



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería**

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**REPLEGAMIENTO DE LA ENZIMA CISTEÍNA**  
**PROTEINASA 5 DE *Entamoeba histolytica* (EhCP5)**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**Q.F.B. RAÚL OROZCO DÍAZ**

**Tijuana, B. C.**

**Agosto de 2011.**

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

FOLIO No. 062

Tijuana, B. C., a 02 de agosto de 2011

C. Raúl Orozco Díaz  
Pasante de: Maestría en Ciencias  
Presente

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

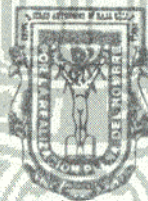
Es propuesto, por el C. Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra

quien será el responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido  
al tema: REPLEGAMIENTO DE LA ENZIMA CISTEÍNA PROTEINASA 5 DE Entamoeba  
histolytica (EhCP5)


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


- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- OBJETIVOS
- III.- MATERIALES Y MÉTODOS
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFÍA

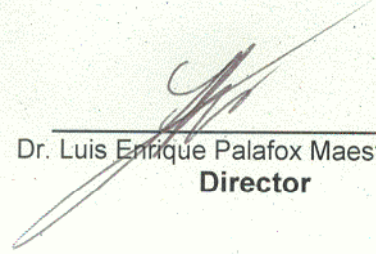
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS E INGENIERÍA

  
Q. Noemí Hernández Hernández  
Sub-Director Secretario

  
Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra  
Asesor

  
Dr. Luis Enrique Palafox Maestre  
Director

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

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

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)

## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceras gracias con mucho cariño y amor a **Dios** por ser el creador de mi vida, darme salud, fortaleza para seguir adelante y permitirme lograr una meta más en mi vida.

***Te Amo.***

A **mis padres** por darme la vida, que desde el cielo se que están a mi lado siendo mis angelitos que cuidan y guían mi camino.

***Los Extraño y los Amo.***

A cada uno de **mis hermanos y sobrinos** por todas las experiencias vividas que me han enseñado a madurar en la vida.

***Los Amo.***

Con amor a mi hermana **Erica** por su gran cariño y por estar siempre a mi lado, apoyándome en todas las decisiones de mi vida.

Con amor a mi hermana **María** por todo lo vivido, y por esos tres sobrinos hermosos que espero y Dios nos permita estar siempre juntos.

Con amor a mi hermano **Hugo** por dejarme sentir ese gran cariño, te llevo siempre en mi corazón, y por darme esa hermosa sobrina.

A mi director de tesis el **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra**, por darme la oportunidad de estar en su equipo de trabajo, por confiar en mí, por todas sus enseñanzas profesionales y personales que me enseñaron a aprender y a madurar en mi vida. Muchas gracias.

A cada uno de mis sinodales por permitirme lograr esta meta en mi vida, por su apoyo y sus conocimientos: La Dra. Rosa E. Mares, el Dr. Samuel G. Meléndez, el Dr. Iván Córdova G. y el Dr. José M. Cornejo.

A cada uno de mis compañeros de laboratorio por su apoyo, por escucharme más de alguna vez cuando lo necesite, por su amistad y experiencias compartidas.

A la FCQI de la UABC y al CONACYT por la oportunidad y apoyo que se me dio para seguirme preparando y poder llevar a cabo este gran reto.

## Tabla de Contenido

Índice de Tablas.....	9
Abreviaturas .....	10
Resumen .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. <i>Entamoeba histolytica</i> y amibiasis.....</b>	<b>12</b>
1.1.1. Taxonomía.....	12
1.1.2. Ciclo biológico .....	12
1.1.3. Morfología celular.....	14
1.1.4. Epidemiología de la amibiasis .....	14
1.1.5. Patogenia .....	15
1.1.6. Mecanismos de evasión inmune.....	16
<b>1.2. Cisteína proteinasas como catalizadores biológicos .....</b>	<b>16</b>
1.2.1. Proteinasas.....	16
1.2.2. Cisteína proteinasas .....	17
1.2.3. Mecanismo de acción proteolítica.....	17
<b>1.3. Cisteína proteinasas de parásitos .....</b>	<b>19</b>
1.3.1. Clasificación y evolución .....	19
1.3.2. Invasión del hospedero y evasión inmune.....	21
1.3.3. Vacunas y terapia farmacológica .....	21
<b>1.4. Cisteína proteinasas de <i>Entamoeba histolytica</i> .....</b>	<b>22</b>
1.4.1. Función.....	23
1.4.2. Expresión.....	23
1.4.3. Inhibidores .....	25
<b>1.5. Cisteína proteinasa 5 de <i>E. histolytica</i> (<i>EhCP5</i>).....</b>	<b>25</b>
1.5.1. Genética .....	25
1.5.2. Bioquímica.....	27

1.5.3.	Patología .....	28
<b>1.6.</b>	<b>Plegamiento de proteínas .....</b>	<b>30</b>
1.6.1.	Plegamiento <i>in vivo</i> .....	30
1.6.2.	Plegamiento <i>in vitro</i> .....	31
<b>1.7.</b>	<b>Papel de la enzima PDI en el plegamiento de proteínas .....</b>	<b>33</b>
1.7.1.	Función de PDI en células eucariotas.....	33
1.7.2.	La familia PDI de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	34
1.7.3.	PDI de <i>Entamoeba histolytica</i> ( <i>EhPDI</i> , p38) .....	35
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
2.1.	Objetivo general .....	36
2.2.	Objetivos específicos .....	36
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1.	Reactivos biológicos y químicos .....	37
3.1.1.	Células y medio de cultivo .....	37
3.1.2.	Plásmidos .....	37
3.1.3.	Enzimas y otros reactivos biológicos .....	38
3.1.4.	Oligonucleótidos .....	39
3.1.5.	Reactivos químicos.....	39
3.1.6.	Sistemas de purificación .....	40
3.2.	Equipo .....	40
3.3.	Construcción del plásmido recombinante pET28CP5.....	40
3.3.1.	Reacción de <i>PCR</i> .....	40
3.3.2.	Ligación .....	41
3.3.3.	Transformación .....	41
3.3.4.	Selección y análisis .....	42
3.4.	Análisis de la expresión de la proteína <i>EhCP5</i> .....	42
3.4.1.	Transformación en la cepa <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	42
3.4.2.	Expresión de <i>EhCP5</i> a mini-escala.....	42
3.4.3.	Fraccionamiento y análisis de solubilidad.....	43
3.4.4.	Separación electroforética de proteínas.....	43
3.4.5.	Inmunodetección .....	44

<b>3.5. Aislamiento y purificación de la proteína <i>EhCP5</i></b> .....	<b>45</b>
3.5.1. Expresión de <i>EhCP5</i> a escala media .....	45
3.5.2. Lisis celular en condiciones desnaturalizantes .....	45
3.5.3. Cromatografía de afinidad a níquel .....	45
3.5.4. Cuantificación de proteína purificada.....	46
<b>3.6. Condiciones de replegamiento oxidativo de <i>EhCP5</i></b> .....	<b>46</b>
3.6.1. Tamizado de 8 condiciones del replegamiento oxidativo.....	46
3.6.2. Determinación fluorométrica de la actividad proteolítica de <i>EhCP5</i> .....	46
3.6.3. Análisis de 4 condiciones de replegamiento oxidativo .....	47
3.6.4. Optimización de la condición de replegamiento oxidativo .....	47
<b>3.7. Replegamiento oxidativo de <i>EhCP5</i> asistido por <i>EhPDI</i></b> .....	<b>48</b>
3.7.1. Asistencia de <i>EhPDI</i> .....	48
3.7.2. Efecto de la concentración de <i>EhPDI</i> .....	48
3.7.3. Efecto de la concentración de <i>EhCP5</i> .....	48
<b>3.8. Análisis estadístico</b> .....	<b>48</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1. Amplificación de <i>EhCP5</i> y obtención de pET28CP5</b> .....	<b>49</b>
<b>4.2. Análisis de expresión de la proteína recombinante <i>EhCP5</i></b> .....	<b>50</b>
<b>4.3. Purificación de la proteína recombinante <i>EhCP5</i></b> .....	<b>53</b>
<b>4.4. Identificación de las condiciones de replegamiento de <i>EhCP5</i></b> .....	<b>54</b>
<b>4.5. <i>EhPDI</i> favorece el replegamiento de <i>EhCP5</i></b> .....	<b>57</b>
<b>4.6. El replegamiento asistido de <i>EhCP5</i> depende de la concentración de enzima</b> .....	<b>58</b>
<b>4.7. El replegamiento asistido de <i>EhCP5</i> depende de la concentración de sustrato</b> .....	<b>59</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>60</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>61</b>
<b>ANEXO. Tablas de resultados</b> .....	<b>65</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Entamoeba histolytica</i> . .....	13
Figura 2. Representación gráfica de la interacción del sustrato con una cisteína proteinasa. ....	18
Figura 3. Representación esquemática de la proximidad en el sitio activo de una cisteína proteinasa. ....	18
Figura 4. Diagrama esquemático de la superfamilia de cisteína proteinasas. Se destacan las subfamilias relacionadas con enzimas de parásitos. ....	20
Figura 5. Representación esquemática de los dominios estructurales de las cisteína proteínasas de <i>E. histolytica</i> . .....	23
Figura 6. Secuencia nucleotídica, y polipeptídica deducida, del gen codificante para la cisteína proteinasa 5 de <i>Entamoeba histolytica</i> ( <i>EhCP5</i> ).....	26
Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas codificantes para <i>EhCP1</i> , <i>EhCP2</i> , <i>EhCP3</i> y <i>EhCP4</i> en comparación con <i>EhCP5</i> . .....	27
Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias polipeptídicas precursoras de <i>EhCP1</i> , <i>EhCP2</i> , <i>EhCP3</i> y <i>EhCP4</i> en comparación con <i>EhCP5</i> . .....	28
Figura 9. Representación en listones de la estructura 3D de la enzima <i>EhCP5</i> . .....	29
Figura 10. Secuencia precursor polipeptídico de <i>EhCP5</i> . .....	29
Figura 11. Representación esquemática de la organización de dominios de la familia de secuencias PDI de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	34
Figura 12. Representación esquemática del plásmido pBEhCP5.....	37
Figura 13. Representación esquemática del plásmido pET28a(+). .....	38
Figura 14. Separación electroforética (gel de agarosa al 1.5%) del fragmento codificante para <i>EhCP5</i> . .....	49
Figura 15. Separación electroforética (gel de agarosa al 1.2%) de los productos de digestión de las clonas C1 a C7 de pET28CP5 con las endonucleasas <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III.....	50
Figura 16. Representación esquemática del plásmido pET28CP5.....	51
Figura 17. Análisis de expresión de la proteína recombinante <i>EhCP5</i> . .....	52

Figura 18. Análisis de solubilidad de la proteína recombinante <i>EhCP5</i> . .....	53
Figura 19. Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12.5%) de las fracciones colectadas durante la cromatografía de afinidad a níquel para purificar la proteína recombinante <i>EhCP5</i> . 54	
Figura 20. Representación gráfica de las cinéticas de recuperación de <i>EhCP5</i> en 8 condiciones de replegamiento.....	55
Figura 21. Representación gráfica de las cinéticas de recuperación de <i>EhCP5</i> en 4 condiciones de replegamiento.....	56
Figura 22. Representación gráfica de las cinéticas de recuperación de <i>EhCP5</i> en 4 variantes de la condición de replegamiento 8. ....	56
Figura 23. Representación gráfica de las cinéticas de recuperación de <i>EhCP5</i> en 4 variantes de la condición de replegamiento 8-1.....	57
Figura 24. Representación gráfica de las cinéticas de recuperación de <i>EhCP5</i> en presencia de 5 $\mu$ M de <i>EhPDI</i> . ....	58
Figura 25. Representación gráfica del efecto de la concentración de <i>EhPDI</i> sobre el replegamiento de <i>EhCP5</i> .....	58
Figura 26. Representación gráfica del efecto de la concentración de <i>EhCP5</i> desnaturalizada y reducida sobre el replegamiento asistido de <i>EhCP5</i> . ....	59

## Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	12
Tabla 2. Clasificación de proteinasas.....	16
Tabla 3. Clasificación del clan CA-C1 de la familia de cisteína proteinasas de <i>E. histolytica</i> . .....	24
Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos universales M13.....	39
Tabla 5. Condiciones consideradas para el replegamiento oxidativo de <i>EhCP5</i> .....	47
Tabla 6. Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína <i>EhCP5</i> en el tamizado de 8 condiciones. ....	65
Tabla 7. Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína <i>EhCP5</i> en el tamizado de 4 condiciones. ....	65
Tabla 8. Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína <i>EhCP5</i> en el tamizado de la condición 8 a diferentes concentraciones de glicerol y arginina. ....	65
Tabla 9. Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína <i>EhCP5</i> en el tamizado de la condición 8-1 a diferentes valores de pH (pH 6.5, 7.5, 8.0 y 8.5).....	66
Tabla 10. Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína <i>EhCP5</i> a diferentes concentraciones de <i>EhPDI</i> . ....	66
Tabla 11. Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína <i>EhCP5</i> a diferentes concentraciones de <i>EhCP5</i> desnaturalizada y reducida. ....	66

## Abreviaturas

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
CP	Cisteína proteinasa
Cys	Cisteína
dNTPs	Deoxirribonucleótidos trifosfatados
<i>EhCP5</i>	Cisteína proteinasa 5 de <i>Entamoeba histolytica</i>
<i>EhPDI</i>	Proteína disulfuro isomerasa de <i>Entamoeba histolytica</i>
g, ng, µg	Gramos, nanogramos, microgramos.
Gln	Glutamina
His	Histidina
IgA, IgG	Inmunoglobulina A, inmunoglobulina G
IL-18	Interlucina 18
Kba	Kilopares de bases
KDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertoni
mL, µL	Mililitros, microlitros
µm	Micrómetros
M, mM, µM	Molar, milimolar, micromolar
nmol, pmol	Nanomol, picomol
pb	Pares de bases
p.e.	Por ejemplo.
Seg	Segundos
Ser	Serina
Trx	Tiorredoxina
Tyr	Tirosina
U	Unidades
Ufc	Unidades formadoras de colonias
URF	Unidades relativas de fluorescencia
Vol	Volumen

## Resumen

El estado nativo y la función biológica de una proteína dependen en gran medida del correcto plegamiento de su estructura terciaria. Interesantemente, algunas proteínas pueden plegarse de manera espontánea (en un medio ambiente apropiado); sin embargo, la mayoría requiere la asistencia de moléculas auxiliares para adquirir su conformación más estable. Estas moléculas catalíticas de plegamiento son proteínas que aceleran la reacción, inhiben las etapas que conducen a vías no reproducibles, impiden la agregación de intermediarios y retardan la estructuración hasta que la secuencia apropiada ha sido traducida. *In vivo*, un polipéptido puede alcanzar su forma nativa con rapidez gracias a la participación de moléculas chaperonas (Cpn60 y Bip) y enzimas (Dsb, PDI, y PPI) que conducen el plegamiento de manera eficiente. Por otro lado, el plegamiento de proteínas *in vitro* no es suficientemente rápido ni tan eficiente, por lo que es imprescindible la optimización de las condiciones medio-ambientales de la reacción y la adición de catalizadores químicos y biológicos que favorezcan la cinética del plegamiento.

El parásito protozoario *Entamoeba histolytica* es el agente infeccioso causal de la amibiasis en humanos. Después de la malaria, la amibiasis es la segunda causa de muerte en humanos causada por parásitos protozoarios, ocasionando alrededor de 100,000 muertes al año. Durante el proceso patológico, *E. histolytica* secreta un conjunto de cisteína proteinasas (importante familia de factores de virulencia), las cuales juegan un papel clave en la lisis de tejidos del hospedero, modulan la respuesta inmune mediada por células y estimulan la sobre-expresión de citocinas de inflamación en las células epiteliales humanas. La enzima cisteína proteinasa 5 de *E. histolytica* (*EhCP5*) es uno de los factores de virulencia mayoritariamente secretado y localizado en la superficie amibiana; aun más, se ha observado que la sobre-expresión de ésta incrementa la virulencia del parásito e induce significativamente el tamaño de los abscesos hepáticos.

El presente trabajo representa la etapa inicial del estudio de los mecanismos de plegamiento de factores de virulencia amibianos; específicamente, *EhCP5* como modelo y sustrato de la enzima *EhPDI* (como catalizador del plegamiento). Inicialmente, la proteína recombinante *EhCP5* fue expresada en *Escherichia coli* y purificada en condiciones desnaturizantes (ya que mostró insolubilidad en condiciones nativas) con un rendimiento de 3.04 mg/L. Mediante un tamizado seguido de un procedimiento de optimización, se determinaron las condiciones medio-ambientales que favorecen el replegamiento oxidativo de *EhCP5*: 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 10% de glicerol; 750 mM de L-arginina; 10 mM de EDTA; 30 mM de NaCl; 5 mM de GSH y 0.5 mM de GSSG. Estas condiciones permitieron realizar los ensayos de replegamiento oxidativo asistido por *EhPDI*; los cuales mostraron un incremento en el replegamiento de *EhCP5*; además, se observó una dependencia a la concentración de enzima ( $CE_{50} = 2.56 \mu\text{M}$ ) y sustrato ( $K_m = 1.45 \mu\text{M}$ ;  $V_{\max} = 0.088 \text{ URF min}^{-1}$ ;  $K_{\text{cat}} = 0.012 \text{ URF min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ). Finalmente, los ensayos *in vitro* de replegamiento oxidativo asistido sugieren que *EhCP5* pudiera ser un sustrato natural de *EhPDI* *in vivo*. Sin embargo, se requieren experimentos, como el silenciamiento génico de *EhPDI*, para complementar esta observación.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Entamoeba histolytica* y amibiasis

### 1.1.1. Taxonomía

*Entamoeba histolytica* es un parásito protozoario unicelular perteneciente a la familia Entamoebidae de los rizópodos, los cuales son organismos capaces de formar pseudópodos en alguna etapa de su vida (Tabla 1) [Levine, *et al.*, 1980].

*E. histolytica* es una célula eucariota cuyo nombre se deriva de su capacidad de disgregar y destruir tejidos, la cual es ocasionada primordialmente por la actividad lítica de una familia de cisteína proteinasas [Perez-Monfort, *et al.*, 1987; Ximénez, *et al.*, 2009].

Existen diferentes especies de *Entamoeba*; sin embargo, sólo *E. histolytica* es patógena, aunque está muy relacionada con la especie no patógena *E. dispar*, ambas son genéticamente distintas [Hirata, *et al.*, 2007; Tannich, *et al.*, 1991].

### 1.1.2. Ciclo biológico

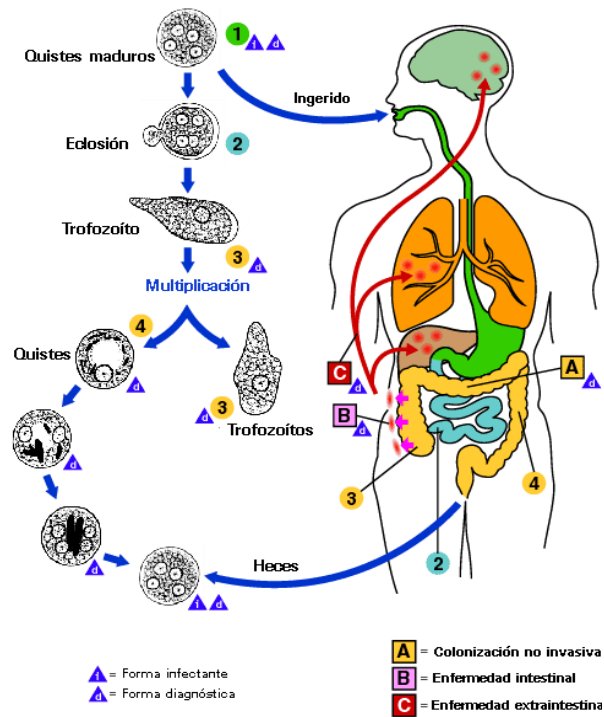
*E. histolytica* presenta diferentes estadios en su ciclo de vida; sin embargo, el quiste y el trofozoito son los estadios clínicamente importantes. En condiciones no favorables, el trofozoito (forma invasiva) disminuye la expresión de sus genes activos y rápidamente aumenta la regulación de genes específicos para su enquistamiento y, posteriormente, convertirse en un quiste tetra-nucleado (forma infectiva). El quiste se caracteriza por la presencia de una pared quitinosa, no se divide, es capaz de sobrevivir en el medio ambiente y puede ser transmitido al hospedero por la vía fecal-oral [Gathiram, *et al.*, 1990; Ehrenkauf, *et al.*, 2007].

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Entamoeba histolytica*.

---

<b>Reino:</b>	Protista
<b>Subreino:</b>	Protozoo
<b>Phylum:</b>	Sarcomastigophora
<b>Superclase:</b>	Rhizopoda
<b>Clase:</b>	Lobosea
<b>Subclase:</b>	Gymnamoebida
<b>Orden:</b>	Amoebida
<b>Suborden:</b>	Tubulina
<b>Familia:</b>	Entamoebidae
<b>Género:</b>	<i>Entamoeba</i>
<b>Especie:</b>	<i>histolytica</i>

---



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*.

El quiste tetra-nucleado puede ser ingerido a través de bebidas o alimentos contaminados; una vez en el intestino delgado, sucede el desenquistamiento y un trofozoito proliferativo móvil es liberado en el lumen intestinal; posteriormente, éstos se multiplican por fisión binaria en el intestino grueso (considerando las condiciones anaeróbicas favorables de la región ileo-cecal); finalmente, algunos trofozoitos permanecen adheridos a la mucosa intestinal en tanto que otros se enquistan y son excretados a través de la heces (Figura 1).

Los quistes mono-, bi- y tetra-nucleados pueden ser euploides o poliploides, ya que la poliploidia puede ocurrir sin división celular; así, un simple núcleo puede contener 1 – 10 veces más contenido genómico; por otro lado, los trofozoitos multi-nucleados también pueden alojar varios genomas contenidos en cada núcleo; es interesante que la duplicación de ADN parece ocurrir varias veces antes de la división celular; sin embargo, los mecanismos reguladores del ciclo celular amibiano aun son desconocidos [Das, *et al.*, 2002].

### 1.1.3. Morfología celular

Los trofozoitos son células mono-nucleadas, pleomórficas, con un diámetro de 20 a 40  $\mu\text{m}$ , móviles y potencialmente patogénicos; el núcleo es esférico, contiene pequeños gránulos de cromatina y un pequeño cariosoma central. Los quistes son redondos, tetra-nucleados en su forma madura, con un diámetro de 10 a 16  $\mu\text{m}$  y son potencialmente infectivos; se caracterizan por una vacuola con glicógeno y cuerpos de cromatina [WHO, 1997].

El trofozoito contiene distribuido en todo el citoplasma pequeñas vesículas y algunos organelos identificados como mitosomas (considerados como remanentes mitocondriales) o *EhKOs* (parecidos a cinetoplastos) [León-Ávila, *et al.*, 2004]. A pesar de la ausencia de un sistema endomembranoso típico, el trofozoito presenta estructuras sub-celulares parecidos a los microsomas, los cuales contienen parte de la vía de oligosacáridos ligada al dolicol y las funciones del retículo endoplásmico (RE), tales como el procesamiento y plegamiento de polipéptidos nacientes; aun más, contiene proteínas que participan en el transporte a través de la membrana y de la maquinaria del plegamiento [Salgado, *et al.*, 2005]. Interesantemente, en la membrana citoplasmática contiene un gran número de antígenos relevantes para la inmunidad humoral, así como receptores importantes para su metabolismo, funcionamiento y patogenicidad, tal como la lectina de unión a galactosa/N-acetil-galactosamina [Braga, *et al.*, 1992]. Además, secreta un alto número de factores de virulencia, entre los que destacan las proteínas formadoras de poros [Zhang, *et al.*, 2004] y las cisteína proteinasas [Hou, *et al.*, 2010].

### 1.1.4. Epidemiología de la amibiasis

*E. histolytica* es el agente causal de la amibiasis humana; se estima que, a nivel mundial, 500 millones pudieran estar infectadas y que el 10% desarrolla la patología, principalmente como amibiasis intestinal (*p.e.* colitis hemorrágica) o extra-intestinal (*p.e.* absceso hepático amibiano), causando un alto nivel de morbilidad y mortalidad, particularmente en países en vías de desarrollo. La amibiasis es la segunda causa de muerte ocasionada por parásitos protozoarios infecciosos, después de la malaria, siendo responsable de alrededor de 100 000 muertes al año [WHO, 1997].

En México, la amibiasis sigue siendo una de las 20 principales causas de enfermedad, ocupando anualmente entre el quinto y sexto lugar. En 2007, estudios sero-epidemiológicos reportaron que 8.41% de la población ha producido anticuerpos circulantes anti-amibianos, indicando la alta exposición de la población mexicana a este parásito [Ximénez, *et al.*, 2009].

#### **1.1.5. Patogenia**

Los trofozoitos destruyen una amplia variedad de tipos celulares de manera contacto-dependiente, donde su adherencia a las células blanco está mediada principalmente por una glicoproteína de su superficie (lectina de unión a Gal/NAcGal) que reconoce los azúcares galactosa y N-acetil-galactosamina en la superficie de las células del hospedero [Petri, *et al.*, 2002]. Los trofozoitos primero colonizan la barrera mucoide, seguida de una ruptura y degradación de esa barrera para tener acceso a la capa epitelial [Moncada, *et al.*, 2006].

Con el contacto célula-célula, los trofozoitos estimulan tanto el aumento de la expresión de interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL6, e IL-8) y TNF- $\alpha$ , provocando la inflamación [Hou, *et al.*, 2010], por el reclutamiento de células participantes en el proceso inflamatorio (granulocitos polimorfonucleares) hacia el sitio de la invasión. Ambos factores incrementan significativamente el daño epitelial, induciendo ulceración y colitis [Burchard, *et al.*, 1993].

Adicionalmente, los trofozoitos pueden destruir neuronas entéricas [Lourenssen, *et al.*, 2010], y seguir la invasión hacia otros tejidos extra-intestinales, como el hígado, donde la unión puede inducir tanto apoptosis como acumulación de células inflamatorias, ocasionando abscesos hepáticos amibianos [Seydel y Stanley Jr, 1998]. Finalmente, la infección puede extenderse hacia las cavidades pleural, peritoneal y pericárdica, e incluso puede llegar al cerebro [Lichtenstein, *et al.*, 2005].

Por otro lado, los trofozoitos tienen la habilidad de lisar las células del hospedero gracias a la secreción de péptidos formadores de poros (amibaporos), los cuales se insertan en la membrana de la célula blanco, aunque no son necesarios para la inducción de la inflamación o daño al tejido, son requeridos para la formación de abscesos [Zhang, *et al.*, 2004].

### 1.1.6. Mecanismos de evasión inmune

Los trofozoitos de *E. histolytica* tienen la capacidad de activar el sistema del complemento del hospedero, mediante el mecanismo de romper la cadena  $\alpha$  de C3, generando C3b funcionalmente activa [Meléndez-López, *et al.*, 2007]; sin embargo, éstos resisten la lisis mediada por complemento gracias a una lectina de adhesión amibiana que inhibe el ensamblaje del complejo C5b-9, ya que tiene reactividad cruzada con CD59 (un inhibidor membranal de C5b-9) [Braga, *et al.*, 1992]. Además, poseen glicoconjugados (como lipofosfoglicanos) en la superficie celular que actúan como barrera física para protegerla del ataque del complemento [Bhattacharya, *et al.*, 2000]. Por otro lado, se ha demostrado que pueden degradar las anafilotoxinas C3a y C5a, las inmunoglobulinas IgG e IgA, y la interleucina 18 (IL-18) [Meléndez-López, *et al.*, 2007].

## 1.2. Cisteína proteinasas como catalizadores biológicos

### 1.2.1. Proteinasas

Las proteinasas, enzimas proteolíticas (catalizan la hidrólisis de enlaces amida en proteínas y péptidos), están involucradas en digestión de sustratos, activación de pro-enzimas, liberación fisiológica de péptidos activos y activación de complemento, entre otras funciones [Sajid y McKerrow, 2002]. Las proteinasas están agrupadas en cuatro categorías de acuerdo al residuo de aminoácido localizado en su sitio activo (esencial para su catálisis), el rango de pH óptimo para su actividad, la homología de secuencias polipeptídicas y la similitud de inhibidores. De acuerdo a lo anterior, las proteinasas se clasifican en serina, cisteína, aspártico y metalo proteinasas (Tabla 2) [Rawlings y Barrett, 1993].

Las proteinasas han sido identificadas en casi todos los sistemas biológicos, desde virus hasta vertebrados. Los proyectos genoma han demostrado que el contenido de proteinasas puede ser hasta de un 2% del

**Tabla 2.** Clasificación de proteinasas.

Proteinasa	Sitio activo	pH óptimo
Serina	Ser; His	7 – 9
Cisteína	Cys	4 – 7
Aspártico	Asp; Tyr	< 5
Metalo	ión metálico	7 – 9

contenido génico. Se ha estimado que sin las proteinasas, como catalizadores biológicos, la hidrólisis del enlace peptídico se efectuaría en centenares de años: una proteinasa puede degradar hasta un millón de enlaces peptídicos por segundo. La catálisis puede ser llevada a cabo dentro del polipéptido (endopeptidasa) o en los extremos amino y carboxilo terminal (exopeptidasa) [Sajid y McKerrow, 2002].

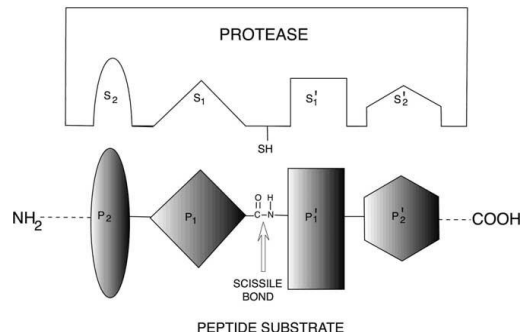
### **1.2.2. Cisteína proteinasas**

En eucariotas, las cisteína proteinasas (CP) están principalmente involucradas en los sistemas de degradación lisosomal de proteínas, pero también juegan un papel extracelular importante [Turk, *et al.*, 2000]. Además del procesamiento del péptido señal, el cual es requerido para el transporte citosol-RE, las CP requieren de la remoción de un fragmento amino terminal (también llamado dominio “pro”) para producir la enzima activa [Karrer, *et al.*, 1993]. El dominio “pro” juega un papel importante: (i) inhibidor de la actividad enzimática; (ii) facilitador del correcto plegamiento de las CP recientemente sintetizadas; y (iii) protector de los efectos desnaturalizantes ocasionados por los cambios repentinos de las condiciones de pH medio-ambientales intra- o extra-celulares [Lalmanach, *et al.*, 1998].

Los sitios activos de las CP se forman de al menos tres residuos: Cys, His y Asn [Rawlings y Barrett, 1993]. La mayoría de las CP poseen similitud a las catepsinas de mamífero. Las enzimas parecidas a catepsinas H y L contienen la secuencia ERFNIN (E[X]<sub>3</sub>R[X]<sub>3</sub>F[X]<sub>2</sub>N[X]<sub>3</sub>I[X]<sub>3</sub>N; donde X representa cualquier residuo de aminoácido). Sin embargo, las enzimas análogas a catepsina B carecen o contienen solo una parte de esa secuencia, dando como resultado dominios “pro” de menor longitud. Además, se sugiere que la secuencia ERFNIN funciona como inhibidor de la actividad enzimática, ya que al ser removida, las CP se activan [Karrer, *et al.*, 1993].

### **1.2.3. Mecanismo de acción proteolítica**

Previo a la hidrólisis del enlace peptídico, las CP deben unir los sustratos a su sitio activo. La eficiencia de la unión es una función tanto del ambiente celular como de la naturaleza química del sustrato. Algunos factores importantes que afectan la interacción incluyen tamaño,



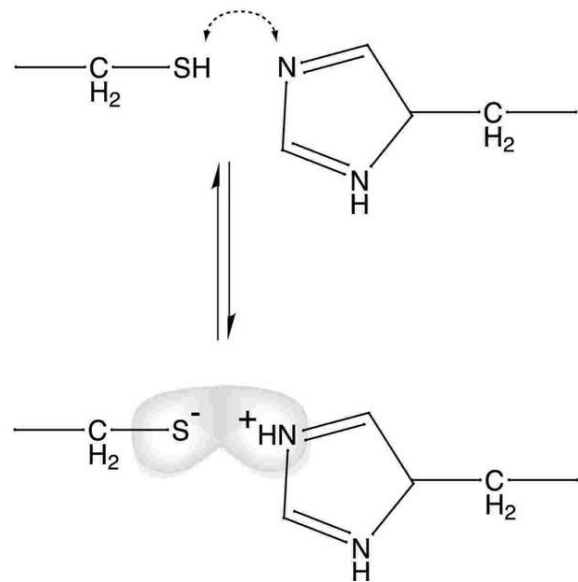
**Figura 2.** Representación gráfica de la interacción del sustrato con una cisteína proteínasa.

Los aminoácidos del sustrato se denotan como "P" y los sitios donde interaccionan en la proteínasa se designan como "S". El tiol de la Cys del sitio activo se representa como "SH", y el correspondiente enlace peptídico que será hidrolizado se identifica con una flecha.

polaridad, carga, hidrofobicidad y complementariedad geométrica. A pesar de que sólo un enlace peptídico es hidrolizado, un número de residuos de aminoácido en ambos lados del sitio de corte es crítico para la especificidad enzimática (Figura 2) [Sajid y McKerrow, 2002].

Las secuencias que directamente flanquean el sitio activo de las CP, también están altamente conservadas para mantener su especificidad catalítica. Estas regiones conservadas han sido utilizadas para clasificar las CP y para clonar genes ortólogos en una estrategia de genética inversa. La especificidad del sustrato puede ser explorada para la identificación de los inhibidores selectivos anti-proteínasa y, en algunos casos, para predecir el sustrato natural [Sajid y McKerrow, 2002].

Las CP requieren del residuo de Cys en el sitio activo para la hidrólisis. El grupo tiol es favorecido como nucleófilo debido a su proximidad con el grupo imidazol (de la His del sitio activo), el cual actúa como base/aceptor del protón. Los grupos tiol e imidazol de las cadenas laterales de Cys e His, respectivamente, forman un par de relevo cargado tiolato-imidazolio (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de la proximidad en el sitio activo de una cisteína proteínasa.

Se muestra: (1) el tiol de Cys y el imidazol de His, y el equilibrio con (2) el par de relevo cargado tiolato-imidazolio. El área sombreada representa una nube de densidad electrónica deslocalizada.

Con frecuencia este sistema es estabilizado por un residuo de Asn (altamente conservada). Por otro lado, una Gln (también altamente conservada) forma un oxianión, un elemento crucial en la formación del centro electrofílico. Los dos grupos ionizables (tiolato–imidazolio) confieren un amplio intervalo de pH para la actividad enzimática [Musil, *et al.*, 1991].

### **1.3. Cisteína proteinasas de parásitos**

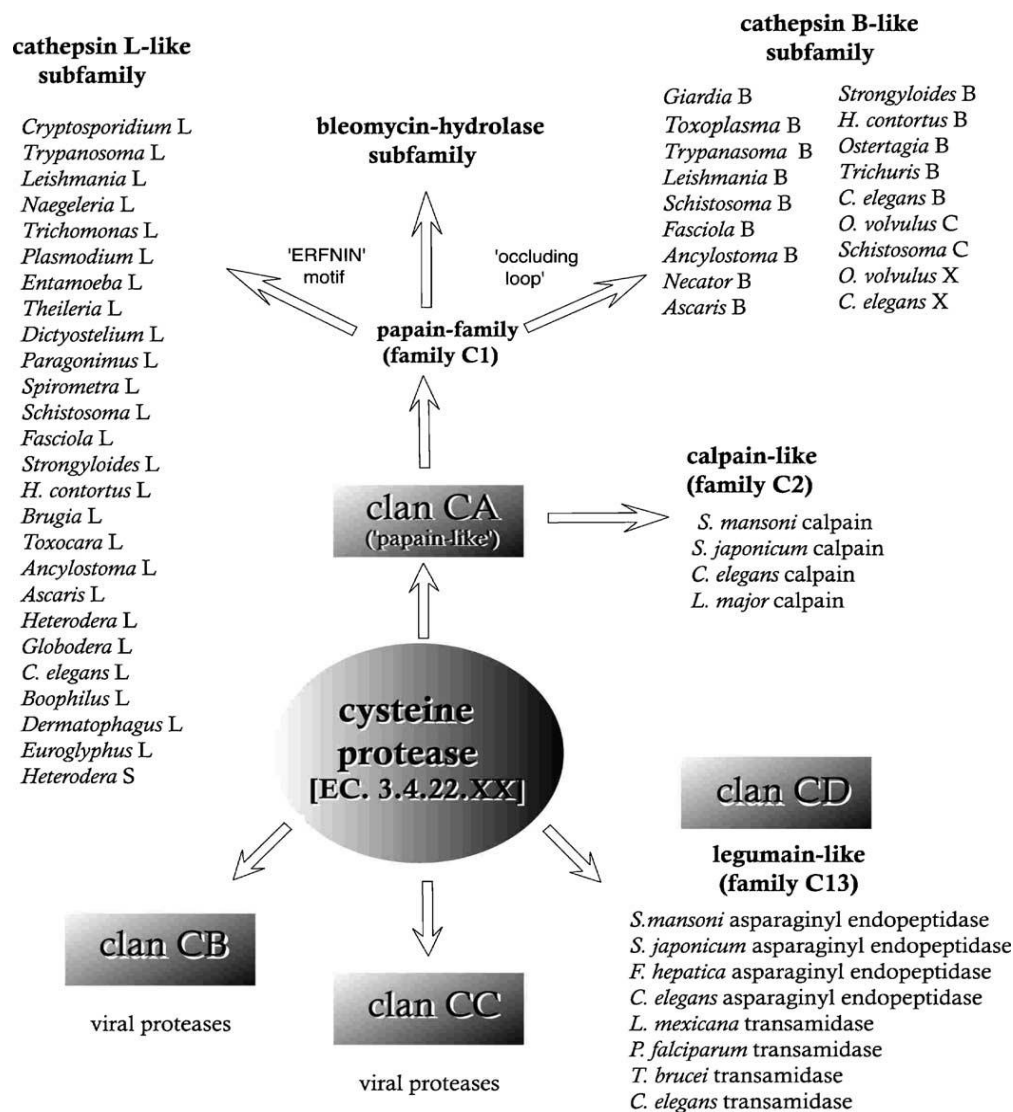
Está bien establecido que muchas proteinasas de parásitos son blancos para el desarrollo de vacunas y el diseño de fármacos terapéuticos. Existe especial interés en las CP debido a que juegan un papel importante en el ciclo de vida y patogenicidad de muchos parásitos. Su diversidad funcional se deriva de su nucleofilicidad, adaptabilidad a diferentes sustratos y estabilidad ante diferentes ambientes biológicos. Además, se ha observado que estas proteinasas participan en varios mecanismos celulares tales como la evasión inmune, activación enzimática, invasión de tejidos, enquistamiento/desenquistamiento, eclosión y muda [Sajid y McKerrow, 2002].

#### **1.3.1. Clasificación y evolución**

Las CP de parásitos pueden dividirse en dos grupos principales, denominados como clanes CA y CD. Muchos parásitos expresan proteinasas del clan CA, parecidas a papaína; el cuál se subdivide en las familias C1 (parecidas a catepsinas B y L) y C2 (parecidas calpaína); sin embargo, también existen parásitos que expresan proteinasas del clan CD, familia C13 (parecidos a legumaína) (Figura 4) [Rawlings y Barrett, 1993].

Convencionalmente, las proteinasas son asignadas a clanes y familias, dependiendo de diversas características, las cuales incluyen la similitud de secuencias y la especificidad bioquímica a pequeños sustratos peptídicos. Existe otra clasificación más robusta, basada en la homología de las secuencias peptídicas que involucran directamente la Cys y la His del sitio activo, y cuando se conocen, la Asn catalítica y la Gln del oxianión [Rawlings y Barrett, 1993].

El orden de los residuos catalíticos Cys/His (clan CA) o His/Cys (clan CD) en la secuencia primaria de CP de parásitos sugiere que éstas surgieron de eventos evolutivos independientes



**Figura 4.** Diagrama esquemático de la superfamilia de cisteína proteinasas. Se destacan las subfamilias relacionadas con enzimas de parásitos.

[Sajid y McKerrow, 2002]. Dentro de la superfamilia de proteinasas, se piensa que el progenitor de las CP sufrió una rápida e inicial duplicación génica, generando proteínas parálogas. Este evento antecede la divergencia procarionota/eucariota. La duplicación génica es también aparente en algunas CP de mamíferos. La diversificación simultánea ocurrió bajo selección natural positiva, ya que las mutaciones surgieron más rápidamente de lo que se esperaba aleatoriamente [Hughes, 1994].

### **1.3.2. Invasión del hospedero y evasión inmune**

Durante la migración dentro y entre las células del hospedero, los parásitos usan proteinasas para favorecer la invasión y migración tisular. Este proceso posee muchas similitudes con la invasión de las células tumorales. Existen muchos ejemplos de serina-proteasas y metalo-proteasas que están involucradas en la invasión tisular de parásitos; sin embargo, muy pocas CP han sido identificadas en este mecanismo. Por ejemplo, las CP de *E. histolytica* han sido relacionadas en la invasión y destrucción de tejidos; por lo que son consideradas como factores de virulencia importantes para la amibiasis [Que y Reed, 2000].

Las proteinasas han sido ampliamente consideradas como auxiliares de los parásitos en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero, principalmente mediante la degradación de los efectores inmunológicos o modulando la respuesta inmune. Existe un gran número de evidencias que demuestran que las CP degradan inmunoglobulinas *in vitro*; sin embargo, para confirmar este papel *in vivo* se requiere de un análisis de la depuración inmunológica del parásito [Sajid y McKerrow, 2002].

### **1.3.3. Vacunas y terapia farmacológica**

Mediante estudios *in vitro* se ha observado que anticuerpos dirigidos contra CP pueden tener efecto inhibitorio sobre su actividad proteolítica [Smith, *et al.*, 1994]; además, algunos estudios *in vivo* han demostrado protección inmunológica usando epítopes de CP como vacunas. Por otro lado, debido a la presencia ubicua de las CP tanto en parásitos protozoarios como helmintos, éstas representan blancos interesantes para el desarrollo de fármacos anti-parasitarios [Jankovic, *et al.*, 1996].

Muchos estudios se han enfocado hacia el clan CA (parecidas a papaína) de la familia de CP; principalmente porque (i) existen homólogos de esta familia en casi todos los organismos parásitos: sí el mecanismo catalítico es idéntico, es razonable asumir que un inhibidor puede tener potencial contra un número diferente de enfermedades parasitarias; (ii) es mayor el conocimiento en relación a la estructura-función y el mecanismo catalítico en esta familia de enzimas: lo que proporciona los fundamentos para el desarrollo racional de fármacos sintéticos (asistido por computadora); (iii) muchas de las enzimas parasitarias tienen homólogos en

sistemas de mamíferos: lo que implica la existencia de una considerable cantidad de esfuerzos para evaluar la eficacia, farmacocinética y toxicidad para un grupo de inhibidores de CP, incluyendo algunos agentes candidatos anti-parasitarios. Sin embargo, ante la gran promesa que representa esta familia de CP como blanco farmacológico, existen algunas preguntas que deben ser contestadas. Primero y ante todo, como pueden desarrollarse fármacos que sean selectivos para los blancos parasitarios, ya que existen homólogos de éstas en humanos [Sajid y McKerrow, 2002].

#### **1.4. Cisteína proteinasas de *Entamoeba histolytica***

Las cisteína proteinasas (EC 3.4.22) de *E. histolytica* (EhCPs) son peptidasas que exhiben la habilidad de degradar una gran variedad de sustratos proteicos desnaturalizados y nativos, generando productos de degradación similares; además, comparten características de reacción análogas a las catepsinas B de mamífero [Scholze y Werries, 1986]. Las EhCPs pertenecen a la superfamilia de papaína y consisten de 3 dominios: la secuencia “pre” (péptido señal); el dominio “pro”; y el dominio “catalítico” (enzima madura). El polipéptido pro-enzima contiene 7 residuos de cisteína: (i) uno en su sitio activo, y (ii) seis altamente conservados, involucrados en la formación de tres enlaces disulfuro, los cuales estabilizan la estructura terciaria [Bruchhaus, *et al.*, 2003].

Existen diferencias en estructura y expresión de cisteína proteinasas homólogas entre *E. histolytica* y *E. dispar* (no patógena): las secuencias de ADN son 84% similares, en tanto que las secuencias polipeptídicas son 83% y 85% semejantes, a nivel de la pre-pro-enzima y la enzima madura, respectivamente. Sin embargo, el nivel de expresión de los ARN mensajeros es consistentemente de 10 a 100 veces mayor en *E. histolytica*; además, no existen secuencias homólogas a los productos génicos EhCP1 y EhCP5 en *E. dispar*, proteinasas que representan verdaderos factores de virulencia en *E. histolytica* [Tannich, *et al.*, 1991]. Interesantemente, el genoma de *E. histolytica* contiene un familia de 50 secuencias codificantes para cisteína proteinasas [Tillack, *et al.*, 2007].

#### 1.4.1. Función

Las enzimas *EhCPs* son importantes factores de virulencia secretadas durante el proceso patológico de la amibiasis. Las *EhCPs* juegan un papel clave en la lisis de tejidos del hospedero [Lourenssen, *et al.*, 2010], modulan la respuesta inmune mediada por células [Hirata, *et al.*, 2007], y estimulan la sobre-expresión de citocinas de inflamación en las células epiteliales humanas [Hou, *et al.*, 2010]; además, tienen una función importante en la formación de abscesos hepáticos amibianos [Tillack, *et al.*, 2006]. Por otro lado, las *EhCPs* son las proteasas encargadas de degradar las inmunoglobulinas IgG e IgA, la interleucina IL-18 y las anafilotoxinas C3a y C5a, produciendo fragmentos inactivos para evadir la respuesta inmune [Meléndez-López, *et al.*, 2007].

#### 1.4.2. Expresión

Las *EhCP* son biosintetizadas como precursores polipeptídicos con un péptido señal hidrofóbico de 12 a 20 residuos (secuencia “pre”), un dominio “pro” y un dominio “catalítico”, correspondiente a la enzima madura (Figura 5).

Mediante un análisis post-genómico, 50 peptidasas fueron identificadas como la superfamilia de *EhCPs* [Tillack, *et al.*, 2007]. Dentro ésta, el clan CA consta de 47 secuencias y el resto pertenece al clan CE. El clan CA está integrado por las familias C1, C2, C19, C54 y C54; donde, la familia C1 (de 37 secuencias) se subdivide en 3 clases distintas: A, B y C (ver Tabla 3).

La clase *EhCP-A*, la cual contiene los principales factores de virulencia amibiana, se caracteriza por dominios “pro” y “catalíticos” cortos (72-90 y 190-254 residuos, respectivamente). Considerando que la clase *EhCP-C* fue descrita recientemente y sus características estructurales no han sido determinadas, las clases *EhCP-A* y *EhCP-B* son similares



**Figura 5.** Representación esquemática de los dominios estructurales de las cisteína proteínasas de *E. histolytica*.

a las catepsinas-L, formando un centro catalítico de 4 residuos: Gln, Cys, His y Asn y con la cisteína en el sitio activo. Por otro lado, el dominio “pro” consiste de una secuencia estrecha que contiene el motivo ERFNIN (Glu-X3-Arg-X2-[Val/Ile]-Phe-X2-Asn-X3-Ile-X3-Asn), el cual ha sido identificado en una posición similar en las catepsinas-B y -L.

Los genes codificantes de las proteinasas *EhCP1*, *EhCP2* y *EhCP5* son expresados a

**Tabla 3.** Clasificación del clan CA-C1 de la familia de cisteína proteinasas de *E. histolytica*.

NOTACIÓN: (\*) recién identificada; (?) no identificada; (NA) no anotada; (ND) no determinada.

<b>Proteína (nombre común)</b>	<b>No. Acceso (NCBI™)</b>	<b>Longitud (aa) (pre,pro,madura)</b>	<b>Sitio Activo (residuos)</b>	<b>Motivos Conservados</b>
EhCP-A1 (EhCP1)	XP_650156	315 (13,80,222)	QCHN	ERFNIN, DWR
EhCP-A2 (EhCP2)	XP_650642	315 (13,80,222)	QCHN	ERFNIN, DWR
EhCP-A3 (EhCP3)	XP_653254	308 (13,79,216)	QCHN	ERFNIN, DWR
EhCP-A4 (EhCP4)	XP_656602	311 (20,73,218)	QCHN	ERFNIN, DWR
EhCP-A5 (EhCP5)	XP_650937	318 (21,72,225)	QCHN	ERFNIN, DWR, RGD
EhCP-A6 (EhCP6)	XP_657364	320 (17,79,224)	HCHN	ERFNIN, DWR
EhCP-A7 (EhCP8)	XP_648996	315 (13,80,222)	QCHN	ERFNIN, DWR
EhCP-A8 (EhCP9)	XP_657446	317 (15,82,220)	QCHN	ERFNIN, DWR
EhCP-A9 (EhCP10)	XP_655675	297 (17,90,190)	QCHN	ERFNIN, DWR
EhCP-A10 (EhCP17)	XP_651147	420 (18,148,254)	QCHN	ERFNIN, DWR
EhCP-A11 (EhCP19)	XP_651690	324 (17,79,228)	QCIN	ERFNIN, DWR
EhCP-A12*	XP_653823	317 (14,83,220)	ND	ERFNIN, DWR
EhCP-A13*	NA	ND	ND	ND
EhCP-B1 (EhCP7)	XP_651581	426 (15,106,305)	QCHN	ERFNIN, PCNC
EhCP-B2 (EhCP11)	AAO03568	431 (15,106,310)	QCSN	ERFNIN, PCNC
EhCP-B3 (EhCP12)	XP_656747	474 (16,107,351)	QCHN	ERFNIN, PCNC
EhCP-B4 (EhCP13)	XP_648501	379 (16,105,258)	QCHN	ERFNIN, PCNC
EhCP-B5 (EhCP14)	XP_652671	434 (12,108,314)	QCHN	ERFNIN, PCNC
EhCP-B6 (EhCP15)	XP_652465	300 (14,55,231)	QCHN	PCNC
EhCP-B7 (EhCP16)	XP_650400	650 (18,144,488)	QCHN	ERFNIN, PCNC
EhCP-B8 (EhCP18)	XP_651049	473 (15,105,353)	QCHN	ERFNIN, PCNC, RGD
EhCP-B9 (EhCP112)	XP_652993	446 (19,112,315)	QCHN	ERFNIN, PCNC, RGD
EhCP-B10*	XP_648306	372 (incompleta)	QCHN	ERFNIN, PCNC, RGD
EhCP-B11*	XP_648013	133 (incompleta)	Q???	PCNC
EhCP-C1*	XP_654453	586 (ND)	QCIN	HS(X)6ICP
EhCP-C2*	XP_656632	567 (ND)	QCHN	HS(X)6ICP
EhCP-C3*	XP_655128	572 (ND)	QCHN	HS(X)6LCP
EhCP-C4*	XP_655800	502 (ND)	QCHN	LT(X)6LCP
EhCP-C5*	XP_654800	557 (ND)	QCHN	IS(X)6ICP
EhCP-C6*	XP_651553	557 (ND)	QCHD	HS(X)6LCA
EhCP-C7*	XP_657273	595 (ND)	QCHN	IS(X)6LCP
EhCP-C8*	XP_655479	627 (ND)	QCHN	IS(X)6ICP
EhCP-C9*	XP_655011	518 (ND)	QCHN	HS(X)6ICP
EhCP-C10*	XP_654829	530 (ND)	QCHN	IS(X)6ICP
EhCP-C11*	XP_648083	526 (ND)	ND	HS(X)6ICP
EhCP-C12*	XP_650829	473 (ND)	ND	MS(X)6LCG
EhCP-C13*	XP_656556	564 (ND)	QCHN	VS(X)6RCG

niveles altos, por lo que son las responsables de más de un 90% del total de la actividad proteínica en trofozoitos; sin embargo, disminuyen sustancialmente en el estadio de quiste. Por otro lado, las proteinasas *EhCP6*, *EhCP3*, *EhCP8*, *EhCP9*, *EhCP17*, *EhCP19*, *EhCP11*, *EhCP4*, *EhCP16* y *EhCP17* son expresadas a nivel medio, lo que indica que solo se requiere un subgrupo de *EhCPs* para sustentar el crecimiento *in vitro* [Bruchhaus, *et al.*, 2003, Tillack, *et al.*, 2007; Ehrenkauf, *et al.*, 2007].

#### **1.4.3. Inhibidores**

*E. histolytica* posee dos genes codificantes para inhibidores de cisteína proteinasas (ICP) independientes, designados como *EhICP1* y *EhICP2* (presentan 28% de homología en su secuencia nucleotídica), los cuales muestran distintas propiedades bioquímicas y localización intracelular; ambos presentan el motivo NPSTG (el cual se encuentra directamente relacionado con la capacidad de inhibir reversiblemente las CPs), pero solo *EhICP2* presenta un péptido señal.

*EhICP1* muestra una  $K_i$  similar frente a *EhCP1*, *EhCP2* y *EhCP5*, en tanto *EhICP2* muestra una  $K_i$  frente a *EhCP1* y *EhCP2*, pero 10-90 veces menor, en comparación frente a *EhCP5*, lo cual indica que *EhICP2* regula predominantemente a *EhCP5*. Estos inhibidores interfieren con el procesamiento y maduración de las *EhCP* y, por lo tanto, su secreción; sin embargo, no inhiben la enzima en su forma madura [Sato, *et al.*, 2006].

### **1.5. Cisteína proteínica 5 de *E. histolytica* (*EhCP5*)**

#### **1.5.1. Genética**

El gen CP5 está presente y posicionalmente conservado, en *E. histolytica* y *E. dispar*, mostrando una homología de secuencias nucleotídicas de 80%; sin embargo, el gen *EdCP5* está altamente degenerado, no contiene un marco abierto de lectura definido y contiene numerosas inserciones-delecciones, resultando en múltiples codones de paro, lo que explica que la secuencia homóloga a CP5 no se exprese en *E. dispar* [Willhoeft, *et al.*, 1999].

**Figura 6.** Secuencia nucleotídica, y polipeptídica deducida, del gen codificante para la cisteína proteinasa 5 de *Entamoeba histolytica* (*EhCP5*).

La secuencia codificante para el péptido se muestra sombreada en amarillo. Los aminoácidos se denotan en código de una letra.

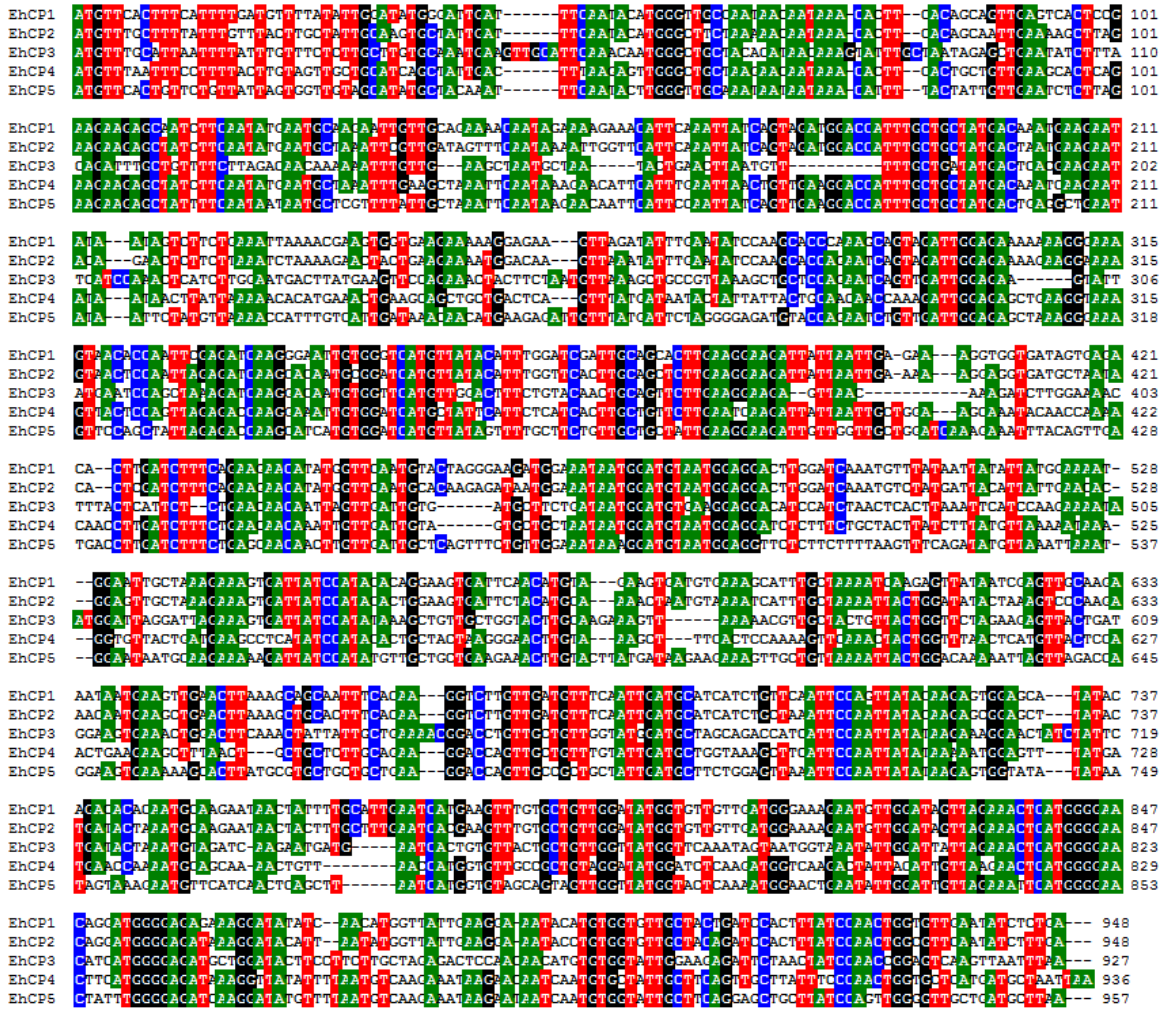
atg	ttc	act	ggt	ctg	tta	tta	gtg	ggt	gta	gca	tat	gct	aca	aat	ttc	aat	act	tggt	ggt	60
<b>M</b>	<b>F</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>	T	N	F	N	T	W	V	
gca	aat	aat	aat	aaa	cat	ttt	act	att	ggt	gaa	tct	ctt	aga	aga	aga	gct	att	ttc	aat	120
A	N	N	N	K	H	F	T	I	V	E	S	L	R	R	R	A	I	F	N	
aat	aat	gct	cgt	ttt	att	gct	aaa	ttc	aat	aag	aac	aat	tca	ttc	caa	tta	tca	ggt	gaa	180
N	N	A	R	F	I	A	K	F	N	K	N	S	F	Q	L	S	V	E		
gga	cca	ttt	gct	gct	atg	act	gag	gct	gaa	tat	aat	tct	atg	tta	aaa	cca	ttt	gtc	att	240
G	P	F	A	A	M	T	E	A	E	Y	N	S	M	L	K	P	F	V	I	
gat	aaa	caa	cat	gaa	gag	att	ggt	tat	gat	tct	agg	gga	gat	gta	cca	gaa	tct	ggt	gat	300
D	K	Q	H	E	E	I	V	Y	D	S	R	G	D	V	P	E	S	V	D	
tggt	aga	gct	aaa	ggg	aaa	ggt	cca	gct	att	aga	gac	caa	gca	tca	tgt	gga	tca	tgt	tat	360
W	R	A	K	G	K	V	P	A	I	R	D	Q	A	S	C	G	S	C	Y	
agt	ttt	gct	tct	ggt	gct	gct	att	gaa	gga	aga	ttg	ttg	ggt	gct	gga	tca	aag	aaa	ttt	420
S	F	A	S	V	A	A	I	E	G	R	L	L	V	A	G	S	K	K	F	
aca	ggt	gat	gac	ctt	gat	ctt	tct	gag	caa	caa	ctt	ggt	gat	tgc	tca	ggt	tct	ggt	gga	480
T	V	D	D	L	D	L	S	E	Q	Q	L	V	D	C	S	V	S	V	G	
aat	aaa	gga	tgt	aat	gga	ggt	tct	ctt	ctt	tta	agt	ttc	aga	tat	ggt	aaa	tta	aat	gga	540
N	K	G	C	N	G	G	S	L	L	L	S	F	R	Y	V	K	L	N	G	
ata	atg	caa	gaa	aaa	gat	tat	cca	tat	ggt	gct	gct	gaa	gaa	act	tgt	act	tat	gat	aag	600
I	M	Q	E	K	D	Y	P	Y	V	A	A	E	E	T	C	T	Y	D	K	
aag	aaa	ggt	gct	ggt	aaa	att	act	gga	caa	aaa	tta	ggt	aga	cca	gga	agt	gaa	aaa	gca	660
K	K	V	A	V	K	I	T	G	Q	K	L	V	R	P	G	S	E	K	A	
ctt	atg	cgt	gct	gct	gct	gaa	gga	cca	ggt	gcc	gct	gct	att	gat	gct	tct	gga	ggt	aaa	720
L	M	R	A	A	A	E	G	P	V	A	A	A	I	D	A	S	G	V	K	
ttc	caa	tta	tat	aag	agt	ggt	ata	tat	aat	agt	aaa	gaa	tgt	tca	tca	act	cag	ctt	aat	780
F	Q	L	Y	K	S	G	I	Y	N	S	K	E	C	S	S	T	Q	L	N	
cat	ggt	gta	gca	gta	ggt	ggt	tat	ggt	act	caa	aat	gga	act	gaa	tat	tggt	att	ggt	aga	840
H	G	V	A	V	V	G	Y	G	T	Q	N	G	T	E	Y	W	I	V	R	
aat	tca	tggt	gga	act	att	tggt	gga	gat	caa	gga	tat	ggt	tta	atg	tca	aga	aat	aag	aat	900
N	S	W	G	T	I	W	G	D	Q	G	Y	V	L	M	S	R	N	K	N	
aat	caa	tgt	ggt	att	gct	tca	gga	gct	gct	tat	cca	ggt	ggg	ggt	gct	gat	gct	taa	957	
N	Q	C	G	I	A	S	G	A	A	Y	P	V	G	V	A	D	A	*		

En conjunto con *EhCP1* y *EhCP2*, *EhCP5* es una proteinasa mayormente expresada en el estadio de trofozoito [Ehrenkaufer, *et al.*, 2007]. La Figura 6 muestra la secuencia nucleotídica y polipeptídica codificada, del gen *EhCP5* (NCBI™ X91644). El gen consta de 957 nucleótidos y no contiene intrones.

La Figura 7 muestra un alineamiento múltiple de las secuencias de los genes *EhCP1*, *EhCP2*, *EhCP3* y *EhCP4* en comparación con *EhCP5*. Es evidente la alta homología entre estas proteinasas amebianas; aun más, la comparación demostró que *EhCP5* es 68% idéntico a *EhCP4*, 64% a *EhCP2*, 63% a *EhCP1* y 59% a *EhCP3*, respectivamente.

**Figura 7.** Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas codificantes para *EhCP1*, *EhCP2*, *EhCP3* y *EhCP4* en comparación con *EhCP5*.

Los residuos en bloque son >80% idénticos. Los bloques fueron coloreados utilizando el código estándar para cada nucleótido: A, verde; C, azul; G, negro; T, rojo.

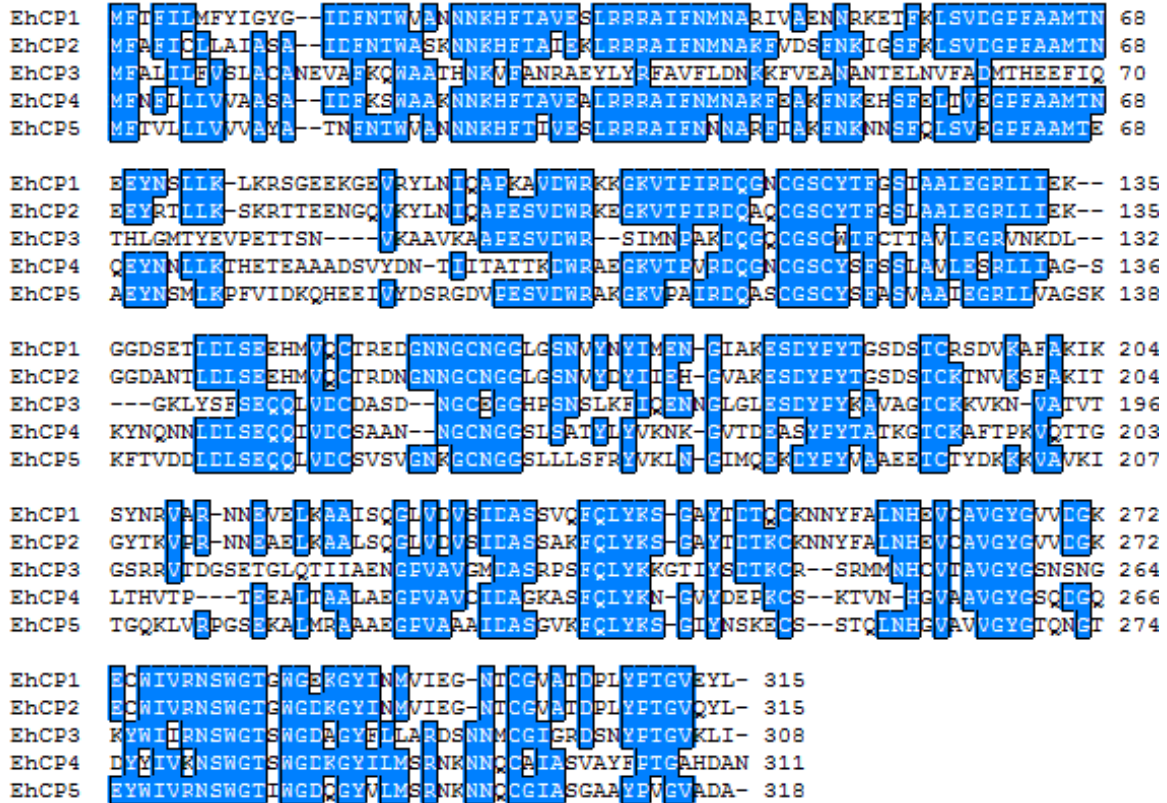


### 1.5.2. Bioquímica

El gen de *EhCP5* codifica para un precursor polipeptídico de 318 de residuos de aminoácido con un PM teórico de 34.7 KDa. La Figura 8 muestra un alineamiento múltiple de las secuencias polipeptídicas de los precursores de las secuencias de *EhCP1*, *EhCP2*, *EhCP3* y *EhCP4* en comparación con *EhCP5*. La comparación demostró que *EhCP5* es 56% idéntico a *EhCP4*, 51% a *EhCP1*, 50% a *EhCP2* y 36% a *EhCP3*, respectivamente.

**Figura 8.** Alineamiento múltiple de las secuencias polipeptídicas precursoras de *EhCP1*, *EhCP2*, *EhCP3* y *EhCP4* en comparación con *EhCP5*.

Los residuos en bloque son >60% idénticos.



El análisis de estructura primaria de la proteína *EhCP5* mostró que la secuencia madura contiene 7 residuos de cisteína, de los cuales se predice que 6 de éstos forman 3 enlaces disulfuro y la cisteína catalítica, localizada en la posición 119, es la que se encuentra en el sitio activo (Figuras 9 y 10) [Bruchhaus, *et al.*, 2003].

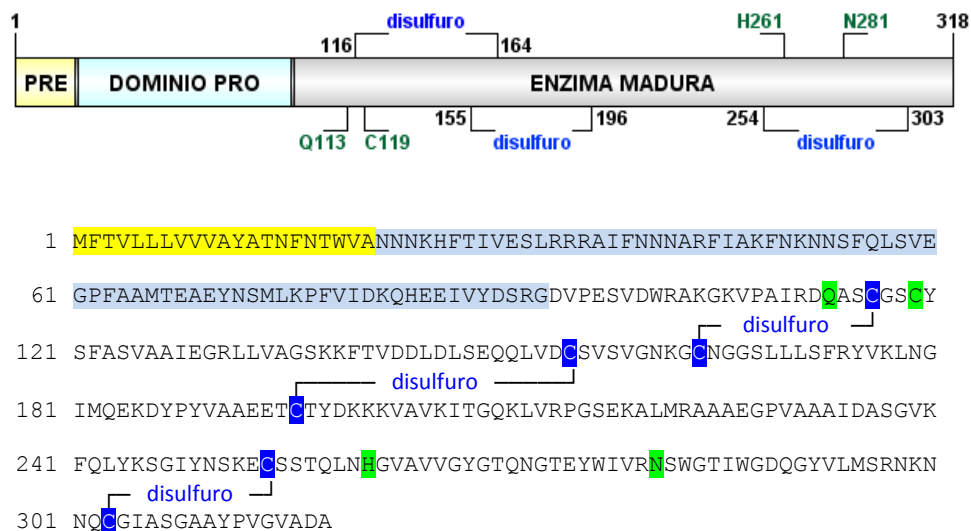
### 1.5.3. Patología

De todo el arsenal de CP amibianas, *EhCP5* es la mayormente secretada y principalmente localizada en la superficie amibiana; sin embargo, se encuentra intrínsecamente de manera inactiva y es secretada tanto en su forma pro-madura (pro-*EhCP5*) como madura (*EhCP5*). Además, el dominio pro se caracteriza por contener:



**Figura 9.** Representación en listones de la estructura 3D de la enzima EhCP5.

Tal como se predice mediante homología de secuencias utilizando como molde la estructura cristalográfica de la pro-catepsina L de humano (PDB™ ID 1CJL). La visualización se realizó utilizando el programa UCSF Chimera [Pettersen, *et al.*, 2004].



**Figura 10.** Secuencia precursor polipeptídico de EhCP5.

En ambos paneles muestran la estructura y organización de dominios. Además, se señalan los residuos de cisteína que se predice forman un enlace disulfuro (azul) y los residuos QCHN del sitio catalítico (verde), incluyendo la cisteína catalítica.

- (i) una secuencia <sup>52</sup>NNS<sup>54</sup>, parecida al motivo NX(S/T), por lo que puede ser sufrir modificaciones post-traduccionales mediante glicosilación; y
- (ii) el motivo <sup>92</sup>RGD<sup>94</sup>, el cual reconoce el receptor de integrina  $\alpha_v\beta_3$  [Hou, *et al.*, 2010].

Funcionalmente, *EhCP5* tiene actividad eritrofagocítica [Ankri, *et al.*, 1998], degrada mucina [Moncada, *et al.*, 2006], y es capaz de digerir componentes de la matriz extracelular, albúmina sérica y hemoglobina; además, es activa contra los péptidos sintéticos Z-Arg-Arg-pNA, Z-Ala-Arg-Arg-pNA, pero inactiva contra Z-Phe-Arg-pNA [Hellberg, *et al.*, 2002].

Para evadir el sistema inmune, *EhCP5* digiere al precursor de interleucina 18 (pro-IL-18), impidiendo la producción de INF- $\gamma$  [Que, *et al.*, 2003]. Como factor de virulencia, la sobreexpresión de *EhCP5* incrementa la patogenicidad *in vivo* de *E. histolytica* y es la única *EhCP* que induce significativamente el tamaño de los abscesos hepáticos [Tillack, *et al.*, 2006].

## **1.6. Plegamiento de proteínas**

### **1.6.1. Plegamiento *in vivo***

La estructura tridimensional nativa y la estabilidad de una proteína está determinada principalmente por su secuencia de aminoácidos (estructura primaria); también tienen un papel en la estructura y estabilidad algunas modificaciones post-traduccionales y las propiedades del medio ambiente, tales como pH y fuerza iónica [Anfinsen, 1972].

Aunque algunas proteínas pueden plegarse por sí solas, la mayoría requieren de moléculas auxiliares para adquirir su conformación más estable; las cuales pueden ser proteínas catalíticas de plegamiento, que aceleran la reacción, o chaperonas, que inhiben los pasos de plegamiento de vías no reproducibles, impidiendo la agregación de intermediarios del plegamiento o retardan la iniciación del plegamiento hasta que la secuencia apropiada ha sido traducida [Kim, *et al.*, 1992].

Aunque la información precisa para el plegamiento correcto de una proteína reside en su secuencia primaria, en el interior de la célula existe una gran cantidad de proteínas por lo que se promueve la aparición de problemas de agregación, debido a la presencia de intermediarios que tienen regiones hidrofóbicas expuestas y que pueden unirse formando complejos de proteínas mal plegadas. Para evitar esto, durante el plegamiento de proteínas posee un estricto “control de calidad”, el cual se lleva a cabo a través de proteínas auxiliares del correcto plegamiento, cuya principal función es evitar la formación de agregados; estas

proteínas auxiliares han sido agrupadas en la familia de plegasas y chaperonas [Fasio y Sitia, 2008]. Una de las principales funciones atribuidas a esta familia es 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].

En células eucariotas, el retículo endoplásmico es el principal compartimiento celular donde se lleva a cabo el plegamiento de polipéptidos nacientes, ya que provee un medio ambiente adecuado: (i) altamente oxidativo (contiene pequeñas moléculas redox, tales como glutationes) [Lundstrom, *et al.*, 1990], y (ii) rico en proteínas auxiliares del plegamiento (ya que es un proceso asistido *in vivo*) [Kim, *et al.*, 1992]. Además del RE, 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].

### **1.6.2. Plegamiento *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 periplasma contiene las características medio-ambientales necesarias para tal objetivo. La sobreexpresión de una proteína recombinante de plegamiento lento puede sobrepasar la rapidez de las chaperonas celulares o la deficiencia del correcto plegamiento durante su expresión resultando en su exposición e interacción con otros constituyentes hidrofóbicos del medio-ambiente intracelular, estas proteínas mal plegadas son depositadas como partículas insolubles densas llamadas “cuerpos de inclusión” que pueden estar acompañadas de proteínas auxiliares en el plegamiento o son degradadas por el sistema proteolítico ya que se pueden encontrar en las proteasas asociadas a los cuerpos de inclusión [Jurgen, *et al.*, 2010].

Uno de los modelos bacterianos más utilizados para la expresión y purificación de proteínas recombinantes 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, tales como la formación de cuerpos de inclusión y la ausencia de enlaces disulfuro (por su estado altamente reductor); de tal manera que, las proteínas carecen de actividad biológica y ocasionalmente 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 ditioneitol). Posteriormente, los agentes desnaturalizantes y reductores deben ser removidos lentamente en presencia de agentes oxidantes (p.e. glutatiónes) [Singh y Panda, 2005]. Rutinariamente, el replegamiento de proteínas *in vitro* es un procesamiento arduo, 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 ditioneitol), 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. glutatiónes, 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 reacciones son catalizadas por enzimas que pertenecen a la familia de tiorredoxinas (PDI en eucariotas y Dsb en procariotas) y por la enzima peptidil-prolil-(*cis/trans*)-isomerasa (PPI), respectivamente [Shin, 2001]. Además, es importante mencionar el papel de las chaperonas, las cuales pueden desempeñar 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 sólida [Sahdev *et al.*, 2008].

## **1.7. Papel de la enzima PDI en el plegamiento de proteínas**

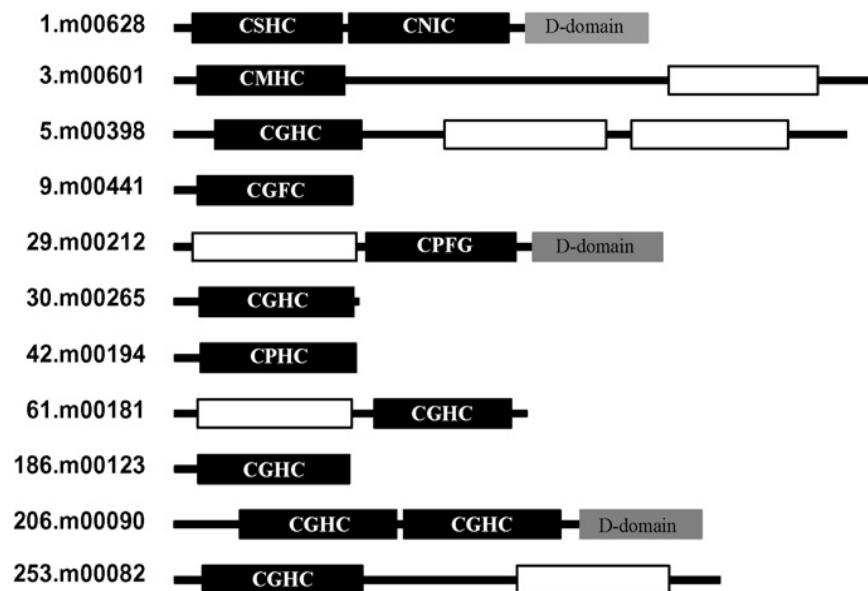
### **1.7.1. Función de PDI en células eucariotas**

Las enzimas proteína disulfuro isomerasas (PDI, EC 5.3.1.4) es una familia de oxidorreductasas eucarióticas, multifuncionales y esenciales, localizada principalmente en el RE, donde cataliza la formación e isomerización de enlaces disulfuro durante el plegamiento de proteínas nacientes [Walker, *et al.*, 1997]. Los dominios funcionales de las enzimas PDI son de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, los cuales son altamente homólogos y muy relacionados a la proteína procariótica tiorredoxina (por lo que se les denomina como dominios tiorredoxina, Trx). El sitio activo de los dominios Trx contiene la secuencia motivo CXXC, en el cual los 2 residuos de Cys se ciclan entre los estados de oxidación del ditiol y disulfuro, actuando como aceptores de electrones en su estado disulfuro (oxidado) o como donador de electrones en su estado ditiol (reducido) [Lundstrom, *et al.*, 1990]. Los dominios no activos confieren propiedades adicionales a las PDI, principalmente la capacidad de unirse a péptidos o

proteínas, consecuentemente, pueden desplegar actividad chaperona o anti-chaperona [Song, *et al.*, 1997].

### 1.7.2. La familia PDI de *Entamoeba histolytica*

Mediante un análisis post-genómico, se identificaron 11 secuencias codificantes para homólogos a enzimas PDI en *E. histolytica*, reportada como la familia PDI amibiana (Figura 11) [Ramos, *et al.*, 2008]. Los homólogos amibianos exhiben: (i) una longitud de 119 a 485 residuos de aminoácidos; (ii) uno o dos dominios Trx funcionales; (iii) una secuencia señal en el extremo amino-terminal; (iv) algunas poseen un tetra-péptido en el extremo carboxilo-terminal, que se asemeja a la secuencia canónica de retención del RE; y (v) otras presentan un dominio D, el cual ha demostrado la posible existencia de un mecanismo alterno de retención intracelular y localización de proteínas en el RE [Monnat, *et al.*, 2000].



**Figura 11.** Representación esquemática de la organización de dominios de la familia de secuencias PDI de *Entamoeba histolytica*.

Se muestra el número de acceso a la izquierda. Los dominios Trx funcionales y no funcionales están representados en rectángulos negros y blancos, respectivamente; además, el dominio D se presenta en gris.

### 1.7.3. PDI de *Entamoeba histolytica* (EhPDI, p38)

La enzima proteína disulfuro isomerasa de *E. histolytica* (EhPDI, No. 206.m00090) es una oxidoreductasa que cataliza la oxidación y el rearrreglo de enlaces disulfuro en polipéptidos. EhPDI es un polipéptido de 337 residuos de aminoácidos, con un PM de 38 KDa, que presenta un péptido señal de 15 aminoácidos, dos dominios Trx funcionales y un dominio D; además, exhibe actividad como oxidoreductasa y chaperona [Ramos, *et al.*, 2005; Mares, *et al.*, 2009; Ramos, *et al.*, 2011]. De los 11 miembros de la familia PDI de *E. histolytica*, es probable que la EhPDI sea la enzima con mayor participación en el en el plegamiento de proteínas amibianas [Ramos, *et al.*, 2011].

Sin embargo, su participación como oxidoreductasa o chaperona, tanto *in vivo* como *in vitro*, ante sustratos amibianos (como cisteína proteinasas, amibaporos o quitinasa, entre otros) aún no ha sido evaluada; por lo que está aún pendiente el establecimiento de EhPDI como su posible blanco farmacológico para el diseño y desarrollo de fármacos anti-amibianos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Analizar las condiciones y los parámetros de replegamiento de la enzima cisteína proteinasa 5 de *E. histolytica* (*EhCP5*), en condiciones medio-ambientales óptimas y asistido por la enzima proteína disulfuro isomerasa de *E. histolytica* (*EhPDI*) mediante ensayos bioquímicos de expresión, purificación y actividad enzimática.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Subclonar la secuencia codificante para el polipéptido *EhCP5* en el plásmido pET28a(+) mediante experimentos de clonación molecular.
2. Expresar la proteína *EhCP5* mediante un ensayo estándar de inducción citosólica en la bacteria *E. coli*.
3. Purificar la proteína *EhCP5* mediante protocolos estándar de cromatografía de afinidad a metales y filtración en gel.
4. Determinar las condiciones medio-ambientales óptimas de replegamiento de la proteína *EhCP5* mediante un tamizado de 8 reacciones y evaluación de la actividad proteolítica recuperada.
5. Determinar los parámetros enzimáticos de replegamiento oxidativo de la proteína *EhCP5* asistido por *EhPDI* mediante ensayos de cinética enzimática.

### 3. MATERIALES Y METODOS

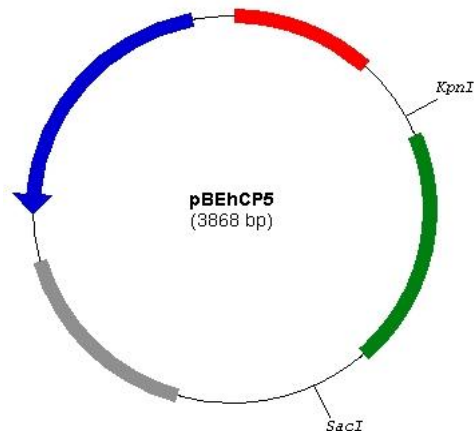
#### 3.1. Reactivos biológicos y químicos

##### 3.1.1. Células y medio de cultivo

La cepa *Escherichia coli* XLI-Blue MRF' (*Stragene*) fue utilizada rutinariamente en los experimentos de biología molecular. Para los ensayos de expresión de proteínas se utilizó la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) (*Novagen*). Para competencia de transfección bacteriana mediante choque térmico, las cepas de *E. coli* fueron preparadas siguiendo el protocolo estándar de cloruro de calcio [Sambrook, *et al.*, 1989]. Los cultivos bacterianos se realizaron en medios líquidos o sólidos (suplementados con agar al 1.7%). Los medios Luria-Bertoni (LB: 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio) se prepararon de acuerdo a las instrucciones estándar de laboratorio [Sambrook, *et al.*, 1989].

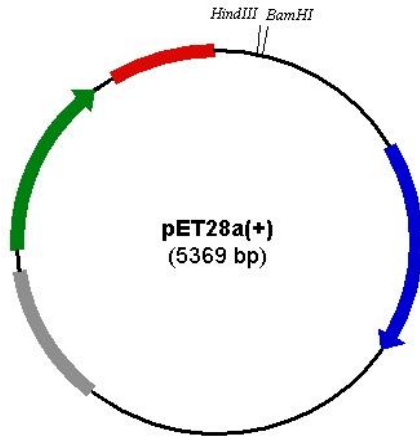
##### 3.1.2. Plásmidos

El plásmido pBEhCP5, portador de la secuencia codificante para el polipéptido EhCP5, fue obtenido de la reserva del Laboratorio de Biotecnología (FCQI, UABC) (Figura 12). Brevemente, a partir de ADN genómico de *E. histolytica* HM1:IMSS, se amplificó la secuencia



**Figura 12.** Representación esquemática del plásmido pBEhCP5.

Se muestran algunas de las características moleculares: rojo, origen de replicación para fagos f1; azul, gen codificante para la enzima  $\beta$ -lactamasa; gris, origen de replicación bacteriana ColE1; verde, secuencia codificante para EhCP5. Además, se señalan los sitios de restricción que caracterizan al plásmido pBluescript SK(-).



**Figura 13.** Representación esquemática del plásmido pET28a(+).

Se muestran algunas de las características moleculares de plásmido: rojo, origen de replicación para fagos f1; azul, gen codificante para el represor LacI; gris, origen de replicación bacteriana ColE1; verde, secuencia del gen de resistencia a kanamicina. Además, se señalan los sitios de restricción utilizados para la clonación de la secuencia codificante para pro-*EhCP5*.

*EhCP5* utilizando los oligonucleótidos EhCP5F (5'- *gcg gat ccA ATA ATA ATA AAC ATT TTA CTA TTG TTG AAT C* -3') y EhCP5R (5'- *cga agc ttT TAA GCA TCA GCA ACC CC* -3'); posteriormente, el producto de *PCR* fue clonado in situ en el sitio *SmaI* del plásmido pBluescript SK(-) (Stratagene).

El plásmido pET-28a(+) (*Novagen*) (Figura 13) fue utilizado como vector de expresión citosólica de la proteína recombinante *EhCP5*, ya que contiene un sitio de clonaciones múltiples, que permite tanto la inserción de secuencias codificantes bajo el control del promotor híbrido T7/LacO, como la fusión de una etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal de las proteínas recombinantes. pET-28a(+); además, contiene el gen de resistencia a kanamicina y la secuencia codificante para el represor de lactosa (LacI).

### 3.1.3. Enzimas y otros reactivos biológicos

La enzima *Taq* ADN polimerasa de *Qiagen* y los deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) de *New England Biolabs* fueron utilizados para las reacciones de *PCR*. La  $T_4$  ADN ligasa de *New England Biolabs* fue utilizada para las reacciones de ligación. Las digestiones endonucleotídicas fueron realizadas usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III de *New England Biolabs*. Todas estas reacciones se llevaron a cabo utilizando el amortiguador y la temperatura recomendada por el fabricante. La enzima proteína disulfuro isomerasa de *E. histolytica* (*EhPDI*) fue obtenida de la reserva de proteínas recombinantes del Laboratorio de

Biotecnología (FCQI, UABC). Los marcadores de peso molecular (1 Kb y  $\lambda$ -HindIII) y de proteínas (*Protein Marker Broad Range* y *Prestained Marker Broad Range*) fueron obtenidos de *New England Biolabs*.

### 3.1.4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos universales M13 (Tabla 4) fueron utilizados en la reacción de *PCR* para la amplificación de la secuencia *EhCP5*, utilizando como molde el plásmido *pBEhCP5*.

### 3.1.5. Reactivos químicos

Los reactivos químicos y soluciones utilizados fueron de calidad biología molecular (grado BM). Bromuro de etidio, EDTA disódico, SDS (dodecil sulfato de sodio), N'-N-metilen-bis-acrilamida, GSH (glutatión reducido), GSSG (glutatión oxidado), HEPES, azul de bromofenol, azul de xilencianol, kanamicina, anticuerpos policlonales de cabra contra IgG de ratón acoplados a fosfatasa alcalina, los anticuerpos monoclonales de ratón contra poli-histidinas, DMSO (dimetil sulfoxido), Tween® 20, reactivo de Bradford y los sustratos para la enzima fosfatasa alcalina BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol) y NBT (nitro azul de tetrazolio) fueron adquiridos de la compañía *SIGMA* de México. De la compañía *BioRad* fueron adquiridos los reactivos agarosa, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) y el azul brillante de *Coomassie* R-250, y la BSA (albúmina suero de bovino) de la compañía *New England Biolabs*.

Las soluciones concentradas de ácido clorhídrico, ácido acético, alcohol etílico y alcohol metílico fueron adquiridas de la compañía Productos Químicos Monterrey. Los siguientes reactivos fueron obtenidos de sus respectivas compañías como Tris (tris[hidroximetil]-

**Tabla 4.** Secuencia de los oligonucleótidos universales M13.

Nombre	Secuencia nucleotídica (5' - 3')
RV	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G
FW	GTA AAA CGA CGG CCA GTG

aminometano) (*Pierce*), acrilamida (*Roche*), urea (*Mallinckrodt*), glicerol y la glicina (*ICN*), imizadol (*Fisher Biotech*), de 2-mercaptoetanol (*Omnipur*), persulfato de amonio (*JT Baker*), DTT (DL-ditiotreitól) (*IBI*), IPTG (isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido) (*Invitrogen*), Ni-NTA Agarosa (*Qiagen*), Z-Arg-Arg-AMC (donado por UCSD), y los componentes de los medios de cultivo (BD).

### **3.1.6. Sistemas de purificación**

Para la purificación del ADN plasmídico y de productos de reacción de *PCR*, se utilizaron los estuches comerciales *QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit* y *QIAprep<sup>®</sup> PCR Purification Kit*, respectivamente. Para la extracción de ADN a partir de gel de agarosa se usó el estuche comercial *QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit*. Estos estuches fueron adquiridos de la compañía QIAGEN. Los procedimientos sugeridos por el fabricante fueron utilizados sin modificaciones.

## **3.2. Equipo**

Para la visualización de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o geles de poliacrilamida teñidos con azul de *coomassie*, se utilizó el fotodocumentador *GelDoc<sup>®</sup> 2000* (*BioRad*). La reacción de *PCR* se llevó a cabo utilizando el termociclador *Techne* (*Techgene*). La cuantificación de proteínas se determinó en un espectrofotómetro de microplacas *Microplate Reader 680* (*Biorad*). Las determinaciones de fluorométricas fueron realizadas en un fluorómetro para microplacas *Fluoroskan Ascent FL* (Thermo Electron Co.).

## **3.3. Construcción del plásmido recombinante pET28CP5**

### **3.3.1. Reacción de *PCR***

La región codificante para el polipéptido *EhCP5* fue amplificada mediante una reacción de *PCR* de 50  $\mu$ L, conteniendo 2 ng de pBEhCP5, 2.5 U de *Taq* ADN Polimerasa, 20  $\mu$ mol de cada oligonucleótido M13RV y M13FW, 1.5 mM de MgSO<sub>4</sub> y 0.2 mM de dNTPs. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial (2 min a 94°C), 35 ciclos de

amplificación exponencial (20 seg a 94°C, 20 seg a 55°C, 20 seg a 72°C), y un ciclo de extensión final (7 min a 72°C).

El producto de amplificación (PPCR\_ *Eh*CP5) fue analizado y visualizado mediante electroforesis de gel de agarosa al 1.5%, teñido con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. Para eliminar el remanente de los oligonucleótidos, el producto de PCR fue purificado utilizando el estuche comercial QIAprep® PCR Purification Kit (Qiagen).

### **3.3.2. Ligación**

El PPCR\_ *Eh*CP5 y pET-28a(+) fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, en reacciones independientes de 20 µL, conteniendo aprox. 1 µg (17 µL) del PPCR o 2 µg (17 µL) del vector y 5 U de cada endonucleasa. Las reacciones se llevaron a cabo durante 2 h a 37 °C.

Los productos de digestión [PPCR\_ *Eh*CP5/BH y pET28a(+)/BH] fueron separados y visualizados mediante electroforesis de agarosa al 1.2%, en presencia de 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. Cada fragmento de interés fue cortado del gel y purificado, utilizando el estuche comercial QIAquick® Gel Extraction Kit. Posteriormente, el PPCR\_ *Eh*CP5/BH y pET28a(+)/BH fueron ligados en un reacción de 10 µL, conteniendo aprox. 2 ng (2 µL) del vector, 60 ng (6 µL) del inserto y 5 U de la enzima T<sub>4</sub> ADN ligasa. La reacción se llevó a cabo durante 4 h a temperatura ambiente.

### **3.3.3. Transformación**

El producto de la ligación fue transfectado en células de *E. coli* XL1 Blue MRF' competentes mediante choque térmico [Sambrook, *et al.*, 1989]. Brevemente, 2 µL de la reacción de ligación fueron agregados a un microtubo de células competentes (100 µL) y la mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min; para el choque térmico, el microtubo fue colocado a 42 °C durante 90 segundos, inmediatamente transferido a hielo y mantenido durante 5 minutos. Las células fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de medio líquido 2X YT e incubación a 37 °C durante 1 hora. Para seleccionar las transfectantes estables, las células fueron separadas mediante centrifugación a 16,000 rpm durante 2 min; enseguida, la pastilla

celular fue resuspendida y dispersada (plaqueada) en la superficie de medio sólido LB, suplementado con 25 µg/mL de kanamicina. El cultivo fue incubado durante la noche a 37 °C.

#### **3.3.4. Selección y análisis**

Las transformantes capaces de crecer en presencia del antibiótico fueron consideradas como estables. Para la selección de clonas positivas, es decir que contengan el plásmido pET28CP5, se realizó un análisis endonucleolítico basado en la longitud de los fragmentos de restricción. A partir de una mini-preparación cruda, 0.5 µg (0.5 µL) de plásmido fueron digeridos con 10 U de cada endonucleasa (*Bam*HI y *Hind*III) durante 2 horas en las condiciones recomendadas por el fabricante. Los productos de digestión fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, conteniendo 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. Las clonas positivas fueron aquellas que presentaron el patrón de restricción esperado (plásmido e inserto).

### **3.4. Análisis de la expresión de la proteína *Eh*CP5**

#### **3.4.1. Transformación en la cepa *E. coli* BL21 (DE3)**

El plásmido recombinante pET28CP5 fue utilizado para transformar células competentes *E. coli* BL21 (DE3). Para aumentar la probabilidad de seleccionar una unidad formadora de colonia (UFC) que sobre-exprese eficientemente *Eh*CP5, se preparó una mezcla conteniendo 4 plásmidos obtenidos de diferentes clonas positivas. Una muestra de ésta fue utilizada para la transformación de *E. coli* BL21 (DE3) mediante choque térmico. Después de la selección en medio LB sólido suplementado con 25 µg/mL de kanamicina, 4 ufc fueron seleccionadas aleatoriamente.

#### **3.4.2. Expresión de *Eh*CP5 a mini-escala**

4 UFC de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) portadoras de pET28CP5 fueron inoculadas (independientemente) en 2 mL de LB líquido suplementado con 25 µg/mL de kanamicina y cultivadas durante la noche a 37 °C y 300 rpm. Posteriormente, 4 mL de LB líquido

suplementado con 25 µg/mL de kanamicina fueron inoculados con 80 µL del cultivo celular joven y cultivados durante 2 horas a 37 °C y 300 rpm (pre-inducción). Enseguida, los cultivos fueron fraccionados en volúmenes iguales (2 mL) y separados en lotes de inducción: un lote fue inoculado con IPTG a una concentración final de 1 mM (CI), y el otro no fue inducido (SI). Ambas fracciones (CI y SI) fueron incubados durante 4 horas a 37 °C y 300 rpm. El paquete celular fue separado mediante centrifugación (2 min a 14,000 rpm) y se conservó durante la noche a -10 °C. Se obtuvieron lisados bacterianos totales (LBT) mediante resuspensión de las pastillas celulares en 200 µL de una solución de carga 1X para SDS-PAGE, seguida de una lisis por calor a una T > 90 °C durante 10 min.

#### **3.4.3. Fraccionamiento y análisis de solubilidad**

A partir 1 mL de cultivos jóvenes, con inductor (CI) y sin inductor (SI), se prepararon pastillas celulares mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 2 min. Posteriormente, fueron resuspendidas en 0.4 mL del reactivo *CellLytic*®B y agitadas ligeramente durante 10 min. La fracción soluble (FS) e insoluble (FI) fueron obtenidas mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes (FS) fueron transferidos a microtubos limpios y mezclados en 0.4 mL de una solución de carga 2X para SDS-PAGE, en tanto los precipitados (FI) fueron resuspendidos en 0.8 mL de solución de carga 1X para SDS-PAGE.

Como control, se prepararon lisados bacterianos totales (LBT), a partir de la pastilla de 1 mL de cultivo, mediante lisis por calor en 0.8 mL de solución de carga 1X para SDS-PAGE. Muestras LBT, FS, y FI fueron desnaturalizadas mediante calor a una T > 90°C durante 10 min y analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% (SDS-PAGE).

#### **3.4.4. Separación electroforética de proteínas**

La separación de proteínas se realizó cargando muestras (10 a 20 µL), desnaturalizadas y reducidas, de los lisados bacterianos, fracciones celulares o fracciones de purificación en geles de poliacrilamida al 12.5%, en condiciones desnaturalizantes [Laemmli, 1970]. La separación electroforética se llevó a cabo durante 30 min a 80 V, seguidos de 90 min a 120 V.

Para la inmunodetección, el gel fue utilizado inmediatamente; sin embargo, para visualización e identificación de proteínas, el gel fue teñido con solución de azul de coomassie (25% de isopropanol; 10% de ácido acético; 0.2% de azul de coomassie R-250) durante 1-2 horas y desteñido con solución alcohol-ácido (10% de isopropanol; 10% de ácido acético) durante 8-12 h.

#### **3.4.5. Inmunodetección**

*Electrotransferencia.* Posterior a la separación electroforética, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, utilizando el sistema *Criterion™ Blotter* (BioRad) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El gel fue equilibrado en el amortiguador de transferencia frío (25 mM de Tris; 192 mM de glicina; 10% de metanol); posteriormente, se preparó el sistema de transferencia tipo emparedado (gel/membrana); y enseguida, se aplicaron 100 V durante 30 min para favorecer la electrotransferencia.

*Bloqueo.* Previamente al reconocimiento, la membrana fue bloqueada durante la noche con una solución al 5% de leche semi-descremada *Svelty™* [Nestle®] en solución TBST (10 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM de NaCl; 0.05% de *Tween®* 20). Finalmente, la membrana fue lavada con TBST durante 30 min.

*Reconocimiento indirecto.* La identificación de la proteína *EhCP5* fue realizada mediante el reconocimiento primario con un anticuerpo contra poli-histidinas (dilución 1:10,000 en solución TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de un lavado con TBST durante 30 min. Inmediatamente, se realizó un reconocimiento secundario con un anticuerpo contra IgG conjugado a fosfatasa alcalina (dilución 1:5,000 en solución TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de un lavado con TBST durante 30 min.

*Revelado.* Finalmente, el reconocimiento indirecto fue revelado utilizando una solución amortiguadora que contiene los sustratos para fosfatasa alcalina: BCIP y NBT. La reacción fue detenida mediante la adición de una solución 5 mM de EDTA (pH 8.0) y lavados con suficiente agua destilada.

### **3.5. Aislamiento y purificación de la proteína *EhCP5***

#### **3.5.1. Expresión de *EhCP5* a escala media**

Una UFC de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) portadora de pET28CP5 fue inoculada en 2 mL de LB líquido suplementado con 25 µg/mL de kanamicina y cultivada durante la noche a 37 °C y 300 rpm. Posteriormente, 100 mL de LB líquido suplementado con 25 µg/mL de kanamicina fueron inoculados con los 2 mL del cultivo celular joven y cultivados durante 2 horas a 37 °C y 300 rpm (pre-inducción). Enseguida, el cultivo fue inoculado con IPTG a una concentración final de 0.1 mM e incubado durante 4 horas a 37 °C y 300 rpm (inducción de la expresión). El paquete celular fue separado mediante centrifugación (15 min a 9,500 rpm) y se conservó durante la noche a -10 °C.

#### **3.5.2. Lisis celular en condiciones desnaturalizantes**

La pastilla celular fue resuspendida en 5 mL solución de lisis sin imidazol (8 M de urea; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0); posteriormente, la ruptura celular fue realizada mediante 3 min de sonicación (en intervalos de 30 seg x 30 seg), usando un sonicador *Microson™* XL2000 (*Misonix*) a una amplitud de 18. La fracción solubilizada fue separada mediante centrifugación a 9,500 rpm durante 30 min y conservada en refrigeración.

#### **3.5.3. Cromatografía de afinidad a níquel**

La proteína recombinante *EhCP5* fue purificada a partir de las fracciones solubilizadas de 10 pastillas celulares mediante cromatografía de afinidad a níquel, en condiciones desnaturalizantes. *EhCP5* se expresa como proteína recombinante etiquetada con un hexámero de histidinas en el extremo N-terminal. Una columna de agarosa-NTA-Ni (Qiagen) fue preparada con una cama de 0.5 mL; primeramente, la columna fue lavada con 5 vol de solución de lisis (8 M de urea; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM de imidazol); enseguida, las fracciones solubilizadas fueron cargadas a la columna, para permitir el pegado de la proteína *EhCP5* a la resina (mediante un enlace de coordinación Ni-His); después, la columna fue lavada con 10 vol de solución de lavado (8M de urea; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM de imidazol);

finalmente, la proteína *EhCP5* fue separada, mediante competencia con imidazol, en fracciones de 1 vol de solución de elución (8 M de urea; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 250 mM de Imidazol). Una muestra de cada fracción fue analizada mediante SDS-PAGE al 12.5%.

#### **3.5.4. Cuantificación de proteína purificada**

La concentración de la proteína recombinante *EhCP5* purificada fue determinada mediante el método de Bradford o espectrofotometría UV a 280 nm. El coeficiente de extinción molar  $\epsilon^{0.1\%} = 0.807$  fue calculado usando el programa *ProtParam Tool* del servidor ExPASy ([expasy.org/tool/protparam.html](http://expasy.org/tool/protparam.html)).

### **3.6. Condiciones de replegamiento oxidativo de *EhCP5***

#### **3.6.1. Tamizado de 8 condiciones del replegamiento oxidativo**

Inicialmente, las condiciones de replegamiento para *EhCP5* fueron identificadas mediante el tamizado de 8 mezclas de reacción, considerando algunos componentes que favorecen el replegamiento [Armstrong, *et al.*, 1999]. La Tabla 4 muestra la composición de las 8 condiciones de replegamiento utilizadas. La proteína *EhCP5* fue previamente reducida con DTT 10 mM durante 1 hora a 37°C. La *EhCP5* fue replegada a una concentración final de 3.2  $\mu$ M. Las reacciones de fueron incubadas a 4°C durante 48 h y la actividad proteolítica recuperada fue valorada a las 0, 24 y 48 h (alícuotas de 50  $\mu$ L de cada reacción).

#### **3.6.2. Determinación fluorométrica de la actividad proteolítica de *EhCP5***

La actividad proteolítica de la enzima *EhCP5* recuperada fue activada con 0.01 mM de DTT durante 30 min a temperatura ambiente y valorada mediante un micro-ensayo fluorométrico. Dependiendo del volumen de reacción, una décima parte (20 o 50  $\mu$ L) de cada reacción de replegamiento fueron mezclados con un volumen igual de solución de sustrato (1  $\mu$ M de Z-Arg-Arg-AMC [(N- $\alpha$ -carboxibenzoil)-Arg-Arg-(7-amido-4-metil cumarina)]; 1 mM de DTT; 0.1 M citrato-fosfato, pH 6.5). Inmediatamente, la fluorescencia emitida fue registrada durante 5 min, a intervalos de 15 seg.

**Tabla 5.** Condiciones consideradas para el replegamiento oxidativo de *EhCP5*.

	CONDICIÓN DE REPLEGAMIENTO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1 M Tris-HCl, pH 8.5	25	25	25	25	-	-	-	-
1 M MES, pH 6.0	-	-	-	-	25	25	25	25
2 M L-Arginina	-	187.5	-	187.5	-	187.5	-	187.5
5% PEG 6000	10	-	-	10	-	10	10	-
100% Glicerol	-	125	125	-	125	-	-	125
3 M NaCl	50	50	5	5	5	5	50	50
1 M MgCl <sub>2</sub>	-	5	-	5	5	-	5	-
1 M CaCl <sub>2</sub>	-	5	-	5	5	-	5	-
0.5 M EDTA	10	-	10	-	-	10	-	10
100 mM GSH	25	25	25	25	25	25	25	25
50 mM GSSG	5	5	5	5	5	5	5	5
Agua destilada	315	12.5	245	172.5	245	172.5	315	12.5
Proteína	60	60	60	60	60	60	60	60

Se muestran los componentes y el volumen ( $\mu\text{L}$ ) para una reacción de de 500  $\mu\text{L}$ .

El producto fluorogénico fue determinado a longitudes de onda de 355 nm (excitación) y 460 nm (emisión). Para las unidades de actividad proteolítica fueron consideradas las unidades relativas de fluorescencia por min ( $\text{URF min}^{-1}$ ).

### 3.6.3. Análisis de 4 condiciones de replegamiento oxidativo

A partir de la información del tamizado, las condiciones 2, 3, 7 y 8 fueron analizadas como potenciales para el replegamiento de la proteína *EhCP5*. El ensayo fue realizado de manera similar al predecesor, con algunas adecuaciones: (i) el volumen de reacción fue de 200  $\mu\text{L}$ ; y (ii) la actividad proteolítica recuperada fue valorada a las 0, 8, 24, 32 y 48 h.

### 3.6.4. Optimización de la condición de replegamiento oxidativo

La condición 8 (considerada como la mejor para el replegamiento de la proteína *EhCP5*) fue posteriormente optimizada en dos de sus componentes: (i) arginina; y (ii) glicerol. Además,

el valor de pH de la condiciones de replegamiento también fue optimizada (a un pH alcalino). El ensayo fue realizado de manera similar al predecesor.

### **3.7. Replegamiento oxidativo de *EhCP5* asistido por *EhPDI***

#### **3.7.1. Asistencia de *EhPDI***

En condiciones óptimas para el replegamiento oxidativo de la proteína *EhCP5*, se prepararon dos reacciones de 200  $\mu\text{L}$  conteniendo 0 o 5  $\mu\text{M}$  de *EhPDI*, como asistente del replegamiento. La concentración final de *EhCP5* fue de 3.1  $\mu\text{M}$ .

#### **3.7.2. Efecto de la concentración de *EhPDI***

El efecto de la concentración de la enzima PDI sobre el replegamiento oxidativo de *EhCP5* fue evaluado en condiciones óptimas, en una mezcla de reacción con la composición siguiente: 5  $\mu\text{M}$  de *EhCP5* y diferentes concentraciones de *EhPDI* (0, 1.25, 2.50, 3.75, 5.0, 6.25, 7.50 y 8.75  $\mu\text{M}$ ). El ensayo fue realizado de manera similar al predecesor.

#### **3.7.3. Efecto de la concentración de *EhCP5***

El efecto de la concentración de sustrato (insulina) sobre el replegamiento oxidativo de *EhCP5* fue evaluado en condiciones óptimas, conteniendo 7.5  $\mu\text{M}$  de *EhPDI* y diferentes concentraciones de *EhCP5* (0, 1.25, 2.50, 3.75, 5.0, 6.25 y 7.50). El ensayo fue realizado de manera similar al predecesor.

### **3.8. Análisis estadístico**

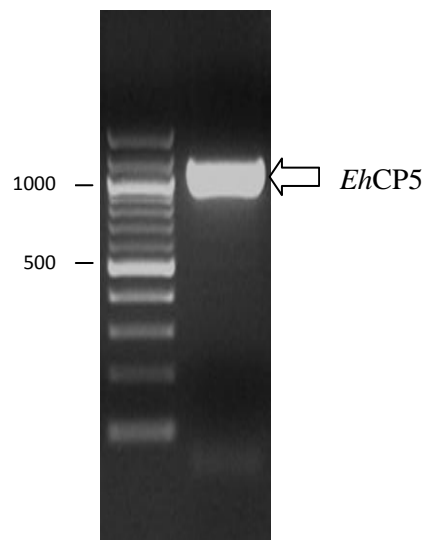
Los análisis estadísticos, ajustes de regresión y parámetros de cinética enzimática fueron determinados usando el paquete de computación *Prism*<sup>®</sup> v4.03 para Windows (*GraphPad Software, Inc*).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. Amplificación de *EhCP5* y obtención de pET28CP5

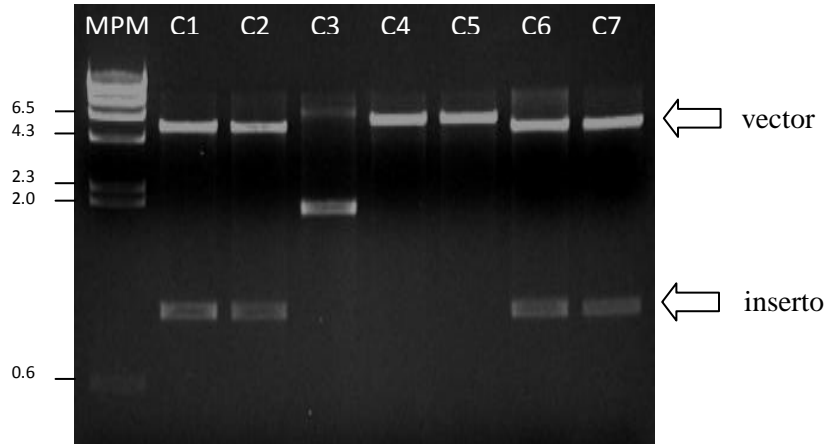
Utilizando el plásmido pBEhCP5 como molde, se amplificó la secuencia codificante para el polipéptido *EhCP5*. Como se observa en la Figura 14, se amplificó exitosamente un fragmento de aprox. 1.2 Kb, concordante con el tamaño esperado (1,146 pb).

La construcción del plásmido recombinante pET28CP5 se llevó a cabo mediante la digestión inicial del producto de *PCR* codificante para *EhCP5* y el plásmido pET28a(+) con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III. Después de su purificación, ambos fragmentos fueron ligados usando la  $T_4$  ADN ligasa. El producto de la ligación fue transfectado a células de *E. coli* XL1-Blue



**Figura 14.** Separación electroforética (gel de agarosa al 1.5%) del fragmento codificante para *EhCP5*.

Se indican los pesos moleculares (pb) correspondientes al marcador (izquierda) y el producto de amplificación (derecha).



**Figura 15.** Separación electroforética (gel de agarosa al 1.2%) de los productos de digestión de las clonas C1 a C7 de pET28CP5 con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III.

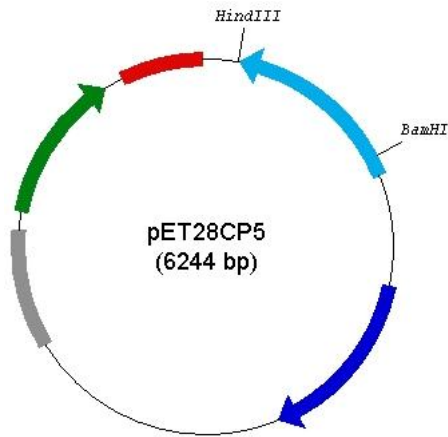
Se indican los pesos moleculares (Kb) correspondientes al marcador (izquierda) y los fragmentos de digestión (derecha).

MRF' y seleccionado mediante resistencia a ampicilina. Aleatoriamente, 7 unidades formadoras de colonia transformantes estables fueron seleccionadas y el plásmido fue aislado. Para identificar las clonas portadoras del plásmido recombinante (pET28CP5), se realizó un análisis de restricción simple basado en la liberación del inserto, usando las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III.

Como se observa en la Figura 15, solo las clonas C1, C2, C6 y C7 presentaron el patrón de restricción esperado para el plásmido recombinante pET28CP5; es decir, se observa la liberación de un fragmento de aprox. 1 Kb, coincidente con el tamaño esperado para el inserto. En la Figura 16 se muestran las características moleculares del plásmido pET28CP5 y de la proteína recombinante *Eh*CP5 codificada.

#### 4.2. Análisis de expresión de la proteína recombinante *Eh*CP5

Posteriormente, como la secuencia codificante para *Eh*CP5 se encuentra bajo el control del promotor T7, el plásmido recombinante pET28CP5 fue transfectado en la cepa de *E. coli*



**Figura 16.** Representación esquemática del plásmido pET28CP5.

Se muestran algunas de las características moleculares de plásmido: rojo, origen de replicación para fagos f1; azul, gen codificante para el represor LacI; gris, origen de replicación bacteriana ColE1; verde, secuencia del gen de resistencia a kanamicina; magenta, secuencia codificante para *EhCP5*. Además, se señalan los sitios de restricción utilizados para la clonación de *EhCP5*. En el panel inferior se encuentra la secuencia de la proteína recombinante *EhCP5*. En verde se señala el hexámero de histidina y en gris el dominio “pro”.

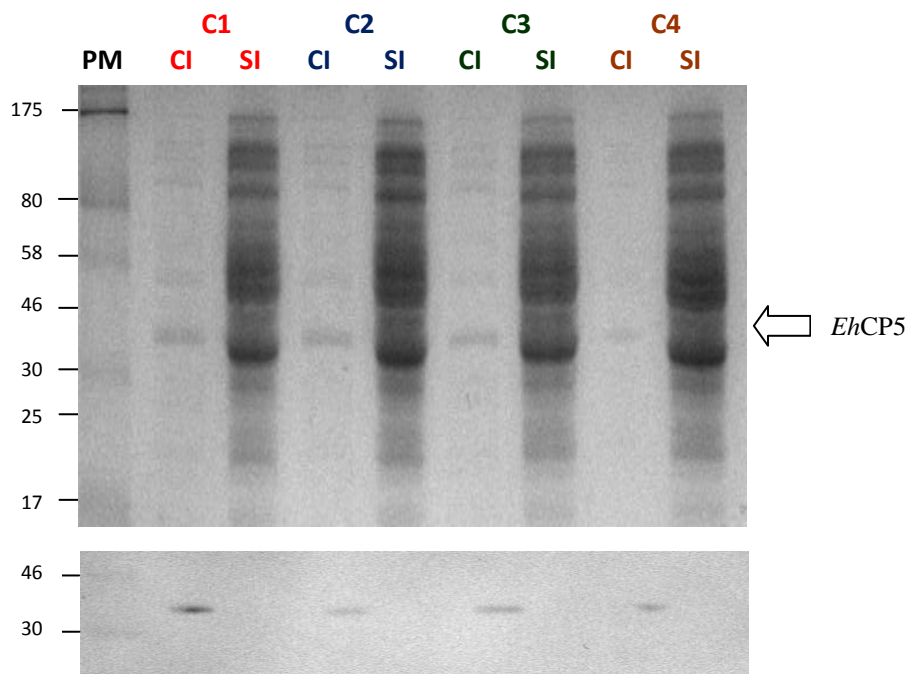
```

atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg cgc ggc agc cat 60
M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H
atg gct agc atg act ggt gga cag caa atg ggt cgc gga tcc aat aat aat aaa cat ttt 120
M A S M T G G Q Q M G R G S N N N N K H F
act att gtt gaa tct ctt aga aga aga gct att ttc aat aat aat gct cgt ttt att gct 180
T I V E S L R R R A I F N N N A R F I A
aaa ttc aat aag aac aat tca ttc caa tta tca gtt gaa gga cca ttt gct gct atg act 240
K F N K N N S F Q L S V E G P F A A M T
gag gct gaa tat aat tct atg tta aaa cca ttt gtc att gat aaa caa cat gaa gag att 300
E A E Y N S M L K P F V I D K Q H E E I
gtt tat gat tct agg gga gat gta cca gaa tct gtt gat tgg aga gct aaa ggg aaa gtt 360
V Y D S R G D V P E S V D W R A K G K V
cca gct att aga gac caa gca tca tgt gga tca tgt tat agt ttt gct tct gtt gct gct 420
P A I R D Q A S C G S C Y S F A S V A A
att gaa gga aga ttg ttg gtt gct gga tca aag aaa ttt aca gtt gat gac ctt gat ctt 480
I E G R L L V A G S K K F T V D D L D L
tct gag caa caa ctt gtt gat tgc tca gtt tct gtt gga aat aaa gga tgt aat gga ggt 540
S E Q Q L V D C S V S V G N K G C N G G
tct ctt ctt tta agt ttc aga tat gtt aaa tta aat gga ata atg caa gaa aaa gat tat 600
S L L L S F R Y V K L N G I M Q E K D Y
cca tat gtt gct gct gaa gaa act tgt act tat gat aag aag aaa gtt gct gtt aaa att 660
P Y V A A E E T C T Y D K K K V A V K I
act gga caa aaa tta gtt aga cca gga agt gaa aaa gca ctt atg cgt gct gct gct gaa 720
T G Q K L V R P G S E K A L M R A A A E
gga cca gtt gcc gct gct att gat gct tct gga gtt aaa ttc caa tta tat aag agt ggt 780
G P V A A A I D A S G V K F Q L Y K S G
ata tat aat agt aaa gaa tgt tca tca act cag ctt aat cat ggt gta gca gta gtt ggt 840
I Y N S K E C S S T Q L N H G V A V V G
tat ggt act caa aat gga act gaa tat tgg att gtt aga aat tca tgg gga act att tgg 900
Y G T Q N G T E Y W I V R N S W G T I W
gga gat caa gga tat gtt tta atg tca aga aat aag aat aat caa tgt ggt att gct tca 960
G D Q G Y V L M S R N K N Q C G I A S
gga gct gct tat cca gtt ggg gtt gct gat gct taa 996
G A A Y P V G V A D A *

```

BL21 (DE3). Esta cepa expresa, de manera inducida (por IPTG), la enzima T7 RNA polimerasa, la cual es necesaria para la expresión indirecta de proteínas recombinantes que se encuentran bajo el control del promotor T7, tal como *EhCP5*.

Inicialmente, se realizó un ensayo analítico a mini-escala para determinar la expresión de la proteína *EhCP5* en lisados proteicos totales. Como se observa en el gel de poliacrilamida



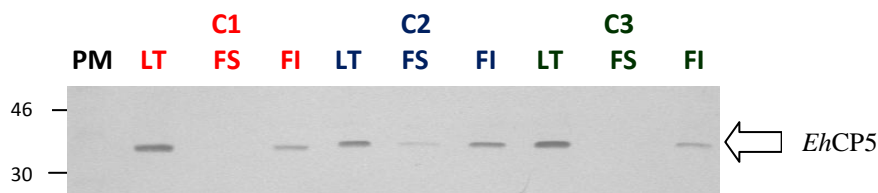
**Figura 17.** Análisis de expresión de la proteína recombinante *EhCP5*.

Superior: separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12.5%) de los lisados proteicos totales de 4 clonas BL21 (DE3) portadoras de pET28CP5. Se indican los pesos moleculares (KDa) del marcador (izquierda) y la proteína recombinante esperada (derecha). Para cada clona, se identifica los lisados de cultivos inducidos (CI, 1 mM de IPTG) o no inducidos (SI).

Inferior: inmunodetección de la proteína recombinante *EhCP5* mediante anticuerpos contra el hexámero de histidinas.

(Figura 17, panel superior), una banda de aprox. 36 KDa es ligeramente evidente en los carriles correspondientes a los cultivos inducidos por IPTG; sin embargo, esa banda fue más evidente después de la inmunodetección con anticuerpos contra poli-histidinas (Figura 17, panel inferior). Considerando que *E. coli* no expresa proteínas reconocidas por anticuerpos contra poli-histidinas (carriles correspondientes a los cultivos no inducidos), y que las evidencias experimentales muestran una banda del tamaño esperado (35.9 KDa), fue posible concluir que es posible inducir la expresión citosólica de la proteína recombinante *EhCP5* en el sistema bacteriano utilizado.

Posteriormente, se realizó un análisis de solubilidad en condiciones nativas, usando las condiciones de inducción previamente establecidas (1 mM de IPTG). Los lisados proteicos



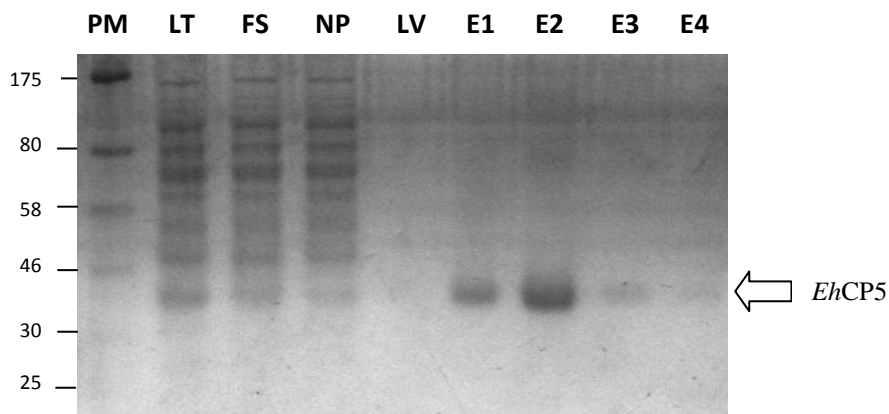
**Figura 18.** Análisis de solubilidad de la proteína recombinante *EhCP5*.

Inmunodetección de la proteína recombinante *EhCP5* mediante anticuerpos contra el hexámero de histidinas. Los lisados proteicos totales (LT), y las fracciones solubles (FS) en condiciones nativas e insolubles (FI) de 3 clonas BL21 (DE3) portadoras de pET28CP5 fueron electrotransferidos a partir de un gel SDS-PAGE al 12.5%. Se indican los pesos moleculares (kDa) del marcador (izquierda) y la proteína recombinante esperada (derecha).

totales fueron obtenidos utilizando el reactivo comercial *CellLytic*<sup>TM</sup> B y fracciones solubles e insolubles fueron separadas mediante centrifugación. Para identificar la solubilidad de la proteína recombinante *EhCP5*, las proteínas de las fracciones obtenidas fueron separadas (mediante electroforesis) y electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa para ser analizadas mediante inmunodetección. Como se puede observar en la Figura 18, la proteína recombinante *EhCP5* se expresa de manera totalmente insoluble, ya que la banda de aprox. 36 kDa sólo se observa en las fracciones insolubles (FI), sin evidencia aparente de ésta en las fracciones solubles (FS). Adicionalmente, mediante un análisis de solubilidad en condiciones desnaturizantes se observó que la proteína *EhCP5* es soluble en soluciones con 8 M de urea.

#### 4.3. Purificación de la proteína recombinante *EhCP5*

Considerando que la proteína recombinante *EhCP5* se expresa de manera insoluble en condiciones nativas, posiblemente formando cuerpos de inclusión, y que es soluble en soluciones desnaturizante con 8 M urea, se procedió a purificar la proteína a partir de pastillas celulares de cultivos a media escala (100 mL). A partir 10 pastillas celulares, se obtuvieron las fracciones solubilizadas con una solución de lisis conteniendo 8 M urea. Posteriormente, la proteína recombinante *EhCP5* fue purificada mediante cromatografía de



**Figura 19.** Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12.5%) de las fracciones colectadas durante la cromatografía de afinidad a níquel para purificar la proteína recombinante *EhCP5*.

Se indican los pesos moleculares (en kDa) correspondientes al marcador (izquierda) y la proteína recombinante esperada (derecha). Fracciones: lisado total (LT), fracción soluble (FS), no pegada (NP), lavado (LV), y eluciones 1-4 (E1-E4).

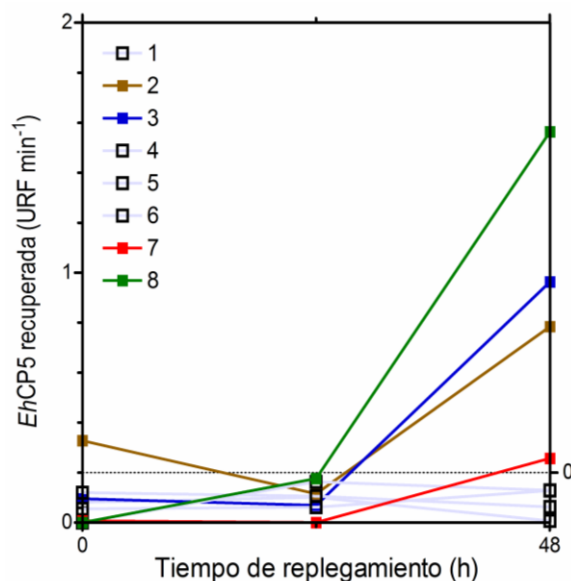
afinidad a níquel. Como se observa en la Figura 19, la proteína recombinante *EhCP5* fue purificada exitosamente (eluciones E2 y E3). La concentración de la proteína recombinante *EhCP5* purificada fue de 1.52 mg/mL (42.3  $\mu$ M), en tanto el rendimiento de expresión-purificación fue de 3.04 mg/L, tres veces mayor al reportado [Hellberg, *et al.*, 2001].

#### 4.4. Identificación de las condiciones de replegamiento de *EhCP5*

Los primeros intentos de replegamiento de la proteína recombinante *EhCP5* fueron realizados utilizando condiciones previamente reportadas [Hellberg, *et al.*, 2002; Sato, *et al.*, 2006]; sin embargo, no fue posible obtener resultados favorables. Por tal motivo, se realizó un tamizado de 8 condiciones en el replegamiento, considerando las recomendaciones aplicadas para algunas proteínas modelo: (i) valor del pH; (ii) requerimiento de arginina; (iii) presencia de estabilizador, PEG 6000 o glicerol; (iv) fuerza iónica, alta o baja concentración de NaCl; y (v) requerimiento de cationes divalentes,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  contra EDTA; además, el requerimiento obligatorio de agentes redox, glutationes [Armstrong, *et al.*, 1999].

Considerando los volúmenes de la Tabla 5 (ver Materiales y Métodos), se prepararon 8 reacciones de replegamiento; en éstas, la concentración final de *EhCP5* fue de 3.2  $\mu\text{M}$ , en tanto la concentración de urea se diluyó a 0.96 M, concentración permisiva para el replegamiento de proteínas. Para este ensayo inicial, se consideraron reacciones simples a 4 °C (para reducir la velocidad de replegamiento) y con muestreos a las 0, 24 y 48 h. La Figura 20 presenta los resultados de reactivación de la actividad proteolítica de *EhCP5*. Para seleccionar una condición como potencial, se consideró como criterio una reactivación superior a las 48 h con respecto al máximo observado a las 24 h. Ante esto, sólo 4 condiciones fueron seleccionadas: 2, 3, 7 y 8.

Como se observa en la siguiente tabla, la condición 8 (de mayor recuperación de la actividad de *EhCP5*) contiene 50 mM de MES (pH 6.0), 750 mM de arginina, 25% de glicerol, 30 mM de NaCl, 10 mM de EDTA y las condiciones redox consideradas como apropiadas (5 mM de GSH y 0.5 mM de GSSG, respectivamente); sin embargo, comparada con otras las otras condiciones,



**Figura 20.** Representación gráfica de las cinéticas de recuperación de *EhCP5* en 8 condiciones de replegamiento.

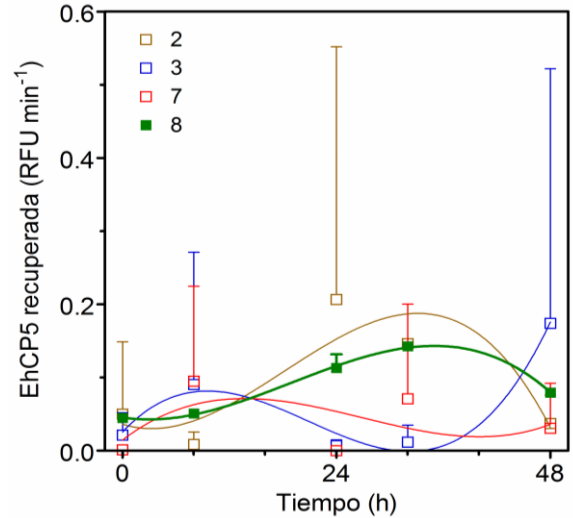
Las condiciones relevantes se muestran en colores. Los resultados numéricos se encuentran en el anexo.

	CONDICIÓN			
	2	3	7	8
(mM) Tris-HCl, pH 8.5	50	50	-	-
(mM) MES, pH 6.0	-	-	50	50
(mM) L-Arginina	750	-	-	750
(%) PEG 6000	-	-	0.1	-
(%) Glicerol	25	25	-	25
(mM) NaCl	300	30	30	30
(mM) MgCl <sub>2</sub>	10	-	10	-
(mM) CaCl <sub>2</sub>	10	-	10	-
(mM) EDTA	-	10	-	10
(mM) GSH	5	5	5	5
(mM) GSSG	0.5	0.5	0.5	0.5

la participación de otros componentes podría ser crucial.

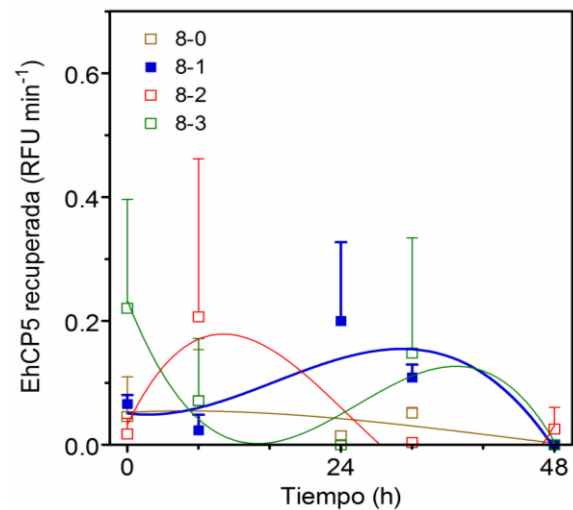
Por tal motivo, se decidió realizar un re-tamizado de esas condiciones, con algunas modificaciones técnicas: análisis por duplicado, reducción del volumen de reacción y mayor número de muestras durante el replegamiento (0, 8, 24, 32 y 48 h). Como se puede verificar en la Figura 21, la condición 8 es la única que permite una cinética de replegamiento de *EhCP5* consistente y con valores de dispersión reducidos.

Enseguida, con el fin de optimizar la concentración de arginina y glicerol, dos componentes considerados como importantes para el replegamiento, se realizó un ensayo utilizando variantes de la condición seleccionada: 8-0, 750 mM de arginina y 25% de glicerol (condiciones estándar); 8-1, 750 mM de arginina y 10% de glicerol (disminución glicerol); 8-2, 250 mM de arginina y 25% de glicerol (disminución arginina); 8-3, 250 mM de arginina y 10% de glicerol (disminución arginina y glicerol). Como se muestra en la Figura 22, la condición 8-1 favoreció el replegamiento de *EhCP5*; incluso con mejor comportamiento y mayor actividad que el



**Figura 21.** Representación gráfica de las cinéticas de recuperación de *EhCP5* en 4 condiciones de replegamiento.

Las condiciones relevantes se muestran en colores. Los resultados numéricos se encuentran en el anexo.



**Figura 22.** Representación gráfica de las cinéticas de recuperación de *EhCP5* en 4 variantes de la condición de replegamiento 8.

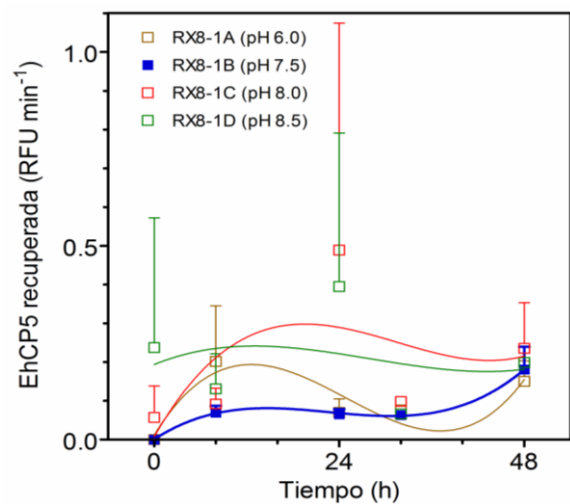
Las condiciones relevantes se muestran en colores. Los resultados numéricos se encuentran en el anexo.

control (condición 8-0); además, se observa que la cinética de replegamiento pudiera ser reversible en esta condición, ya que la actividad disminuye después de las 24h. Por otro lado, se verificó que la arginina es importante para el replegamiento de *EhCP5*, ya que su disminución ocasiona cinéticas de replegamiento con patrones erráticos y alta dispersión (condiciones 8-2 y 8-3).

Hasta esta parte del proyecto, la reacción 8-1 (50 mM de MES, pH 6.0; 750 mM de arginina; 10% de glicerol; 30 mM de NaCl; 10 mM de EDTA; 5 mM de GSH y 0.5 mM de GSSG) presentó las mejores condiciones de replegamiento de la proteína *EhCP5*. Sin embargo, otro factor a considerar es el valor de pH, ya que se pretende favorecer el replegamiento mediante la asistencia de la enzima *EhPDI*, la cual exhibe actividad oxidasa/isomerasa a valores de pH ligeramente alcalinos (pH = 7 - 8) [Ramos, *et al.*, 2011]. Por tal motivo, se realizó un ensayo utilizando variantes de la condición 8-1 a diferentes valores de pH, utilizando a Tris-HCl como amortiguador. La Figura 23 destaca que la condición 8-1B (pH 7.5) favoreció el replegamiento de *EhCP5*; ya que la cinética mostró un comportamiento poco errático y menor dispersión de valores.

#### 4.5. EhPDI favorece el replegamiento de *EhCP5*

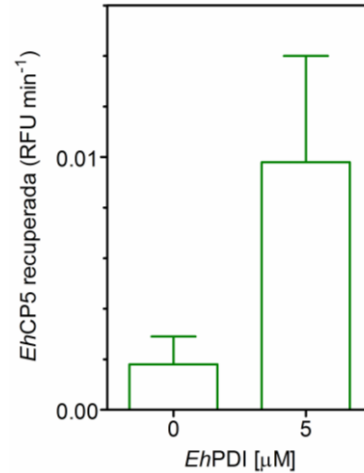
Considerando a la condición 8-1B (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 750 mM de arginina; 10% de glicerol; 30 mM de NaCl; 10 mM de EDTA; 5 mM de GSH y 0.5 mM de GSSG) como la



**Figura 23.** Representación gráfica de las cinéticas de recuperación de *EhCP5* en 4 variantes de la condición de replegamiento 8-1.

Las condiciones relevantes se muestran en colores. Los resultados numéricos se encuentran en el anexo.

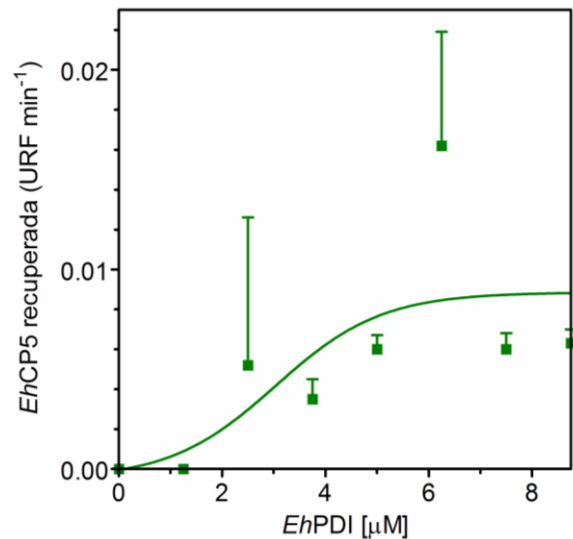
solución de replegamiento de *EhCP5*, se realizó un ensayo en presencia de 5  $\mu\text{M}$  de *EhPDI*. A partir de estos ensayos, los ensayos de replegamiento se realizaron a temperatura ambiente y la recuperación fue valorada simultáneamente. La Figura 24 representa los resultados de replegamiento de 3.1  $\mu\text{M}$  de *EhCP5*, asistido por *EhPDI* (5  $\mu\text{M}$ ). Como es evidente, la presencia de *EhPDI* mejora notablemente el replegamiento y recuperación de *EhCP5* (0  $\mu\text{M}$  de *EhPDI*:  $1.8 \pm 1.1$  URF  $\text{min}^{-1}$ ; 5  $\mu\text{M}$  de *EhPDI*:  $9.8 \pm 4.2$  URF  $\text{min}^{-1}$ ; respectivamente). Este resultado sugiere que *EhCP5* es un sustrato natural de *EhPDI*.



**Figura 24.** Representación gráfica de las cinéticas de recuperación de *EhCP5* en presencia de 5  $\mu\text{M}$  de *EhPDI*.

#### 4.6. El replegamiento asistido de *EhCP5* depende de la concentración de enzima

Posteriormente, se realizó un ensayo para determinar el efecto de la concentración de enzima (*EhPDI*) sobre el replegamiento (asistido por *EhPDI*) y recuperación de la actividad enzimática de *EhCP5*. Como se puede establecer en la Figura 25, el valor de actividad enzimática aumenta con respecto al aumento de la concentración de *EhPDI*. Aun más,



**Figura 25.** Representación gráfica del efecto de la concentración de *EhPDI* sobre el replegamiento de *EhCP5*.

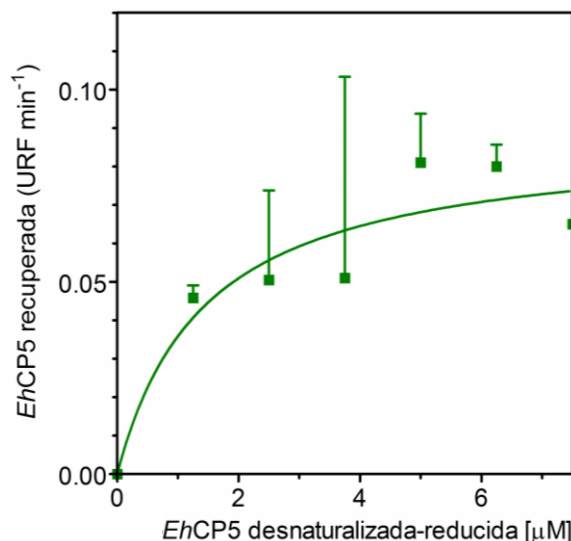
Los resultados numéricos se encuentran en el anexo.

mediante un ajuste (por mínimos cuadrados) de los valores obtenidos a una ecuación dosis-respuesta de pendiente variable, fue posible determinar una concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) de  $2.56 \mu\text{M}$ .

#### 4.7. El replegamiento asistido de *EhCP5* depende de la concentración de sustrato

Finalmente, se realizó un ensayo para determinar el efecto de la concentración de sustrato (*EhCP5* desnaturalizada y reducida) sobre el replegamiento (asistido por *EhPDI*) y recuperación de la actividad enzimática de *EhCP5*. Como se puede establecer en la Figura 26, el valor de actividad enzimática aumenta con respecto al aumento de la concentración de *EhCP5* desnaturalizada y reducida.

Aun más, con estos resultados fue posible realizar un análisis de la actividad oxidasa de la *EhPDI*. Utilizando la enzima *EhPDI* a una concentración de  $7.5 \mu\text{M}$ , se determinó la actividad enzimática recuperada a partir de reacciones de replegamiento asistido a diferentes concentraciones de *EhCP5* desnaturalizada y reducida ( $0 - 7.5 \mu\text{M}$ ). A partir del ajuste (por mínimos cuadrados) de los valores obtenidos a la ecuación de Michaelis-Menten (Figura 26), se determinó una  $K_m$  de  $1.45 \mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  de  $0.088 \text{ URF min}^{-1}$ ; además se calculó un valor aparente de  $K_{cat}$  de  $0.012 \text{ URF min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ .



**Figura 26.** Representación gráfica del efecto de la concentración de *EhCP5* desnaturalizada y reducida sobre el replegamiento asistido de *EhCP5*.

## 5. CONCLUSIONES

A partir del plásmido de expresión bacteriana citosólica pET28CP5, derivado del vector pET28a(+) y construido en este proyecto, se logró expresar la proteína recombinante *EhCP5*. Sin embargo, debido a que mostró insolubilidad en condiciones nativas, *EhCP5* fue purificada en condiciones desnaturalizantes (8 M de urea), calculándose un rendimiento de 3.04 mg de proteína recombinante por litro de cultivo.

Mediante un tamizado de 8 condiciones de replegamiento proteico, seguido de un proceso de optimización simple, se determinaron las condiciones medio-ambientales óptimas para el replegamiento de la proteína recombinante *EhCP5*: 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 10% de glicerol; 750 mM de L-arginina; 10 mM de EDTA; 30 mM de NaCl; 5 mM de GSH y 0.5 mM de GSSG.

Los ensayos *in vitro* de replegamiento oxidativo asistido sugieren que la proteína recombinante *EhCP5* es un sustrato natural de la enzima *EhPDI in vitro*. Sin embargo, se requiere de experimentos *in vivo*, como el silenciamiento génico de *EhPDI*, para complementar esta observación.

Finalmente, el replegamiento oxidativo de *EhCP5* asistido por *EhPDI* mostró una dependencia a la concentración de enzima y sustrato. En la dependencia a la concentración de enzima (*EhPDI*), se determinó una  $CE_{50}$  de 2.56  $\mu\text{M}$ ; en tanto la dependencia a la concentración sustrato (*EhCP5* desnaturalizada y reducida), mostró una  $K_m$  de 1.45  $\mu\text{M}$ , una  $V_{max}$  de 0.088 URF  $\text{min}^{-1}$  y una  $K_{cat}$  aparente de 0.012 URF  $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ .

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Anelli T, Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J.* 2008; 27(2): 315-27.
- Anfinsen CB. The formation and stabilization of protein structure. *Biochem J.* 1972; 128(4): 737-49.
- Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol.* 1998; 28(4): 777-85.
- Armstrong N, de Lencastre A, Gouaux E. A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Sci.* 1999; 8(7): 1475-83.
- Bhattacharya A, Arya R, Clark CG, Ackers JP. Absence of lipophosphoglycan-like glycoconjugates in *Entamoeba dispar*. *Parasitology.* 2000; 120: 31-5.
- Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, *et al.* Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1131-7.
- Bruchhaus I, Loftus BJ, Hall N, Tannich E. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell.* 2003; 2(3): 501-9.
- Burchard GD, Prange G, Mirelman D. Interaction between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and the human intestinal cell line HT-29 in the presence or absence of leukocytes. *Parasitol Res.* 1993; 79(2): 140-5.
- Das S, Lohia A. Delinking of S phase and cytokinesis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* 2002; 4: 55-60.
- Ehrenkaufer GM, Haque R, Hackney JA, Eichinger DJ, Singh U. Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. *Cell Microbiol.* 2007; 9: 1426-44.
- 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.
- Gathiram V, Jackson TF. Pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* remain unchanged throughout their life-cycle. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990; 84: 806-7.
- Hellberg A, Nowak N, Leippe M, Tannich E, Bruchhaus I. Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Protein Expr Purif.* 2002; 24(1): 131-7.
- Hirata KK, Que X, Melendez-Lopez SG, Debnath A, *et al.* A phagocytosis mutant of *Entamoeba histolytica* is less virulent due to deficient proteinase expression and release. *Exp Parasitol.* 2007; 115(2): 192-9.
- Hou Y, Mortimer L, Chadee K. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NFkappaB-mediated pro-inflammatory responses. *J Biol Chem.* 2010; 285: 35497-504.

- Hughes AL. Evolution of cysteine proteinases in eukaryotes. *Mol Phylogenet Evol.* 1994;3(4):310-21.
- Jankovic D, Aslund L, Oswald IP, Caspar P, *et al.* Calpain is the target antigen of a Th1 clone that transfers protective immunity against *Schistosoma mansoni*. *J Immunol.* 1996; 157(2): 806-14.
- Jhamb K, Jawed A, Sahoo DK. Immobilized chaperones: A productive alternative to refolding of bacterial inclusion body proteins. *Process Biochemistry.* 2008; 43: 587–97.
- Jurgen B, Breitenstein A, Urlacher V, Buttner K, *et al.* Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2010; 9: 41.
- Karrer KM, Peiffer SL, DiTomas ME. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(7): 3063-7.
- Kim PS, Bole D, Arvan P. Transient aggregation of nascent thyroglobulin in the endoplasmic reticulum: relationship to the molecular chaperone, BiP. *J Cell Biol.* 1992; 118(3): 541-9.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680-5.
- Lalmanach G, Lecaille F, Chagas JR, Authié E, *et al.* Inhibition of trypanosomal cysteine proteinases by their propeptides. *J Biol Chem.* 1998; 273(39): 25112-6.
- León-Avila G, Tovar J. Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology.* 2004; 150: 1245-50.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, *et al.* A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.* 1980; 27(1): 37-58.
- Lichtenstein A, Kondo AT, Visvesvara GS, Fernandez A, *et al.* Pulmonary amoebiasis presenting as superior vena cava syndrome. *Thorax.* 2005; 60(4): 350-2.
- Lourensens S, Houpt ER, Chadee K, Blennerhassett MG. *Entamoeba histolytica* infection and secreted proteins proteolytically damage enteric neurons. *Infect Immun.* 2010; 78(12): 5332-40.
- Lundstrom J, Holmgren A. Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J Biol Chem.* 1990; 265(16): 9114-20.
- Mares RE, Magaña PD, Meléndez-López SG, Licea AF, Cornejo-Bravo JM, Ramos MA. Oxidative folding and reductive activities of *EhPDI*, a protein disulfide isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int.* 2009; 58(3): 311-3.
- Meléndez-López SG, Herdman S, Hirata K, Choi MH, *et al.* Use of recombinant *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 1 to identify a potent inhibitor of amebic invasion in a human colonic model. *Eukaryot Cell.* 2007; 6(7): 1130-6.
- Moncada D, Keller K, Ankri S, Mirelman D, Chadee K. Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. *Gastroenterology.* 2006; 130(3): 721-30.
- Monnat J, Neuhaus EM, Pop MS, Ferrari DM, *et al.* Identification of a novel saturable endoplasmic reticulum localization mechanism mediated by the C-terminus of a *Dictyostelium* protein disulfide isomerase. *Mol Biol Cell.* 2000; 11(10): 3469-84.
- Musil D, Zucic D, Turk D, Engh RA, *et al.* The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* 1991; 10(9): 2321-30.

- Perez-Montfort R, Ostoa-Saloma P, Velazquez-Medina L, Montfort I, Becker I. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 1987; 26(1-2): 87-97.
- Petri WA Jr, Haque R, Mann BJ. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol*. 2002; 56: 39-64.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, *et al*. UCSF Chimera- a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004; 25(13): 1605-12.
- Que X, Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(2): 196-206.
- Ramos MA, Mares RE, Magaña PD, Ortega JE, Cornejo-Bravo JM. In silico identification of the protein disulfide isomerase family from a protozoan parasite. *Comput Biol Chem*. 2008; 32(1): 66-70.
- Ramos MA, Mares RE, Magaña PD, Rivas ID, Meléndez-López SG. *Entamoeba histolytica*: Biochemical characterization of a protein disulfide isomerase. *Exp Parasitol*. 2011; 128(1): 76-81.
- Ramos MA, Sanchez-Lopez R, Mares RE, Olvera F, Alagón A. Identification of an *Entamoeba histolytica* gene encoding a protein disulfide isomerase that functionally complements the dsbA mutation in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005; 143(2): 236-40.
- Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J*. 1993; 290(1): 205-18.
- 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.
- Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*. 2002; 120(1): 1-21.
- Salgado M, Villagómez-Castro JC, Rocha-Rodríguez R, Sabanero-López M, *et al*. *Entamoeba histolytica*: biochemical and molecular insights into the activities within microsomal fractions. *Exp Parasitol*. 2005; 110(4): 363-73.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sato D, Nakada-Tsukui K, Okada M, Nozaki T. Two cysteine protease inhibitors, EhICP1 and 2, localized in distinct compartments, negatively regulate secretion in *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett*. 2006; 580(22): 5306-12.
- Scholze H, Werries E. Cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. I. Partial purification and action on different enzymes. *Mol Biochem Parasitol*. 1986; 18(1): 103-12.
- Seydel KB, Stanley SL Jr. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infect Immun*. 1998; 66(6): 2980-3.
- 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.
- Smith AM, Carmona C, Dowd AJ, McGonigle S, Acosta D, Dalton JP. Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Parasite Immunol*. 1994; 16(6): 325-8.

- Song J, Quan H, Wang C. Dependence of the anti-chaperone activity of protein disulphide isomerase on its chaperone activity. *Biochem J.* 1997; 328(3): 841-6.
- Tannich E, Scholze H, Nickel R, Horstmann RD. Homologous cysteine proteinases of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Differences in structure and expression. *J Biol Chem.* 1991; 266(8): 4798-803.
- Tillack M, Biller L, Irmer H, Freitas M, *et al.* The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics.* 2007; 8: 170.
- Tillack M, Nowak N, Lotter H, Bracha R, *et al.* Increased expression of the major cysteine proteinases by stable episomal transfection underlines the important role of *EhCP5* for the pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 149(1): 58-64.
- Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477(1-2): 98-111.
- Walker KW, Gilbert HF. Scanning and escape during protein-disulfide isomerase-assisted protein folding. *J Biol Chem.* 1997; 272(14): 8845-8.
- 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.
- WHO/PAHO/UNESCO Report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull.* 1997; 18: 13-4.
- Willhoeft U, Hamann L, Tannich E. A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infect Immun.* 1999; 67(11): 5925-9.
- Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(6): 1023-32.
- Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, Stanley SL Jr. Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infect Immun.* 2004; 72(2): 678-83.

## ANEXO. Tablas de resultados

**Tabla 6.** Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína *EhCP5* en el tamizado de 8 condiciones.

Resultados en URF min<sup>-1</sup>.

Tiempo (h)	CONDICIÓN							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0	0.0811	0.3282	0.0956	0.0550	0.1198	0.0000	0.0068	0.0000
24	0.1016	0.1151	0.0689	0.0621	0.1059	0.1632	0.0000	0.1767
48	0.0069	0.7848	0.9631	0.1280	0.0626	0.1291	0.2575	1.5640

**Tabla 7.** Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína *EhCP5* en el tamizado de 4 condiciones.

Media y desviación estándar de dos experimentos independientes. Resultados en URF min<sup>-1</sup>.

Tiempo (h)	CONDICIÓN							
	2		3		7		8	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0	0.0497	0.0702	0.0214	0.0215	0.0012	0.0016	0.0448	0.0026
8	0.0085	0.0120	0.0904	0.1278	0.0951	0.0916	0.0510	0.0012
24	0.2066	0.2442	0.0069	0.0057	0.0000	0.0000	0.1132	0.0131
32	0.1465	0.0030	0.0116	0.0164	0.0710	0.0915	0.1428	0.0015
48	0.0372	0.0276	0.1740	0.2461	0.0307	0.0434	0.0796	0.0019

**Tabla 8.** Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína *EhCP5* en el tamizado de la condición 8 a diferentes concentraciones de glicerol y arginina.

Media y desviación estándar de dos experimentos independientes. Resultados en URF min<sup>-1</sup>.

Tiempo (h)	CONDICIÓN							
	8-0		8-1		8-2		8-3	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0	0.0456	0.0644	0.0661	0.0143	0.0177	0.0251	0.2204	0.1762
8	0.0710	0.0827	0.0234	0.0253	0.2066	0.2551	0.0712	0.1006
24	0.0148	0.0014	0.2001	0.1273	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
32	0.0511	0.0091	0.1088	0.0207	0.0037	0.0052	0.1482	0.1859
48	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0256	0.0349	0.0000	0.0000

**Tabla 9.** Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína *EhCP5* en el tamizado de la condición 8-1 a diferentes valores de pH (pH 6.5, 7.5, 8.0 y 8.5).

Media y desviación estándar de dos experimentos independientes. Resultados en URF min<sup>-1</sup>.

Tiempo (h)	CONDICIÓN							
	8-1A (pH 6.0)		8-1B (pH 7.5)		8-1C (pH 8.0)		8-1D (pH 8.5)	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0573	0.0811	0.2371	0.3353
8	0.2015	0.1433	0.0696	0.0178	0.0918	0.0408	0.1311	0.0900
24	0.0701	0.0351	0.0656	0.0134	0.4887	0.5856	0.3949	0.3956
32	0.0765	0.0074	0.0633	0.0018	0.0988	0.0011	0.0658	0.0061
48	0.1505	0.0528	0.1807	0.0587	0.2355	0.1178	0.1989	0.0015

**Tabla 10.** Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína *EhCP5* a diferentes concentraciones de *EhPDI*.

Media y desviación estándar de dos experimentos independientes. Resultados en URF min<sup>-1</sup>.

<i>EhPDI</i> [μM]	Media	D.E.
1.25	0.0000	0.0000
2.50	0.0052	0.0074
3.75	0.0035	0.0010
5.00	0.0060	0.0007
6.25	0.0162	0.0057
7.50	0.0060	0.0008
8.75	0.0063	0.0007

**Tabla 11.** Resultados del ensayo de replegamiento de la proteína *EhCP5* a diferentes concentraciones de *EhCP5* desnaturalizada y reducida.

Media y desviación estándar de dos experimentos independientes. Resultados en URF min<sup>-1</sup>.

[ <i>EhCP5r</i> ]	PROMEDIO	D.E.
1.25	0.0458	0.0033
2.5	0.0505	0.0233
3.75	0.0510	0.0523
5.0	0.0810	0.0127
6.25	0.0800	0.0057
7.5	0.0650	0.0008