.118	0.137	0.148	0.156	0.164	0.167
1 µM *Eh*PDI	0.000	0.000	0.030	0.081	0.119	0.147	0.169	0.187	0.217	0.229

Tabla 7. Análisis de la actividad reductasa a diferentes concentraciones de *Sc*PDI1.

A. Valores de A_{650} (media ± desviación estándar) de dos experimentos independientes. La concentración de *Sc*PDI1 se indica en µM.

Tiempo (min)	**0**		**0.1**		**0.2**		**0.3**		**0.4**		**0.5**		**0.6**	
	Media	**D.E.**	**Media**	**D.E.**	**Media**	**D.E.**	**Media**	**D.E.**	**Media**	**D.E.**	**Media**	**D.E.**	**Media**	**D.E.**
0	-0.003	0.003	-0.002	0.001	-0.003	0.003	-0.004	0.002	-0.002	0.002	-0.001	0.003	0.004	0.002
10	-0.003	0.002	0.000	0.001	-0.001	0.003	-0.003	0.001	0.000	0.003	0.000	0.005	0.012	0.001
20	-0.002	0.003	0.002	0.003	0.023	0.009	0.045	0.014	0.062	0.012	0.086	0.012	0.104	0.013
30	-0.002	0.004	0.002	0.016	0.092	0.016	0.127	0.017	0.147	0.013	0.173	0.015	0.191	0.025
40	-0.001	0.004	0.070	0.026	0.163	0.021	0.193	0.013	0.210	0.006	0.236	0.008	0.238	0.017
50	0.000	0.005	0.122	0.030	0.220	0.021	0.244	0.009	0.260	0.007	0.276	0.003	0.267	0.007
60	0.002	0.007	0.174	0.032	0.262	0.009	0.282	0.014	0.295	0.012	0.298	0.020	0.285	0.015
70	0.003	0.011	0.216	0.031	0.285	0.011	0.304	0.004	0.304	0.006	0.305	0.010	0.287	0.011
80	0.004	0.011	0.243	0.016	0.295	0.001	0.313	0.009	0.311	0.007	0.308	0.014	0.291	0.004
90	0.013	0.016	0.264	0.006	0.309	0.016	0.332	0.003	0.315	0.012	0.313	0.014	0.289	0.005

B. Valores de actividad reductasa (A_{650} min^{-1} ± error estándar medio; $x10^{-3}$) a diferentes concentraciones de *Sc*PDI1.

Reductasa	**0.14 ± 0.03**	**4.89 ± 0.17**	**5.66 ± 0.45**	**5.91± 0.51**	**7.4 ± 0.64**	**8.67 ± 0.02**	**8.92 ± 0.13**

Tabla 8. Actividad reductasa a diferentes concentraciones de insulina.

A. Valores de A_{650} (media ± desviación estándar) de dos experimentos independientes. La concentración de insulina se indica en µM.

Tiempo (min)	0		100		125		150		200	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.001	0.002	0.006	0.003	0.003	0.000	0.009	0.011	0.009	0.002
20	0.001	0.002	0.054	0.017	0.055	0.008	0.063	0.027	0.061	0.023
30	0.001	0.002	0.103	0.022	0.119	0.004	0.127	0.029	0.144	0.026
40	0.002	0.004	0.142	0.019	0.177	0.010	0.181	0.021	0.215	0.020
50	0.002	0.003	0.169	0.019	0.221	0.038	0.224	0.016	0.276	0.029
60	0.003	0.002	0.166	0.025	0.223	0.018	0.240	0.000	0.295	0.015
70	0.003	0.001	0.173	0.025	0.237	0.023	0.256	0.010	0.329	0.006
80	0.002	0.001	0.176	0.025	0.247	0.033	0.268	0.021	0.344	0.021
90	0.002	0.002	0.175	0.030	0.252	0.035	0.272	0.026	0.354	0.021

B. Valores de actividad reductasa (A_{650} min^{-1} ± error estándar medio; x 10^{-3}) a diferentes concentraciones de insulina. Valores recíprocos de la velocidad ($1/V_o$) y la concentración de sustrato (1/[S]).

Reductasa	**0.0 ± 0.0**	**4.6 ± 0.2**	**5.9 ± 0.2**	**5.8 ± 0.1**	**7.0 ± 0.4**
1/[S]	**ND**	**0.0100**	**0.0080**	**0.0067**	**0.0050**
$1/V_o$	**ND**	**218.82**	**170.65**	**172.41**	**142.65**

Tabla 9. Actividad reductasa a diferentes valores de pH.

A. Valores de A_{650} (media ± desviación estándar) de dos experimentos independientes.

Tiempo (min)	6.5		7.0		7.5		8.0		8.5	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10	-0.0010	0.0014	-0.0005	0.0007	0.0005	0.0007	0.0005	0.0007	-0.0005	0.0007
20	0.0120	0.0042	0.0010	0.0000	0.0010	0.0014	0.0010	0.0000	0.0000	0.0000
30	0.0335	0.0064	0.0195	0.0021	0.0090	0.0014	0.0270	0.0042	0.0000	0.0000
40	0.0530	0.0042	0.0490	0.0057	0.0310	0.0014	0.0665	0.0092	0.0025	0.0007
50	0.0690	0.0028	0.0725	0.0106	0.0645	0.0219	0.0940	0.0212	0.0105	0.0021
60	0.0815	0.0035	0.0895	0.0134	0.0820	0.0240	0.1105	0.0290	0.0130	0.0028
70	0.0905	0.0035	0.1080	0.0014	0.0950	0.0170	0.1280	0.0226	0.0135	0.0035
80	0.0990	0.0057	0.1095	0.0163	0.0975	0.0233	0.1365	0.0262	0.0145	0.0021
90	0.1020	0.0042	0.1165	0.0191	0.0975	0.0205	0.1385	0.0346	0.0160	0.0014

B. Valores de actividad reductasa (A_{650} min^{-1} ± error estándar medio; x 10^{-3}) a diferentes valores de pH.

Reductasa	**1.75 ± 0.11**	**2.34 ± 0.20**	**2.53 ± 0.21**	**3.35 ± 0.35**	**0.80 ± 0.00**

Tabla 10. Análisis de inhibición de la actividad reductasa de *Sc*PDI1 por bacitracina**.**

Actividad reductasa (UA_{650} min^{-1} y error estándar medio; x 10^{-3}) de dos experimentos independientes.

Bacitracina [mM]	Media	E.E.M.
0.27	2.73	0.13
0.54	2.40	0.11
0.81	1.89	0.19
1.35	0.17	0.14
2.70	0.00	0.00

Tabla 11. Análisis de la actividad chaperona de *Sc*PDI1.

A. Valores de A_{650} (media ± desviación estándar) de dos experimentos independientes.

Tiempo (min)	0.00		0.25		0.50		1.00		2.00		4.00		8.00	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.027	0.009	0.000	0.000	0.002	0.002	0.008	0.001	0.005	0.003	0.000	0.001	-0.003	0.001
20	0.087	0.012	0.040	0.001	0.030	0.001	0.030	0.004	0.024	0.001	0.001	0.001	0.000	0.003
30	0.104	0.006	0.070	0.003	0.054	0.001	0.035	0.006	0.026	0.001	0.002	0.001	-0.003	0.002
40	0.108	0.003	0.080	0.004	0.061	0.004	0.037	0.007	0.026	0.001	0.003	0.001	-0.003	0.003
50	0.105	0.004	0.080	0.006	0.066	0.008	0.038	0.007	0.026	0.003	0.004	0.001	-0.003	0.004
60	0.110	0.006	0.090	0.006	0.071	0.004	0.034	0.008	0.023	0.000	0.004	0.001	-0.003	0.002

B. Valores de protección (%) de la agregación de insulina a diferentes concentraciones de *Sc*PDI1.

Protección	**0.0**	**22.2**	**37.2**	**66.3**	**76.5**	**96.3**	**100.0**

Tabla 12. Análisis de inhibición de la actividad chaperona de *Sc*PDI1 por vancomicina.

A. Valores de A_{650} (media ± desviación estándar) de tres experimentos independientes. Concentraciones mM de vancomicina,

Tiempo (min)	0.00		50.5		101.0		151.5		202		303	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10	0.0003	0.0015	0.0013	0.0015	0.0010	0.0017	0.0010	0.0000	0.0023	0.0040	0.0030	0.0017
20	0.0013	0.0015	0.0030	0.0026	0.0043	0.0025	0.0050	0.0010	0.0103	0.0015	0.0210	0.0010
30	0.0033	0.0023	0.0047	0.0032	0.0077	0.0015	0.0130	0.0046	0.0270	0.0104	0.0567	0.0068
40	0.0053	0.0015	0.0057	0.0047	0.0113	0.0031	0.0200	0.0070	0.0413	0.0146	0.0750	0.0098
50	0.0063	0.0015	0.0057	0.0031	0.0137	0.0042	0.0270	0.0072	0.0480	0.0161	0.0837	0.0078
60	0.0060	0.0020	0.0063	0.0032	0.0133	0.0031	0.0267	0.0090	0.0527	0.0158	0.0857	0.0078

B. Valores de inhibición (%) de la actividad chaperona de *Sc*PDI1 (protectora de la agregación de insulina) a diferentes concentraciones de vancomicina.

Inhibición	**0.0**	**0.0**	**4.5**	**12.6**	**27.0**	**45.5**