



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

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

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD OXIDASA E ISOMERASA DE LA ENZIMA
PROTEÍNA DISULFURO ISOMERASA DE *Saccharomyces cerevisiae***

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
PRESENTA**

RODRÍGO LAMEDA DÍAZ CONDE

Tijuana, B. C.

Mayo de 2011.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme brindado esta experiencia en la que descubrí y desarrollé la capacidad dentro de mí para haber logrado este objetivo y seguir preparándome con seguridad y confianza para los siguientes retos que se presenten en mi vida académica y profesional.

A mi familia por su amor y apoyo incondicional no solo durante la carrera universitaria, sino a lo largo de toda mi vida; gracias a ustedes estoy donde debo de estar y soy lo que debo de ser.

Al Dr. Marco Ramos y a la Dra. Rosa Elena Mares por su apoyo y confianza al haberme ofrecido esta oportunidad y por la experiencia, habilidades y conocimientos adquiridos gracias a ellos durante mi estadía en el laboratorio de biotecnología, así como por su amistad y los buenos momentos compartidos fuera de la universidad.

A mi novia Fanny Calvo por su compañía, cariño y apoyo en mis actividades académicas.

A mi compañera y amiga Analleli Malvárez por su amistad y apoyo durante la carrera universitaria, y por la experiencia compartida al realizar la primera parte de esta tesis juntos.

A mis amigos y compañeros de la carrera profesional y del laboratorio de biotecnología que me apoyaron y brindaron su amistad, y por los buenos momentos juntos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.012/11
Tijuana, Baja California
Mayo 05/11

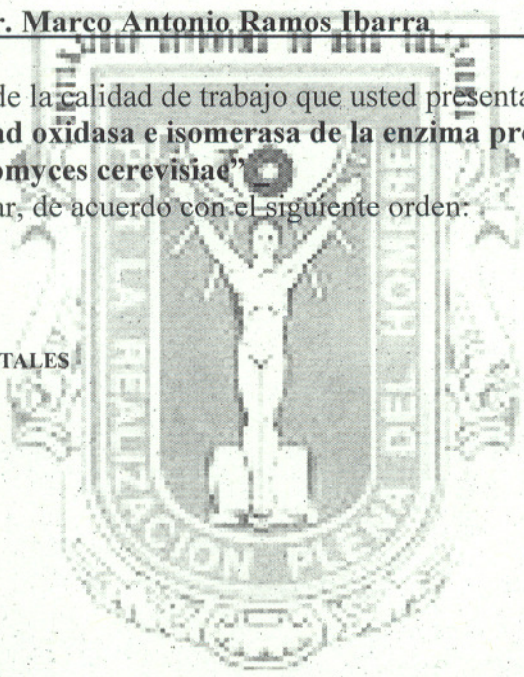
C. LAMEDA DIAZ CONDE RODRIGO
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente


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

es propuesto por el Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra


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

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- ANTECEDENTES
- III.- METODOS EXPERIMENTALES
- IV.- ZONA DE ESTUDIOS
- V.- RESULTADOS
- VI.- CONCLUSIONES
- VII.- REFERENCIAS





Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Asesor



Q. Noemi Hernández Hernández
Sub- Director



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

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

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

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento de la
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
(Financiamiento No. 47554, Ciencia Básica SEP-CONACYT 2004)

Tabla de Contenido

Índice de Figuras	6
Índice de Tablas	7
Abreviaturas	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.1.1. <i>Ciclo de vida</i>	9
1.1.2. <i>Ciclo celular</i>	10
1.1.3. <i>Vía de secreción</i>	12
1.2. <i>Plegamiento de proteínas</i>	12
1.2.1. <i>Plegasas y chaperonas</i>	12
1.2.2. <i>Plegamiento de proteínas en el citosol</i>	13
1.2.3. <i>Plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico rugoso</i>	14
1.2.4. <i>Plegamiento de proteínas en otros compartimentos</i>	14
1.2.5. <i>Plegamiento de proteínas in vitro</i>	15
1.3. <i>Proteína disulfuro isomerasa (PDI)</i>.....	16
1.3.1. <i>Superfamilia de tiorredoxinas</i>	16
1.3.2. <i>Familia de proteínas disulfuro isomerasa</i>	16
1.3.3. <i>Actividad como oxidorreductasa</i>	17
1.3.4. <i>Función como chaperona y anti-chaperona</i>	19
1.3.5. <i>Otras funciones celulares</i>	20
1.4. <i>PDI de Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.4.1. <i>Familia PDI de S. cerevisiae</i>	21
1.4.2. <i>Genética y bioquímica de ScPDI1</i>	22
1.4.3. <i>Localización y función celular de ScPDI1</i>	23
1.4.4. <i>ScPDI1 como proteína esencial de S. cerevisiae</i>	24
1.4.5. <i>ScPDI1 como modelo de enzimas PDI</i>	24
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. <i>Objetivo general</i>.....	27
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	27

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1. Reactivos químicos y soluciones	28
4.2. Reactivos biológicos y estuches comerciales.....	29
4.3. Células bacterianas y medios de cultivo.....	31
4.3.1. Células bacterianas.....	31
4.3.2. Medios de cultivo.....	31
4.3.3. Preparación de <i>E. coli</i> competente.....	32
4.4. Plásmidos y oligonucleótidos sintéticos.....	32
4.4.1. pCT38.....	32
4.4.2. pQE30.....	33
4.4.3. Oligonucleótidos sintéticos.....	34
4.5. Equipo y software.....	34
4.6. Amplificación y purificación de ScPDI1.....	35
4.6.1. Amplificación de ScPDI1.....	35
4.6.2. Purificación del producto de PCR ScPDI1.....	35
4.7. Purificación de pQE30.....	36
4.8. Construcción del plásmido pQYPDI	37
4.8.1. Digestión del producto de PCR ScPDI1.....	37
4.8.2. Digestión del plásmido pQE30.....	37
4.8.3. Purificación de los productos de la digestión enzimática.....	38
4.8.4. Ligación de los fragmentos ScPDI1 y pQE30.....	38
4.9. Selección de transformantes portadoras de pQYPDI.....	39
4.9.1. Transformación bacteriana.....	39
4.9.2. Selección y análisis de transformantes estables.....	39
4.9.3. Caracterización molecular de pQYPDI.....	40
4.10. Análisis de expresión de la proteína recombinante ScPDI1	41
4.10.1. Cultivos analíticos.....	41
4.10.2. Obtención de mini-lisados bacterianos totales.....	42
4.10.3. Análisis de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.....	42
4.11. Expresión y purificación de la proteína recombinante ScPDI1	42
4.11.1. Cultivos preparativos.....	42
4.11.2. Obtención de lisados bacterianos en condiciones nativas.....	43
4.11.3. Purificación mediante cromatografía de afinidad.....	43
4.11.4. Purificación mediante cromatografía de exclusión molecular.....	44
4.11.5. Cuantificación mediante espectrofotometría UV.....	44
4.12. Análisis de la actividad oxidasa de ScPDI1 recombinante	45

4.12.1. Ensayo de actividad oxidasa usando RNAsa como sustrato.....	45
4.12.2. Actividad oxidasa a diferentes concentraciones de sustrato.....	47
4.12.3. Ensayos de inhibición de la actividad oxidasa.....	47
4.13. Análisis de la actividad isomerasa de ScPDI1 recombinante.....	48
4.13.1. Ensayo de actividad lítica de lisozima.....	49
4.13.2. Actividad isomerasa a diferentes concentraciones de enzima	49
4.13.3. Actividad isomerasa a diferentes concentraciones de sustrato.....	50
4.13.4. Efecto de urea sobre la actividad isomerasa.....	50
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	51
5.1. <i>El gen pdi1 de levadura, codificante para ScPDI1</i>	<i>51</i>
5.2. <i>Clonación de la secuencia nucleotídica codificante para ScPDI1</i>	<i>52</i>
5.3. <i>Caracterización molecular de pQYPDI.....</i>	<i>53</i>
5.4. <i>pQYPDI, el plásmido de expresión de ScPDI1</i>	<i>53</i>
5.5. <i>Expresión y purificación de la proteína recombinante ScPDI1</i>	<i>54</i>
5.6. <i>ScPDI1 como enzima con actividad oxidasa.....</i>	<i>57</i>
5.7. <i>Análisis de la actividad oxidasa de ScPDI1.....</i>	<i>59</i>
5.8. <i>Análisis de la inhibición de la actividad oxidasa de ScPDI1.....</i>	<i>61</i>
5.9. <i>Análisis de la actividad isomerasa de ScPDI1</i>	<i>62</i>
6. CONCLUSIONES.....	67
7. BIBLIOGRAFIA.....	68
ANEXO. Tablas de resultados.....	70

Índice de Figuras

Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	10
Figura 2. Representación esquemática del ciclo en células eucarióticas.....	11
Figura 3. Representación esquemática de una reacción de oxidorreducción que cataliza la isomerización de disulfuros de una proteína naciente.....	17
Figura 4. Representación esquemática de las reacciones de oxidorreducción dependientes del estado oxidativo de la proteína PDI.....	19
Figura 5. Representación esquemática de la función como chaperona/anti-chaperona molecular de la proteína PDI.....	20
Figura 6. Representación esquemática de la familia PDI de levadura.....	21
Figura 7. Representación esquemática de la estructura primaria y terciaria de la proteína PDI1 de levadura.....	23
Figura 8. Representación circular del plásmido pCT38.....	33
Figura 9. Representación circular del plásmido pQE30.....	33
Figura 10. Secuencia nucleotídica y polipeptídica de la enzima PDI1 de <i>S. cerevisiae</i>	51
Figura 11. Separación electroforética del producto de PCR ScPDI1.....	52
Figura 12. Separación electroforética de los productos de digestión para la liberación del inserto (ScPDI1) de 7 clonas estables (C1-C7).....	53
Figura 13. Separación electroforética de los productos de digestión para la caracterización del inserto (ScPDI1) de 4 clonas estables (C1-C4).....	54
Figura 14. Representación circular del plásmido pQYPDI, secuencia polipeptídica de la proteína recombinante ScPDI1 y algunas de sus propiedades fisicoquímicas relevantes.....	55
Figura 16. Separación electroforética y análisis de las fracciones colectadas durante la purificación de ScPDI1 recombinante mediante cromatografía de afinidad a níquel.....	56
Figura 16. Separación electroforética de proteínas de los lisados bacterianos totales de 4 clonas (C1-C4) que expresan la proteína recombinante ScPDI1.....	56
Figura 17. Representación gráfica del análisis comparativo de la actividad oxidasa de ScPDI1 y <i>EhPDI</i>	57

Índice de Tablas

Tabla 1. Listado de proveedores de los reactivos utilizados.	28
Tabla 2. Oligonucleótidos sintéticos utilizados para amplificar el gen ScPDI1.	34
Tabla 3. Análisis comparativo de las actividades oxidasa de las enzimas PDI de levadura (ScPDI1) y amiba (<i>EhPDI</i>).	70
Tabla 4. Análisis del efecto de la concentración de ScPDI1 sobre la actividad oxidasa.	70
Tabla 5. Análisis del efecto de la concentración de drRNAsa sobre la actividad oxidasa. ...	71
Tabla 6. Análisis del efecto de la concentración de bacitracina sobre la actividad oxidasa de ScPDI1.	71
Tabla 7. Determinación de actividad lítica de las soluciones de lisozima (nLZM y scLZM). .	72

Abreviaturas

A_{280} , A_{450} ; $A_{0.1\%}$	Absorbancia a 280 nm o 450 nm; Absorbancia a una concentración de 0.1% de proteína en solución	K_i	Constante de inhibición aparente
aa	Aminoácido	KKKKNQD	Lis, Lis, Lis, Lis, Asn, Gln, Asp
ADN	Acido desoxirribonucleótido	K_m	Constante de Michaelis-Menten
AE	Actividad específica	LBT	Lisado bacteriano total
ARN	Acido ribonucleótido	Log	Logaritmo base 10
ATP	Trifosfato de adenosina	LZM	Lisozima de clara de huevo de gallina
Bac	Bacitracina	mg; ng	Miligramo(s); Nanogramo(s)
bCIP	Fosfatasa alcalina de intestino de becerro	MgCl₂	Cloruro de magnesio
BCO	Muestra blanco	mL; μL	Mililitro(s); Microlitro(s)
BM	Biología molecular	M; mM; μM	Molar; milimolar; micromolar
CaCl₂	Cloruro de calcio	MPM	Marcador de peso molecular
cCMP	Monofosfato de citidina 2,3-cíclico	MOPS	Acido 3-morfolino-propano-1-sulfónico
CI; SI	Con inductor; Sin inductor	NaCl	Cloruro de sodio
CMP	Monofosfato de 2,3-citidina	nLZM	LZM nativa
CXXC	Motivo Cys-aa-aa-Cys	nm	Nanómetro(s)
CXXS	Motivo Cys-aa-aa-Ser	NTA-Ni	Ácido nitrilo-triacético-níquel
D.E.	Desviación estándar	PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados	pb; Kb	Par(es) de bases; Kilopar(es) de bases
drRNAse	RNAse desnaturalizada y reducida	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Dsb	Proteína de unión a disulfuro	PDI	Proteína disulfuro isomerasa
DTDP	4,4'-ditiopiridona	PPCR	Producto de PCR
DTNB	5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)	PPI	Peptidil proil cis/trans isomerasa
DTT	DL-ditiotreitól	RB	Amortiguador de replegamiento
E	Elución	RER, ER	Retículo endoplásmico rugoso
E_{280}	Extinción molar a 280 nm	RNAse	Ribonucleasa A de páncreas de bovino
EC_{50}	Concentración efectiva al 50%	rpm	Revoluciones por minuto
EDTA	Acido etilendiamino tetra-acético	RQ	Reducción química
EhPDI	PDI de <i>Entamoeba histolytica</i>	scLZM	LZM reoxidada aleatoriamente (scrambled)
EtBr	Bromuro de etidio	ScPDI; YPDI	PDI de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FNP	Fración no pegada	SDS	Dodecil sulfato de sodio
GSH, GSSG	Glutatiól reducido Glutatiól oxidado	Taq ADN pol	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
h; min; seg	Hora(s); Minuto(s); Segundo(s)	TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
H₂O	Agua	Tm	Temperatura de fusión
HDEL	His, Asp, Glu, Leu	Tris	Tris(hidroximetil-aminometano)
HEPES	Acido N-2-hidroxietyl piperacina-N'-2'-etansulfónico	Trx	Dominio tioredoxina
Hsc	Heat shock cognate	U	Unidades
Hsp	Heat shock protein	UFC	Unidades formadoras de colonias
IC_{50}	Concentración efectiva inhibitoria al 50% de actividad enzimática	UV	Ultravioleta
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido	V	Voltios
K_{cat}	Constante catalítica	V₀	Velocidad inicial
KDa	KiloDalton	W, LV	Lavado (wash)
KH₂PO₄	Fosfato monobásico de potasio	WCGHCK	Trp, Cys, Gly, His, Cys, Lys

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

1.1.1. Ciclo de vida

Las levaduras son organismos eucarióticos unicelulares que pueden presentar varias morfologías (ovalados, esféricos o casi cilíndricos) y casi siempre se dividen de manera asimétrica o por gemación. Las células de la levadura *S. cerevisiae* pueden existir indefinidamente en forma haploide (vegetativa) con 16 cromosomas. Pero ocasionalmente, dos células haploides se pueden conjugan para dar una célula diploide con 32 cromosomas [Madigan, 2004].

En células haploides de *S. cerevisiae*, la mitosis ocurre antes de la citocinesis, de esa manera mantiene 16 cromosomas por célula. Las levaduras tienen dos tipos diferentes de células haploides denominados tipos sexuales: *a* y α ; éstos pueden considerarse análogos a los gametos femenino y masculino. Cuando se conjugan dos células de tipo sexual opuesto se origina una célula diploide.

A partir de una célula diploide única, se forma una estructura que contiene cuatro gametos, dos de cada tipo sexual. La célula en la que los gametos se forman se denomina “asca” o espóra, y las células formadas en el interior del asca se denominan “ascosporas” (Figura 1) [Madigan, 2004].

1.1.2. Ciclo celular

El estudio del ciclo celular de la levadura *S. cerevisiae* ha conducido a la investigación fisiológica, genética y bioquímica de organismos eucariotas superiores. La levadura, al igual que la gran mayoría de las células eucarióticas, presenta los estadios G_0 , G_1 , S, G_2 y mitosis (Figura 2). En la fase G_0 , la célula permanece activa y viable pero en reposo, sin entrar a las siguientes fases preparativas para la duplicación celular. En la fase G_1 , la célula inicia su crecimiento y maduración, mediante la síntesis de proteínas necesarias para ello, así como la duplicación de organelos. El final de esta fase está caracterizado por la duplicación del huso mitótico, el inicio de la replicación del ADN y de la gemación. En la fase S se lleva a cabo la replicación del ADN y la síntesis de histonas. En la fase G_2 , la célula ha duplicado su tamaño, volumen, organelos y demás componentes, y se prepara para entrar en mitosis. Ya durante ésta, se lleva a cabo la migración de los cromosomas hacia cada eje de la célula, la cariocinesis y la citocinesis [Karp, 2005].

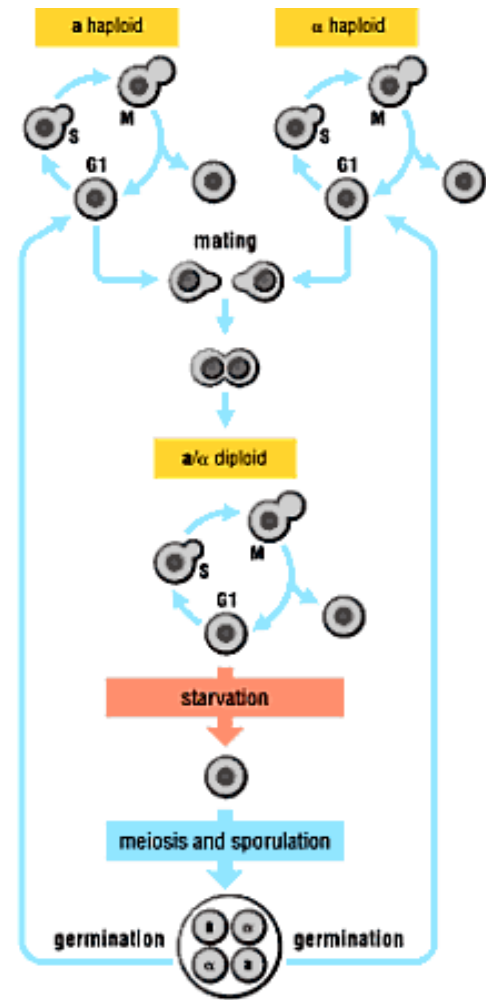


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de la levadura *S. cerevisiae*.

Tomado de Morgan, 2006. Traducción: haploid, haploide; mating, apareamiento; diploid, diploide; starvation, inanición; sporulation, esporulación; germination, germinación.

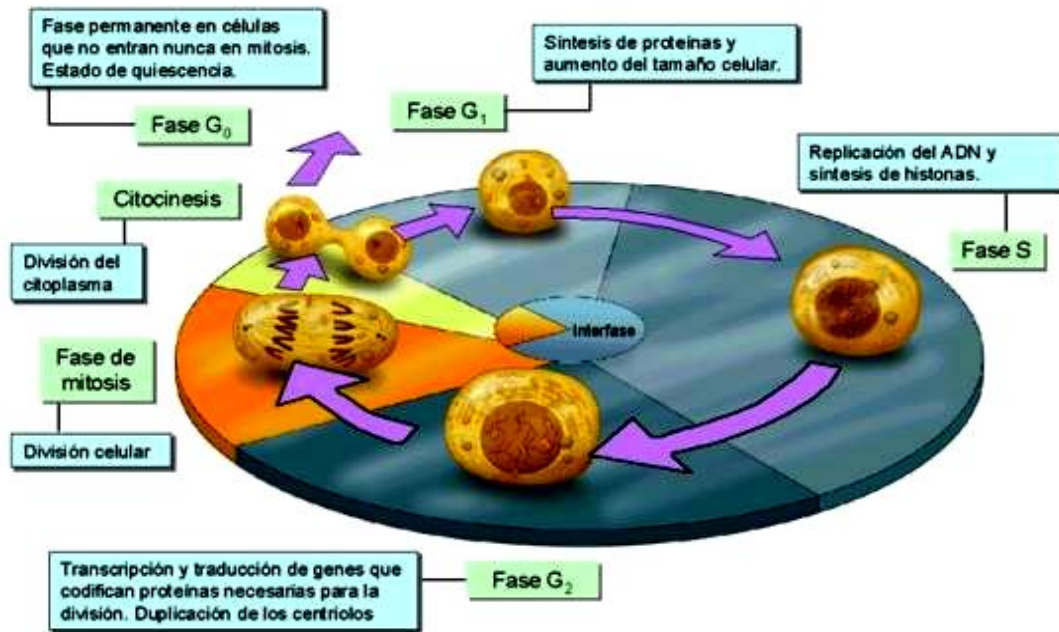


Figura 2. Representación esquemática del ciclo en células eucarióticas.

[http://marcirbiologia.blogspot.com/2009/08/ciclo-celular-y-mitosis_6765.html]. Tomado el 12/11/10.

Como se comentó anteriormente, el ciclo celular es muy similar en todos organismos eucarióticos, pero lo que hace diferente a *S. cerevisiae* es su capacidad para formar células haploides, o conjugarse con otra célula (de diferente tipo sexual) para formar células diploides [Karp, 2005; Klug, 2006; Hartwell, 1974].

La respuesta a esta capacidad se encuentra en la secreción del factor de apareamiento: las células “ α ” secretan el factor α y las células “a” el factor a. Este factor es reconocido entre diferentes tipos sexuales y permite llevar a cabo la conjugación. Para que esto sea posible, las dos células deben de encontrarse en la misma fase celular; específicamente durante la fase G_1 , antes de que el ADN se duplique y los cromosomas migren a los polos. Esto permite que el ADN de las dos células sufra recombinación durante la meiosis y se lleve a cabo la reducción

cromosomal en la primera división y la duplicación durante la segunda división de manera normal, hecho que no podría ser posible si las células se conjugaran en otras fases del ciclo celular [Hartwell, 1974].

1.1.3. Vía de secreción

La mayoría de las proteínas que pasan por la vía de secreción en levadura son destinadas a la membrana celular, ya sea como proteínas integrales o como enzimas involucradas en su formación durante la gemación. La vía de secreción es similar al de células de mamífero y otros eucariotes [Pringle, 1997]. Inicialmente, las proteínas nacientes son transportadas al retículo endoplásmico [Karp, 2005]. Una vez en este compartimento, las proteínas son modificadas para que adquieran su conformación correcta a través de: la adición de carbohidratos, la isomerización cis/trans de residuos de prolina y la oxidación/rearreglo de enlaces disulfuro. Posteriormente, las proteínas son transportadas al aparato de Golgi en vesículas, donde pueden experimentar otras modificaciones post-traduccionales. Finalmente son enviadas, también en vesículas, a la membrana plasmática [Pringle, 1997].

1.2. Plegamiento de proteínas

1.2.1. Plegasas y chaperonas

La mayoría de las veces, un polipéptido recién sintetizado necesita de “ayuda” para lograr su estructura terciaria correcta, y así alcanzar su conformación nativa y activa. Una proteína puede plegarse por sí sola de manera espontánea dependiendo del ambiente en el cual se encuentre, ya sea reductor u oxidante

(oxidativo); pero este plegamiento puede ser aleatorio y no hacerlo correctamente. Existe un grupo de proteínas que se encargan de catalizar reacciones intramoleculares y de asistir a los polipéptidos nacientes en el mecanismo de adopción de su forma nativa, entre las que figuran las peptidil prolil cis/trans isomerasas (PPI), la familia de proteínas disulfuro isomerasas (PDI) y las chaperonas. Las proteínas PPI y PDI se encargan del correcto plegamiento proteico mediante reacciones de isomerización, principalmente; en tanto que las proteínas chaperonas son moléculas que facilitan el plegamiento, uniéndose a sitios específicos de secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos expuestos. Con esto, se evita que el polipéptido pueda plegarse de manera incorrecta o forme interacciones no deseadas con otras proteínas [Karp, 2005; Schiene y Fischer, 2000].

1.2.2. Plegamiento de proteínas en el citosol

El citosol cuenta con un ambiente reductor, por lo que cuando una proteína se sintetiza en este compartimento, queda susceptible a adquirir un plegamiento incorrecto (inadecuado). Uno de los mecanismos principales de plegamiento en el citosol es mediado por proteínas chaperonas, como las “Heat shock cognate (Hsc)” y las “Heat shock proteins (Hsp)”, las cuales se unen a proteínas nacientes con el fin de proporcionarles estabilidad dinámica [Christis *et al*, 2008]. Entre los polipéptidos que se pliegan en el citosol se encuentran las proteínas del citoesqueleto, las proteínas periféricas de membranas internas, las proteínas que se transportan al núcleo, a la mitocondria y a otros organelos y, además, las enzimas de la glucólisis [Karp, 2005].

1.2.3. Plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico rugoso

El plegamiento de proteínas destinadas a seguir la vía de secreción se lleva a cabo en un sistema endomembranoso, constituido por el retículo endoplásmico rugoso (RER). En el lumen de éste, existe un ambiente oxidante y se encuentran las enzimas que llevan a cabo las reacciones necesarias para que los polipéptidos nacientes alcancen su estructura terciaria nativa y activa. El ambiente oxidante y la actividad enzimática dependen, entre otras cosas, de los regeneradores redox, tales como las enzimas tiorredoxinas y los glutationes. Además, el RER cuenta con proteínas chaperonas, encargadas de evitar agregación proteica indeseada y la formación de cuerpos de inclusión. Las proteínas mal plegadas son retrotransportadas desde el aparato de Golgi hacia el RE, en donde estarán sujetas a múltiples conformaciones hasta lograr su estructura correcta, o en su defecto, ser transportadas al citosol donde serán degradadas en los proteasomas. Todo esto forma parte del mecanismo de control de calidad del retículo endoplásmico rugoso; es decir, mientras una proteína no logre su conformación correcta, no seguirá la vía de secreción [Karp,2005; Kleizen y Braakman, 2004; Fassio y Sitia, 2002].

1.2.4. Plegamiento de proteínas en otros compartimentos

Este mecanismo ha sido más estudiado en células de mamífero. Existen otros compartimentos celulares en donde se han encontrado plegasas, como es el caso de la membrana celular y el núcleo. Además, también se han encontrado también estas enzimas fuera de la célula. La razón por la cual éstas son secretadas depende del tipo de célula y de la función requerida. Por ejemplo, en la membrana celular, la enzima PDI exhibe actividad reductasa, y se ha encontrado que está

involucrada en algunos mecanismos celulares, tales como la adhesión plaquetaria y la señalización por óxido nítrico. En el núcleo, la proteína PDI, y otras tiorredoxinas, funcionan como reguladores de genes inducidos por interferones y contribuyen a la unión de receptores de estrógenos al ADN [Turano *et al*, 2002].

1.2.5. Plegamiento de proteínas *in vitro*

Los medios mediante los cuales es posible una reacción enzimática son muy diferentes *in vitro* e *in vivo*. Las principales características diferenciales del plegamiento de proteínas *in vitro* son: la desnaturalización de proteínas por agentes físicos o químicos; el disolvente, que siendo lo más parecido posible al medio *in vivo*, no representa un ambiente fiel; y la concentración de proteínas y enzimas que puedan utilizarse para evitar posibles conglomerados. En tanto que *in vivo* se cuenta con proteínas chaperonas y otros intermediarios que pueden intervenir en la reacción; además, existen interacciones con otras proteínas accesorias que no participan directamente en la reacción.

Una ventaja de los ensayos de plegamiento de proteínas *in vitro* es el estudio de intermediarios de reacción, como es el estado de “globular fundido” (molten globule), el cual se estabiliza termodinámicamente por interacciones hidrofóbicas y corresponde a un estado entre el nativo y el desnaturalizado; específicamente, es el reordenamiento de la estructura secundaria nativa y la terciaria desnaturalizada. Además, se piensa que este estado es el responsable de la agregación proteica *in vitro*, ya que de éste y de la composición del medio depende que la proteína se pliegue correctamente en un determinado tiempo. Los ensayos *in vitro* representan una conclusión anticipada (a largo plazo), correspondiendo a una aproximación de

lo que sucede dentro de la célula y dan el preámbulo para continuar con ensayos y experimentos *in vivo* [Kuwajima, 1992; Müller-Esterl, 2008].

1.3. Proteína disulfuro isomerasa (PDI)

1.3.1. Superfamilia de tiorredoxinas

PDI es una familia de proteínas que forman parte de la superfamilia de las tiorredoxinas, las cuales se caracterizan por la presencia de dominios Trx (regiones de aprox. 100 residuos que se pliegan de manera similar a la tiorredoxina bacteriana), en donde se localizan los motivos CXXC, involucrados en la actividad oxidorreductasa mediante dos estados de oxidación: ditiol-disulfuro. Existen diferentes tipos de proteínas en esta familia, tales como las proteínas Dsb en procariontes y la familia ERp en mamíferos. La levadura *S. cerevisiae* contribuye con 5 integrantes: PDI1p, Mdp1p, Mdp2p, Eug1p y Eps1p [Wilkinson, 2004].

1.3.2. Familia de proteínas disulfuro isomerasa

Los organismos procariontes no cuentan con enzimas PDI, en su lugar tienen las proteínas periplásmicas Dsb [Schiene y Fischer, 2000]. En eucariotes, existe una gran familia de PDI, las cuales, además de presentar múltiples dominios Trx, exhiben similitud en su secuencia de aminoácidos y su estructura terciaria. En mamíferos las proteínas ERp44, ERp57, ERp72 y ERdj5 contienen 1, 2, 3 y 4 dominios Trx, respectivamente; en tanto que en levadura, Eps1p, Mdp1p y Mdp2p presentan 1 dominio Trx, mientras que Pdi1p y Eug1p contienen 2, aunque ésta

última presenta una variante del motivo CXXC en ambos dominios (CXXS) [Wilkinson, 2004].

1.3.3. Actividad como oxidoreductasa

La actividad oxidoreductasa es la principal función biológica de la PDI dentro del retículo endoplásmico. Esta actividad se debe a los motivos CXXC localizados en los sitios catalíticos de sus dominios Trx; principalmente por reacciones de oxidación, reducción e isomerización de cisteínas entre la enzima PDI y las proteínas recién sintetizadas se favorece el plegamiento correcto de éstas últimas. En los dominios Trx, las cisteínas (del motivo CXXC) juegan un papel muy importante dependiendo del estado oxidativo (oxidante) en que se encuentren, ya sea como ditiol o disulfuro.

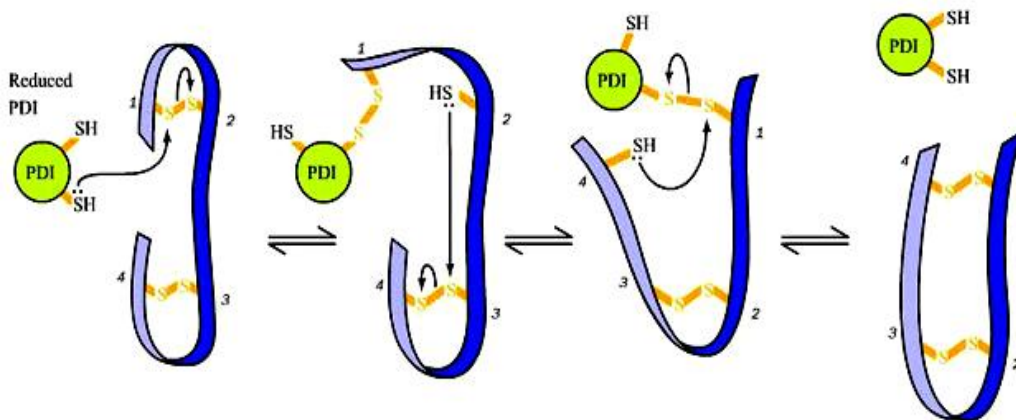


Figura 3. Representación esquemática de una reacción de oxidoreducción que cataliza la isomerización de disulfuros de una proteína naciente.

[<http://www.bch.msu.edu/faculty/ekstrom/fulltextEkstrom.html>]. Tomado el 12/11/10.

La Figura 3 muestra el mecanismo de la reacción de oxidorreducción que cataliza la isomerización de disulfuros de una proteína (sustrato) con dos enlaces disulfuro incorrectos. El mecanismo inicia con el ataque nucleofílico de un tiol libre de la PDI (estado reducido) a uno de los enlaces disulfuro del sustrato, dando como resultado la formación de un enlace disulfuro intermediario (PDI-sustrato) y la generación de un tiol libre en el sustrato. Enseguida, se lleva a cabo un segundo ataque nucleofílico, desde el tiol libre generado en el sustrato hacia el segundo enlace disulfuro de éste, rindiendo un enlace disulfuro correcto y la generación de un segundo tiol libre en el sustrato. Finalmente, un tercer ataque nucleofílico se lleva a cabo, desde el segundo tiol libre generado en el sustrato hacia el enlace disulfuro intermediario (PDI-sustrato), obteniéndose a la PDI en su estado inicial (reducido) y el sustrato con dos enlaces disulfuro correctamente oxidados.

Además de la isomerización de enlaces disulfuro, la PDI, como una oxidorreductasa, puede reducir un enlace disulfuro (actividad reductasa) o formar un enlace disulfuro mediante la oxidación de dos tioles (actividad oxidasa). La Figura 4 muestra el equilibrio bioquímico entre las actividades oxidasa y reductasa: si PDI se encuentra en su estado reducido (ditiol), tendrá la capacidad de reducir y se oxidará; de igual manera, si PDI se encuentra en su estado oxidado (disulfuro), puede oxidar y se reducirá. La regeneración del estado oxidativo de la PDI puede llevarse a cabo mediante la participación de un regenerador redox, tal como tiorredoxina reductasa o glutatión [Wilkinson, 2004; Noiva, 1999].

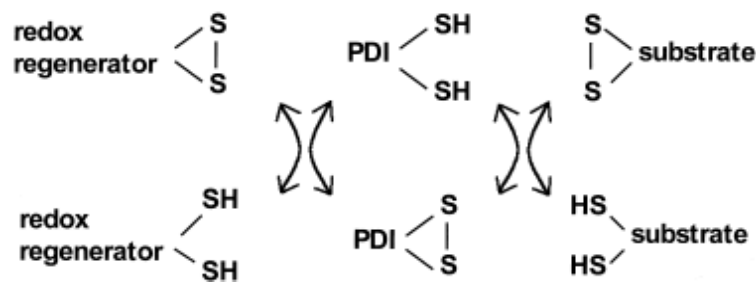


Figura 4. Representación esquemática de las reacciones de oxidorreducción dependientes del estado oxidativo de la proteína PDI.

Tomado de Noiva, 1999. Traducción: regenerator, regenerador; substrate, sustrato.

1.3.4. Función como chaperona y anti-chaperona

La actividad chaperona consiste en la asistencia al plegamiento de proteínas mal plegadas o plegadas incorrectamente mediante interacciones proteína-proteína; es decir, no es reactivo y depende primordialmente de una unión mediante interacciones no covalentes. En la proteína PDI1 de levadura, se observó que la ausencia de 51 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal correlaciona con la pérdida de la actividad chaperona, concluyendo que los motivos estructurales para esta actividad se encuentran entre los dominios a' y c. La actividad chaperona tiene la función de evitar agregados proteicos que pudieran resultar en cuerpos de inclusión y llegar a ser tóxicos para la célula (ver Figura 5) [Wilkinson, 2004; Noiva, 1999].

Por otra parte, la actividad anti-chaperona favorece la agregación de péptidos y proteínas mal plegadas mediante la formación de redes entrecruzadas, con la finalidad de retenerlas y evitar que sigan la vía de secreción. Ambas actividades, chaperona y anti-chaperona, entran en juego cuando en el retículo endoplásmico se

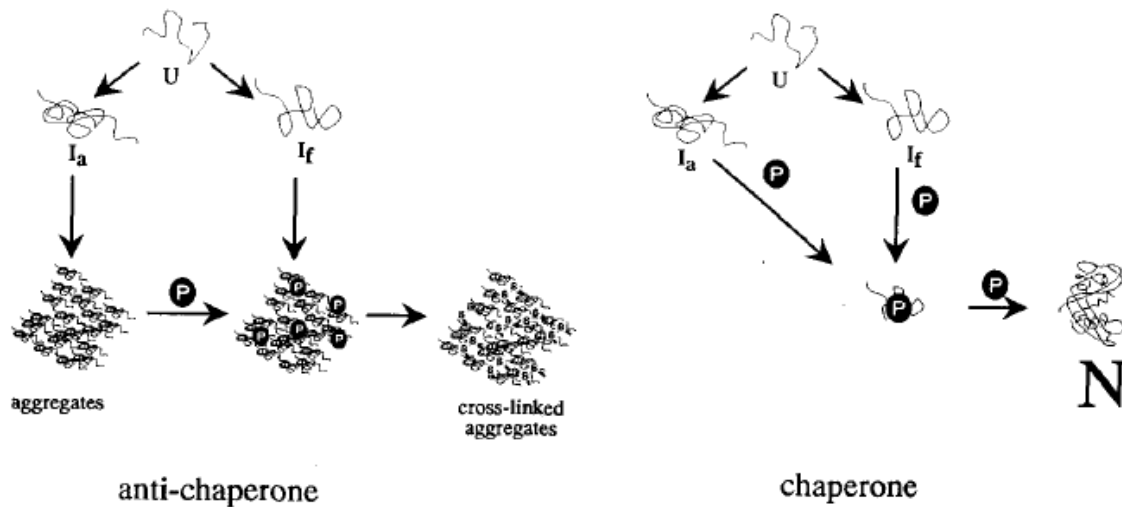


Figura 5. Representación esquemática de la función como chaperona/anti-chaperona molecular de la proteína PDI.

Tomado de Puig y Gilbert, 1994. Traducción: aggregates, agregados; cross-linked, entrecruzados; chaperone, chaperona.

presentan situaciones de estrés, como la sobre-expresión de proteínas, insuficiencia de ATP o pérdida del potencial amortiguador redox [Sideraki y Gilbert, 2000].

Aparentemente, las actividades chaperona y anti-chaperona de la PDI dependen de su concentración relativa: a una relación mayor a 10:1 (PDI:sustrato), se observa la actividad chaperona, mientras que si existe una mayor cantidad de sustrato (>5:1, sustrato:PDI), se presenta la actividad anti-chaperona [Wilkinson, 2004; Puig y Gilbert, 1994].

1.3.5. Otras funciones celulares

Además de las funciones principales de la PDI, previamente descritas, se ha demostrado su participación como componente (subunidad β) de la enzima prolil-4-hidroxilasa, la cual realiza modificaciones post-traduccionales de polipéptidos que participan en la formación y estabilidad del colágeno, así como dentro del sistema

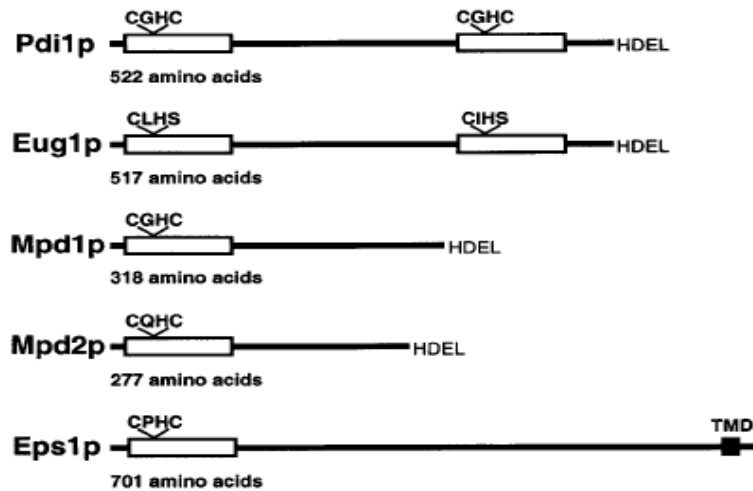


Figura 6. Representación esquemática de la familia PDI de levadura.

Se muestran tanto los dominios Trx (cajas) y el motivo CXXC como la señal de retención en el retículo endoplásmico (HDEL) y el dominio transmembranal (TMD). Tomado de Nørgaard, 2001.

de glucosilación de residuos de asparagina [Farquhar *et al*, 1991]. Otro papeles funcionales atribuidos a la PDI es su participación dentro del complejo de transferencia de triglicéridos a lipoproteínas nacientes [Wetterau *et al*, 1990] y como receptor de membrana celular para proteínas y hormonas, tales como T₃, estradiol y otros estrógenos [Okada *et al*, 2010].

1.4. PDI de *Saccharomyces cerevisiae*

1.4.1. Familia PDI de *S. cerevisiae*

Además de la proteína PDI1, *S. cerevisiae* expresa otras 4 proteínas no esenciales, residentes del retículo endoplásmico, con homología a PDI, denominadas Mpd1p, Mpd2p, Eug1p y Eps1p codificadas en los genes *mpd1*, *mpd2*, *eug1* y *eps1*, respectivamente (ver Figura 6). La sobre-expresión de estas

proteínas en levaduras carentes de PDI1 revela que la Mpd1p es la única capaz de llevar a cabo las funciones vitales de oxidorreducción [Norgaard *et al*, 2001]; sin embargo, Mpd2p puede participar en reacciones de oxidación [Wilkinson, 2004]. Mpd2p, Eug1p y Eps1p no presentan actividad oxidorreductasa, pero si tienen actividad chaperona, lo que hace suponer que la supervivencia de la levadura recae principalmente en la actividad isomerasa. [Norgaard *et al*, 2001; Kimura *et al*, 2004].

Interesantemente, Eps1p no presenta una señal de retención en el retículo endoplásmico típica, pero si presenta un motivo KKKNQD, el cual es muy similar a HDEL; además, presenta un dominio transmembranal en su extremo C-terminal, por lo cual muestra su dominio Trx hacia el interior del lumen del retículo endoplásmico [Wang y Chang, 1999].

1.4.2. Genética y bioquímica de ScPDI1

El gen *pdi1* de *S. cerevisiae* se localiza en el cromosoma 3, codifica para un polipéptido de 522 residuos de aminoácidos que presenta 4 dominios Trx denominados: a, b, b' y a'; de los cuales a y a' son activos. Ambos dominios Trx-a exhiben el motivo WCGHCK (CXXC) en su sitio activo; por otro lado, los dominios Trx-b son inactivos, pero se sabe que juegan un papel importante en la unión a sustrato. Además, la PDI contiene una secuencia señal N-terminal que la conduce hacia el retículo endoplásmico y otra secuencia señal C-terminal (HDEL) que la retiene en éste compartimiento. Un tercer componente funcional, el dominio c, parece estar involucrado en la unión a calcio (ver Figura 7) [Tachikawa *et al*, 1991; Tian *et al*, 2006].

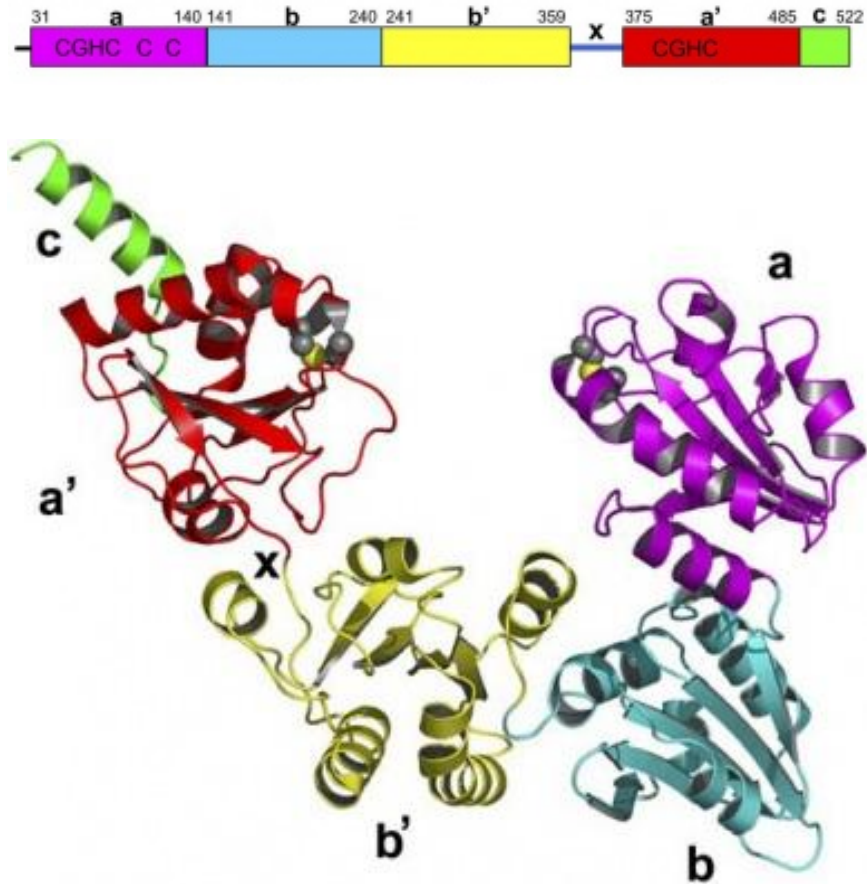


Figura 7. Representación esquemática de la estructura primaria y terciaria de la proteína PDI1 de levadura.

En el panel superior se muestra la arquitectura de los dominios funcionales y en el panel inferior se muestra la representación (en listones) de la estructura tridimensional cristalizada. Tomado de Tian, 2006].

1.4.3. Localización y función celular de ScPDI1

La enzima ScPDI1 se encuentra de manera abundante en el lumen del retículo endoplásmico rugoso, en donde cataliza la formación e isomerización de enlaces disulfuro a partir de grupos tiol de proteínas recién sintetizadas. También presenta actividad chaperona y anti-chaperona; la primera evita conglomerados proteicos y facilita su correcto plegamiento; la segunda promueve éstos mismos

para que formen parte de los cuerpos de inclusión dentro de la célula., todo esto dentro del control de calidad proteico del retículo endoplásmico [Kimura *et al*, 2004].

1.4.4. ScPDI1 como proteína esencial de *S. cerevisiae*

La delección del gen *pdi1* o mutaciones de PDI en sus sitios activos, cambiando las cisteínas por serinas (CXXS), lleva a la pérdida de la viabilidad de la célula. Se desconoce claramente cuál es el papel esencial de PDI1 en levadura. Sin embargo, se ha propuesto su participación en el rearrreglo de enlaces disulfuro de proteínas de la pared celular; sin esto, pierden su estabilidad y aumentan su porosidad. Otros estudios proponen que su función principal es la isomerización de disulfuros, ya que sus homólogos podrían llegar a complementar otras actividades, como la oxidasa, pero son incapaces de complementar la actividad isomerasa. Además, aún con mutaciones en sus sitios activos, la PDI1 exhibe actividad chaperona, esto nos lleva a concluir que esta actividad no reside en sus dominios Trx, y que no es esencial para la célula [Farquhar *et al*, 1991; LaMantia y Lennarz, 2004; Solovyov *et al*, 2004].

1.4.5. ScPDI1 como modelo de enzimas PDI

S. cerevisiae es el modelo eucariótico más utilizado por muchas razones, entre las cuales se encuentran el conocimiento de su genoma completo, su fácil manipulación y su poca o nula patogenicidad. La PDI1 de levadura no es la excepción; por tal motivo, es utilizada como modelo comparativo tanto en ensayos enzimáticos como en experimentos *in vivo* de complementación funcional. Además, varios estudios han demostrado una participación diferencial de los dominios Trx de

la enzima ScPDI1: el Trx-a es más activo *in vivo*, mientras que Trx-a' lo es más *in vitro*, al contrario de la PDI de mamífero. Se piensa que estas diferencias se deben al sustrato, al sitio de unión a sustrato que tiene cada enzima y a las condiciones oxidantes del medio [Westphal *et al*, 1999].

2. JUSTIFICACIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los modelos eucarióticos que mayores aportes ha brindado a la investigación biológica. Los conocimientos generados a partir de su ciclo de vida y su vía de secreción son considerados como patrones típicos celulares. De igual manera, a nivel molecular y funcional, su mecanismo de plegamiento de proteínas ha aportado proteínas y enzimas modelo. Tal es el caso de la familia PDI (proteína disulfuro isomerasa), donde la proteína ScPDI1 ha sido utilizada ampliamente como modelo en el plegamiento asistido de proteínas. El conocimiento de sus funciones bioquímicas ha colocado a ScPDI1 como un control obligado en estudios comparativos; específicamente, para aquellas proteínas PDI cuya función biológica no ha sido establecida con claridad.

Adicionalmente, los estudios genéticos de ScPDI1 han demostrado que esta enzima es esencial para la supervivencia de la levadura, ya que la mutante nula es inviable. Ante esto, la mutante carente de ScPDI1 se ha convertido en un excelente modelo heterólogo para ensayos de complementación funcional; específicamente, para proteínas PDI de organismos patógenos, representando un excelente sistema biológico para estudios dirigidos a la búsqueda de nuevos blancos farmacológico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Analizar las propiedades bioquímicas de las funciones oxidasa e isomerasa de la enzima recombinante PDI1 de *Saccharomyces cerevisiae* (ScPDI1) mediante ensayos *in vitro* de replegamiento asistido utilizando sustratos desnaturalizados e inhibición enzimática.

3.2. Objetivos específicos

1. Obtener la enzima recombinante ScPDI1 mediante protocolos estándar de clonación molecular y expresión-purificación bioquímica de proteínas.
2. Evaluar la actividad oxidasa de la enzima recombinante ScPDI1 mediante un ensayo de replegamiento oxidativo de RNAsa A desnaturalizada y reducida.
3. Determinar las constantes enzimáticas de la actividad oxidasa de la enzima recombinante ScPDI1.
4. Determinar el efecto inhibitorio de bacitracina y otros inhibidores sobre de la actividad oxidasa de la enzima ScPDI1.
5. Evaluar la actividad isomerasa de la enzima recombinante ScPDI1 mediante un ensayo de replegamiento de lisozima reoxidada aleatoriamente.
6. Determinar las constantes enzimáticas de la actividad isomerasa de la enzima ScPDI1.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos químicos y soluciones

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado BM (biología molecular). La Tabla 1 muestra los proveedores de los reactivos utilizados en el presente proyecto de tesis. Todas las soluciones fueron preparadas de acuerdo a los protocolos estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 1989].

Las soluciones de agarosa, a diferentes concentraciones, fueron preparadas

Tabla 1. Listado de proveedores de los reactivos utilizados.

Reactivo	Proveedor
Agarosa; Azul Brillante de Coomassie R-250; TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina)	Biorad
MOPS (Ácido 3-morfolino-propano-1-sulfónico)	Calbiochem
Acrilamida	EMD
Imidazol	Fisher Biotec
MgCl ₂	Fluka
DTT (DL-Ditiotreitol); EDTA•2Na (Sal disódica del ácido etilendiamino tetra-acético); SDS (Dodecil sulfato de sodio); Tris base (Tris[hidroximetil]-aminometano)	IBI Scientific
IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido)	Invitrogen
Ácido acético; Persulfato de amonio	JT BAKER
HEPES (Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etansulfónico); Urea	Mallinckrodt
β-Mercaptoetanol	Omnipur
Isopropanol; KH ₂ PO ₄	Prod. Qcos. Monterrey
Vancomicina	Sector Salud
Bromuro de etidio (EtBr); CaCl ₂ ; 2,4-Diclorofenol; DTNB (5,5'-Ditio-bis-[ácido 2-nitrobenzoico]); DTDP (4,4'-Ditiodipiridona); Glutati3n oxidado (GSSG); Glutati3n reducido (GSH); N,N'-Metilen-bisacrilamida; Monofosfato de 2,3-citidina c3clica (cCMP); NaCl	SIGMA

en amortiguador TAE (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA•2Na 1 mM). Las soluciones para electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) fueron preparadas de acuerdo a un protocolo estándar [Laemmli, 1970]: sol. de acrilamida (acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%), amortiguador “*upper*” (Tris 0.5 M, SDS 0.4%), amortiguador “*lower*” (Tris 1.5 M, SDS 0.4%), amortiguador de carga 2X para SDS-PAGE (glicerol 10%, SDS 2.5%, Tris-HCl 50 mM [pH 6.8], β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.002%), amortiguador de corrida (Tris 25 mM, glicina 0.19 M, SDS 0.1%), solución de tinción (isopropanol 25%, ácido acético 10%, azul de Coomassie R-250 0.2%) y solución de destinción (isopropanol 10%, ácido acético 10%).

Las soluciones para la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad a níquel fueron preparadas siguiendo las recomendaciones del proveedor (Qiagen): solución de lavado (Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 300 mM, imidazol 20 mM), solución de elución (Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 300 mM, imidazol 250 mM). La solución 5X de replegamiento oxidativo de lisozima (HEPES 500 mM, NaCl 100 mM, EDTA•2Na 10 mM, MgCl₂ 25 mM, [pH 7]) y la suspensión bacteriana de *Micrococcus lysodeikticus* (0.15 mg/mL, en amortiguador de KH₂PO₄ 0.1 M, [pH 6.2]) fueron preparadas de acuerdo a un protocolo estándar [Katiyar *et al.*, 2001].

4.2. Reactivos biológicos y estuches comerciales

Las muestras de ADN y proteínas fueron contrastadas con marcadores de peso molecular (*New England Biolabs*) (ADN: λ-*Hind*III, 1 Kb DNA Ladder, 100 pb

DNA Ladder; PROTEÍNAS: *Prestained Protein Marker, Broad Range 7-175 kDa*).

Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq* ADN pol) (Roche), la solución amortiguadora 10X para PCR proporcionada por el proveedor y una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) (*New England Biolabs*).

Las muestras de ADN fueron digeridas mediante la acción de endonucleasas (*Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III, *Hpa*II, *Pst*I) (*New England Biolabs*) utilizando los amortiguadores proporcionados por el proveedor. Los plásmidos fueron desfosforilados y ligados utilizando la fosfatasa alcalina de intestino de becerro recombinante (*bCIP*) y la ADN ligasa del bacteriófago T₄, respectivamente, utilizando los amortiguadores proporcionado por el proveedor (*New England Biolabs*).

Las muestras de ADN fueron purificadas utilizando estuches (Qiagen). Los productos de PCR y el ADN plasmídico fueron purificados utilizando los estuches *QIAprep*[®] *PCR Purification Kit* y *QIAprep*[®] *Spin Miniprep Kit*, respectivamente; en tanto que las muestras de ADN fueron purificadas a partir de gel utilizando el estuche *QIAquick*[®] *Gel Extraction Kit*. Los lisados bacterianos totales fueron preparados utilizando el estuche *CellLytic B Plus Kit* (Sigma).

La purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad a níquel fue realizada utilizando columnas de una suspensión de perlas de agarosa–NTA-Ni (Qiagen). La purificación de proteínas mediante exclusión molecular fue realizada utilizando columnas de *Sephadex G-25 (PD-10)* (Amersham Biosciences).

Los ensayos de actividad enzimática oxidasa e isomerasa fueron realizados utilizando las enzimas ribonucleasa A de páncreas de bovino (RNAse) y lisozima de

clara de huevo de gallina (LZM) (Sigma), respectivamente. El ensayo de actividad enzimática de RNAsa fue realizado utilizando monofosfato cíclico de 2,3-citidina (cCMP) como sustrato, así como células de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) para el ensayo de actividad lítica de LZM. El metalo-antibiótico Bacitracina (Sigma) fue utilizado como inhibidor específico de enzimas PDI. La enzima PDI de *Entamoeba histolytica* (EhPDIp38), utilizada como control, es parte de la reserva de proteínas recombinantes del Laboratorio de Biotecnología (FCQI-UABC).

4.3. Células bacterianas y medios de cultivo

4.3.1. Células bacterianas

La cepa XL1-Blue MRF' de *Escherichia coli* (*Stratagene*) fue utilizada para la transformación y expresión proteica siguiendo protocolos estándares de laboratorio. Esta cepa posee un genotipo *recA1* y *endA1*, lo que ocasiona una deficiencia en recombinación y en actividad endonucleolítica; además, contiene el episoma F', que le confiere resistencia a Tetraciclina y codifica para el gen mutado *lacI^q*, lo que permite una sobre-expresión del represor LacI impidiendo una inducción temprana, y potencialmente tóxica, de la proteína recombinante clonada.

4.3.2. Medios de cultivo

Los medios LB y 2X YT líquidos fueron preparados de acuerdo a las instrucciones estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 1989] (LB: triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%; 2X YT: triptona 1%, extracto de levadura 1%, NaCl 0.5%). El medio LB sólido fue preparado suplementándolo con agar (1.7%).

4.3.3. Preparación de *E. coli* competente

Las células competentes para choque térmico fueron preparadas utilizando un protocolo estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 1989]. Brevemente, 2 mL de medio LB líquido fueron inoculados con una colonia de células (alternativamente, se utilizaron 0.01 mL de una suspensión celular en glicerol al 15%) e incubados a 37 °C y 300 rpm durante la noche (12 a 14 h). Al día siguiente, 3 mL de medio LB líquido (fresco) fueron inoculados con 0.06 mL del cultivo joven y se incubaron a 37 °C y 300 rpm durante 2-3 h. Posteriormente, 1 mL del cultivo fue transferido a un microtubo de 1.5 mL. El paquete celular fue separado mediante centrifugación (5,000 rpm durante 5 min) y remoción del sobrenadante. La pastilla celular fue resuspendida en 0.5 mL de CaCl₂ 50 mM y mantenida en hielo durante 5 min. El paquete celular fue separado como antes y resuspendido en 0.1 mL de CaCl₂ 50 mM. Esta suspensión celular se mantiene en hielo durante 5 min antes de ser transformada o se criopreserva a -80 °C en una solución de glicerol al 15%.

4.4. Plásmidos y oligonucleótidos sintéticos

4.4.1. pCT38

El plásmido pCT38, reserva de plásmidos del Laboratorio de Biotecnología (FCQI-UABC), fue proporcionado por la Dra. Christine Tachibana de la Universidad de Washington. pCT38 (ver Figura 8) contiene el gen codificante para la enzima β -lactamasa, la cual le confiere resistencia a la célula contra antibióticos β -lactámicos (p.e. ampicilina) y los orígenes de replicación para bacteria y levadura, ColE1 y CEN/ARS, respectivamente. Además, contiene la unidad transcripcional del gen

ScPDI1, que codifica para la enzima proteína disulfuro isomerasa de *S. cerevisiae*. Esta unidad consta de 2,608 pb: 879 pb de la región promotora, 1569 pb de la región codificante y 160 pb de la región terminadora.

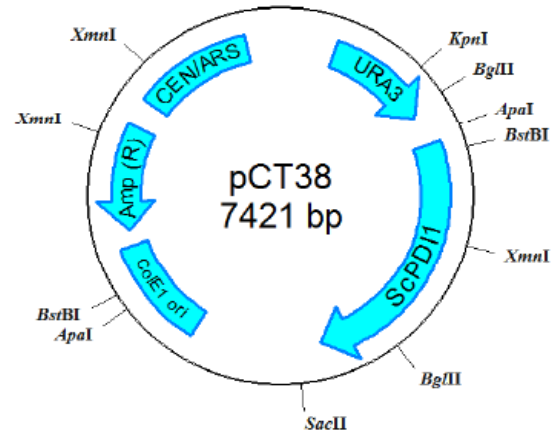


Figura 8. Representación circular del plásmido pCT38

4.4.2. pQE30

El plásmido pQE30 (Qiagen) fue utilizado para la expresión de proteínas. pQE30 (ver Figura 10) contiene el promotor del bacteriófago T₅, el cual es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli* fusionado al operador de lactosa (*lacO*) para controlar la transcripción; un sitio artificial de unión a ribosoma (RBS) para una traducción eficiente; un sitio de clonación múltiple (MCS) que cuenta con diversos sitios de reconocimiento para enzimas endonucleasas de uso frecuente en sistemas de clonación; una secuencia codificante para histidinas, corriente abajo al extremo 5', por ende, una etiqueta N-terminal. Esta etiqueta facilita el



Figura 9. Representación circular del plásmido pQE30.

proceso de purificación de proteínas. Además, pQE30 contiene el gen que codifica para la β -lactamasa.

4.4.3. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos iniciadores ScPDIR y ScPDIF (ver Tabla 2), reserva del Laboratorio de Biotecnología (FCQI-UABC), fueron diseñados usando la secuencia del gen PDI1/YCL043C (NCBI No. NM_001178688).

4.5. Equipo y software

Las muestras de ADN y proteínas fueron separadas en cámaras de electroforesis Mini-SubCell[®] GT y Mini-Protean[®] 3 (Biorad), respectivamente, utilizando las fuentes de poder recomendadas para cada aplicación (PowerPac Basic y PowerPac HC). Los geles de ADN teñidos con EtBr fueron visualizados utilizando el sistema fotodocumentador GelDoc[®] 2000 (Biorad). La amplificación de ADN fue realizada utilizando un termociclador PHC-3 (Techne). Los espectrofotómetros Smartspec[®] Plus (Biorad) y Microplate Reader 680 (Biorad)

Tabla 2. Oligonucleótidos sintéticos utilizados para amplificar el gen ScPDI1.

La secuencia de los adaptadores se muestra en *itálicas* y la secuencia gen-específica se muestra en mayúsculas.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Adaptador	T _m (°C)
ScPDIF	<i>acactcggatcc</i> CAACAAGAGGCTGTGGCC	<i>Bam</i> HI	58
ScPDIR	<i>acactcctgcag</i> TTACAATTCATCGTGAATGGC	<i>Pst</i> I	58

fueron utilizados en las mediciones UV-Vis. Las centrifugas MiniSpin[®] Plus (Eppendorf) y Allegra[®] X-22R (Beckman Coulter) fueron utilizadas para separar paquetes celulares y fracciones subcelulares. El programa QuantityOne[®] 1-D Analysis Software v4.0.3 (Biorad) fue utilizado para controlar el fotodocumentador. El programa Gene Construction Kit[®] v2.5 (Textco) fue utilizado para el diseño de plásmidos y el programa GraphPad[®] Prism™ v 4.03 (GraphPad Software, Inc.) fue utilizado para los análisis estadísticos.

4.6. Amplificación y purificación de ScPDI1

4.6.1. Amplificación de ScPDI1

La mezcla de reacción de PCR para amplificar el gen ScPDI1 se realizó en un microtubo (Tabla de la derecha). Las condiciones de termociclado 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, 1.5 min a 72 °C); y 1 ciclo de extensión final (7 min a 72 °C).

Componente	μL
H ₂ O destilada estéril	34.5
Amortiguador para PCR10X	5
dNTPs 2.5 mM	4
ScPDIF 10 μM	2
ScPDIR 10 μM	2
pCT38 [~2 ng/μL]	2
Taq ADN pol [5 U/μL]	0.5

4.6.2. Purificación del producto de PCR ScPDI1

El producto de la amplificación del gen ScPDI1 (PPCR ScPDI1) fue purificado utilizando el estuche comercial *QIAquick[®] PCR Purification Kit*, siguiendo las instrucciones recomendadas por proveedor: 5 vol del amortiguador PB fueron mezcladas con 1 vol del PPCR. La mezcla fue transferida a una columna *QIAquick[®]*

Spin Column y centrifugada durante 1 min a 13,000 rpm. La columna fue lavada con 750 μ L de amortiguador PE y centrifugada durante 1 min a 13,000 rpm. Para eliminar remanentes, la columna fue centrifugada una vez más. El PPCR ScPDI1 fue recuperado mediante elución con 50 μ L de amortiguador EB y centrifugación durante 1 min a 13,000 rpm.

4.7. Purificación de pQE30

A partir de la pastilla celular de un cultivo de 3 mL de *E. coli* XLI-Blue MRF' portadora del plásmido pQE30, se procedió a la purificación de ADN plasmídico utilizando el estuche comercial *QIAprep[®] Spin Miniprep Kit*, siguiendo las instrucciones recomendadas por el proveedor: el paquete celular fue resuspendido en 250 μ L de amortiguador P1; posteriormente, se añadieron 250 μ L de amortiguador P2 y se mezcló por inversión; inmediatamente, se añadieron 350 μ L de amortiguador N3 y se mezcló vigorosamente por inversión. La fracción proteica precipitada fue separada mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a una columna *QIAquick[®] Spin Column* y centrifugada durante 1 min a 13,000 rpm. Enseguida, la columna fue lavada con 500 μ L de amortiguador PB y centrifugada durante 1 min a 13,000 rpm. Un segundo lavado fue realizado con 750 μ L de amortiguador PE y centrifugado durante 1 min a 13,000 rpm. Los remanentes de los lavados fueron eliminados mediante una centrifugación adicional. El plásmido pQE30 fue recuperado mediante elución con 100 μ L de amortiguador EB y centrifugación durante 1 min a 13,000 rpm.

4.8. Construcción del plásmido pQYPDI

4.8.1. Digestión del producto de PCR ScPDI1

El PPCR ScPDI1 contiene en sus extremos los adaptadores para *Bam*HI y *Pst*I. Para clonar direccionalmente ScPDI1 en el plásmido pQE30, se realizó una mezcla de digestión como se muestra en la tabla de la derecha. La reacción se llevo a cabo durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, el producto de la digestión fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa, teñido con EtBr y visualizado mediante un transiluminador UV. La banda correspondiente al tamaño esperado fue cortada del gel y conservada para purificación.

Componente	µL
Producto de PCR ScPDI1	16
Amortiguador NEB 3 10x	2
<i>Bam</i> HI [10 U/µL]	1
<i>Pst</i> I [10 U/µL]	1

4.8.2. Digestión del plásmido pQE30

El plásmido pQE30 contiene las secuencias de reconocimiento para *Bam*HI y *Pst*I. Para clonar en fase (con el hexámero de histidinas) la secuencia codificante para ScPDI1, se realizó una mezcla de digestión (Tabla de la derecha). La reacción se llevo a cabo durante 1.5 h a 37 °C; enseguida se añadió a la mezcla 1 µL de bCIP [1 U/µL] y se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, el producto de la digestión fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa, teñido con EtBr y visualizado mediante un transiluminador UV. La banda

Componente	µL
pQE30	16
Amortiguador NEB 3 10X	2
<i>Bam</i> HI [10 U/µL]	1
<i>Pst</i> I [10 U/µL]	1

correspondiente al tamaño esperado fue cortada del gel y conservada para purificación.

4.8.3. Purificación de los productos de la digestión enzimática

Los productos de la digestión endonucleolítica PPCR *ScPD1/BamHI-PstI* y *pQE30/BamHI-PstI* fueron purificados utilizando el estuche comercial *QIAquick® Gel Extraction Kit*, siguiendo las instrucciones recomendadas por el proveedor: el fragmento de gel fue pesado y disuelto en 3 partes (peso/volumen) de amortiguador QG. La disolución fue facilitada mediante incubación a 55 °C durante 10 min. Posteriormente, se añadió 1 volumen de isopropanol (equivalente al peso del gel). La mezcla fue transferida a una columna *QIAquick® Spin Column* y centrifugada durante 1 min a 13,000 rpm. Enseguida, la columna fue lavada con 750 µL de amortiguador PE y centrifugada durante un 1 min a 13,000 rpm. Adicionalmente, los remanentes fueron eliminados mediante una centrifugación adicional. Los fragmentos de digestión fueron recuperados mediante elución con 30 µL de amortiguador EB y centrifugación durante 1 min a 13,000 rpm. Para verificar integridad y pureza, una muestra (3-5 µL) fue separada mediante electroforesis en gel de agarosa, teñida con EtBr y visualizada con un transiluminador UV.

4.8.4. Ligación de los fragmentos *ScPDI1* y *pQE30*

Los fragmentos PPCR *ScPDI1/BamHI-PstI* (inserto) y *pQE30/BamHI-PstI* (vector) purificados fueron utilizados para construir el plásmido de expresión *pQYPDI*. La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando la ADN ligasa del bacteriófago T₄, en presencia de ATP como cofactor. La mezcla de reacción se

preparó como se muestra en la Tabla de la derecha. La mezcla se incubó durante 4 h a temperatura ambiente.

Componente	μL
PPCR ScPDI1/ <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I	7
pQE30/ <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I	1
Amortiguador de ligasa 10X	1
T ₄ ADN ligasa [1 U/μL]	1

4.9. Selección de transformantes portadoras de pQYPDI

4.9.1. Transformación bacteriana

Una alícuota de células de *E. coli* XL1-Blue MRF' termocompetentes fue descongelada en hielo durante 15-20 min. Posteriormente, se añadieron 5 μL de la ligación y la mezcla se mantuvo en hielo por 30 min. Para el choque térmico, la mezcla células/plásmido se incubó durante 5 min a 42 °C seguida de 5 min en hielo. Inmediatamente, las células se recuperaron en 1 mL de medio 2X YT e incubadas a 37 °C durante 30 min. 2 fracciones de la suspensión celular recuperada (100 μL y el resto) fueron sembradas en placas de cultivo con medio LB suplementado con ampicilina [150 μg/mL]. Para la siembra del resto (aprox. 900 μL), la suspensión celular fue centrifugada durante 2 min a 10,000 rpm, el medio fue removido y la pastilla celular fue resuspendida en los remanentes de medio. Las cajas de cultivo sembradas se incubaron durante la noche a 37 °C.

4.9.2. Selección y análisis de transformantes estables

Las unidades formadoras de colonias (ufc) que presentaron resistencia a ampicilina (gracias a la enzima β-lactamasa expresada por el plásmido transfectado) fueron consideradas como transformantes estables. Para identificar el

plásmido recombinante pQYPDI, se realizó un análisis de restricción con endonucleasas. A partir de 7 ufc seleccionadas aleatoriamente, se prepararon pastillas celulares de 1.5 mL y el plásmido fue purificado (tal como se describió en la sección 4.7.). Posteriormente, se realizó una digestión con las endonucleasas *Bam*HI y *Pst*I; 5 µL de cada plásmido fueron mezclados con 5 µL de una mezcla de enzimas (Tabla de la derecha); la reacción se llevó a cabo durante 2 h a 37 °C y los fragmentos de digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa, teñido con EtBr y visualizado con un transiluminador UV. Los plásmidos que presentaron el patrón de restricción esperado fueron considerados como positivos.

Componente	µL
H ₂ O destilada estéril	21
Amortiguador NEB3 10X	7
<i>Bam</i> HI [20 U/µL]	3.5
<i>Pst</i> I [20 U/µL]	3.5

4.9.3. Caracterización molecular de pQYPDI

Para la caracterización molecular, primeramente se realizó un análisis *in silico* de los sitios de restricción y el patrón esperado utilizando el programa *NEBCutter*[®] (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) en el servidor de la compañía *New England Biolabs*. Con base a la información obtenida, el plásmido pQYPDI fue digerido con las endonucleasas *Hind*III (amortiguador NEB2), *Eco*RV (amortiguador NEB3) y *Hpa*II (amortiguador NEB1), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las reacciones de digestión fueron preparadas mezclando 5 µL de plásmido con 5 µL de una mezcla de enzimas (Tabla de la derecha). La reacción se llevó a cabo

Componente	µL
H ₂ O destilada estéril	14
Amortiguador NEB 10X	4
Endonucleasa [20 U/µL]	3.5

durante 1 h a 37 °C, los fragmentos de digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa, teñidos con EtBr y visualizados con un transiluminador UV.

4.10. Análisis de expresión de la proteína recombinante ScPDI1

4.10.1. Cultivos analíticos

Para el análisis cualitativo de la expresión de la ScPDI1 recombinante, se prepararon cultivos bacterianos jóvenes de *E. coli* XL1-Blue MRF' portadora de pQYPDI mediante la adición de 2 mL de medio fresco (LB líquido suplementado con ampicilina [150 µg/mL]) a los remanentes de un tubo de cultivo previamente utilizado, el cual se incubó durante la noche a 37 °C y 300 rpm. Al día siguiente, 4 mL de medio fresco (LB líquido suplementado con ampicilina [150 µg/mL]) fueron inoculados con 80 µL del cultivo joven (dilución 1:50). Posteriormente, se incubó durante 2 h a 37 °C y 300 rpm.

Para inducir la expresión, el cultivo pre-inducido fue dividido en 2 fracciones de 2 mL: (i) con inductor (CI), fracción suplementada con 2 µL de IPTG 1 M (concentración final 1 mM) y (ii) sin inductor (SI), no suplementada. Enseguida, ambos cultivos fueron incubados durante 4 h a 37 °C y 300 rpm. Finalmente, la pastilla celular de 1 mL de cada cultivo fue obtenida mediante centrifugación (2 min a 14,000 rpm) y conservada congelada hasta su análisis.

4.10.2. Obtención de mini-lisados bacterianos totales

La pastilla celular proveniente de cultivos CI y SI fue resuspendida en 100 μ L de amortiguador de carga 2X para SDS-PAGE y 100 μ L de agua destilada estéril. Para desnaturalizar y reducir las proteínas, la muestra fue calentada durante 10 min a 95 °C.

4.10.3. Análisis de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), siguiendo un protocolo estándar de laboratorio [Laemmli, 1970]. 10 μ L de muestra fueron cargados y separados en un gel SDS-PAGE al 12%. Durante el paso de las proteínas por las dos fases del gel, la migración electroforética se realizó a 80 V (gel concentrador) y 120 V (gel separador). La electroforesis se detuvo a las 2 h o hasta que el colorante salió del gel. Las proteínas fueron teñidas durante 3 h con solución de tinción (con azul de Coomassie) y, posteriormente, desteñidas durante 24 h con solución de distinción.

4.11. Expresión y purificación de la proteína recombinante ScPDI1

4.11.1. Cultivos preparativos

Para la purificación de la ScPDI1 recombinante, se prepararon pastillas bacterianas de *E. coli* XL1-Blue MRF' portadora de pQYPDI a partir de cultivos de 100 mL. 2 mL de medio fresco (LB líquido suplementado con ampicilina [150 μ g/mL]) fueron inoculados con 10 μ L de la bacteria productora e incubados

durante la noche a 37 °C y 300 rpm. Al día siguiente, 100 mL de medio fresco (LB líquido suplementado con ampicilina [150 µg/mL]) fueron inoculados con los 2 mL del cultivo joven (dilución 1:50) e incubados durante 2 h a 37 °C y 300 rpm. La expresión proteica fue inducida mediante la adición de 10 µL de IPTG 1 M (concentración final 0.1 mM) e incubación durante 4 h a 37 °C y 300 rpm. La pastilla celular fue separada mediante centrifugación (15 min, 4,000 rpm y 4° C) y conservada en congelación.

4.11.2. Obtención de lisados bacterianos en condiciones nativas

El lisado bacteriano fue obtenido utilizando el estuche comercial *CellLytic® B Plus Kit*. La pastilla bacteriana fue descongelada a temperatura ambiente, resuspendida en 5 mL de solución *CellLytic B®* y suplementada con 100 µL de lisozima [10 mg/mL], 2 µL de benzonasa [250 U/µL] y 50 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas. Después de 30-60 min de agitación suave, la fracción soluble fue separada mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 15 min.

4.11.3. Purificación mediante cromatografía de afinidad

La presencia del hexámero de histidinas en el extremo amino-terminal de la proteína recombinante ScPDI1 facilitó la purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel. Esta se llevó a cabo siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor [*The QiaExpressionist™ Manual*]. A una columna de cromatografía con 1 mL de resina de agarosa-NTA-Ni fue lavada con 5 mL de solución de lavado. Enseguida, la columna fue cargada con el lisado bacteriano y, posteriormente,

lavada con 10 mL de solución de lavado. Finalmente, la proteína fue recuperada con 5 mL de solución de elución y recolectada en fracciones de 0.5 mL.

Para el seguimiento de la cromatografía, se colectaron muestras del lisado bacteriano total (LBT), de la fracción no pegada (FNP), del lavado (W), y de las 6 primeras eluciones (E1-E6). Las muestras fueron mezcladas con un volumen de amortiguador de carga 2X para SDS-PAGE, desnaturalizadas durante 10 min a 95 °C y analizadas mediante gel de poliacrilamida tal como en la sección 4.10.3.

4.11.4. Purificación mediante cromatografía de exclusión molecular

Una vez colectadas las fracciones donde se encontraba mayor concentración de la proteína ScPDI1, se procedió a la purificación mediante cromatografía por exclusión molecular. Se montó un sistema de cromatografía utilizando una columna PD-10 (*Sephadex*[®] G-25). La columna fue lavada con 25 mL de una solución de Tris-HCl 20 mM pH 8.0. Posteriormente, la muestra fue cargada en la columna y el efluente fue descartado. Enseguida, la fracción proteica fue eluida con 3.5 mL de solución de Tris-HCl 20 mM pH 8.0 y el efluente fue recolectado en un tubo cónico estéril de 15 mL.

4.11.5. Cuantificación mediante espectrofotometría UV

La concentración de la proteína recombinante ScPDI1 fue determinada mediante espectrofotometría a 280 nm. Utilizando el programa *ProtParam Tool* del servidor *ExpASY Proteomics Server* (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) se determinaron los valores de extinción molar, considerando que las cisteínas se encuentren formando cistinas (280 nm, $\epsilon = 49,655 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $A^{0.1\%} = 0.866$). A partir

de una dilución de la proteína, se determinó la A_{280} y, aplicando la fórmula de la Ley de Lambert-Beer, se obtuvieron las concentraciones μM y mg/mL .

4.12. Análisis de la actividad oxidasa de ScPDI1 recombinante

4.12.1. Ensayo de actividad oxidasa usando RNAsa como sustrato

La actividad oxidasa de ScPDI1 fue evaluada mediante un ensayo de renaturalización de RNAsa desnaturalizada y reducida químicamente (*drRNAsa*), siguiendo un protocolo estándar previamente reportado [Lyles y Gilbert, 1990]. Durante el ensayo, la actividad de la RNAsa activa, en presencia de la actividad oxidasa de la enzima recombinante ScPDI1, se valora mediante su capacidad para hidrolizar cCMP y producir CMP, el cual exhibe un máximo de absorción a 296 nm.

La Tabla muestra las diferentes mezclas de reacción preparadas para el ensayo (volúmenes en μL). El cCMP se encuentra en solución de MOPS 0.1 M; la mezcla Redox 20X está compuesta por GSH 40 mM y GSSG 8 mM. RQ corresponde a la oxidación química (plegamiento no asistido enzimáticamente). A excepción de la mezcla blanco (BCO), cada mezcla de reacción (R) contenía

Componente	BCO	RQ	R1	R2	R3	R4	R5	[FINAL]
Tris-HCl 1 M pH=8	20	20	20	20	20	20	20	100 mM
cCMP 45 mM	-	20	20	20	20	20	20	4.5 mM
H ₂ O destilada estéril	175	145	125	135	140	142	144	cbp
Redox 20X	5	5	5	5	5	5	5	1X
ScPDI1 20.54 μM	-	-	20	10	5	3	1	-
<i>drRNAsa</i> 163.4 μM	-	10	10	10	10	10	10	8.2 μM
ScPDI1 (μM)	-	0	2	1	0.5	0.3	0.1	

Tris-HCl 100 mM pH 8.0, cCMP 4.5 mM, GSH 2 mM, GSSG 0.4 mM y *drRNAsa* 8.2 μ M. La reacción se llevaba a cabo en celdas de cuarzo. La cinética de replegamiento oxidativo de la RNAsa fue monitoreada registrando la A_{296} durante 30 min, en intervalos de 0.5 min. Cada ensayo de replegamiento oxidativo se realizó por duplicado. Como control interno, se realizó un ensayo con la enzima proteína disulfuro isómerasa de *Entamoeba histolytica* (*EhPDI*) a una concentración de 2 μ M.

Además, se cálculo la cantidad de RNAsa activa (μ M) utilizando la siguiente fórmula [Lyles y Gilbert, 1990]: $E_t = V_t / \{ K_{cat} [cCMP]_t / ([cCMP]_t + K_m (1 + [CMP]_t / K_i)) \}$; donde, $K_m = 8$ mM, $K_i = 2.1$ mM, y $K_{cat} = 14.3$ min⁻¹. Para determinar la cantidad de enzima ScPDI1 que logra un 50% de replegamiento oxidativo (EC_{50}) en las condiciones estándar de reacción (ensayo 4.12.1); primeramente se determinó la velocidad inicial (en el estado estacionario) de cada ensayo (V_o) y, posteriormente, se realizó una gráfica de V_o contra [ScPDI1], la cual fue ajustada a un curva de regresión no lineal de pendiente variable, utilizando el programa *GraphPad® Prism™ v.4* para Windows®.

Componente	BCO	R0	R1	R2	R3	R4	[FINAL]
Tris-HCl 1 M pH 8.0	20	20	20	20	20	20	100 mM
cCMP 45 mM	-	20	20	20	20	20	4.5 mM
H ₂ O destilada estéril	175	152	125	135	140	142	cbp
Redox 20X	5	5	5	5	5	5	1X
ScPDI1 20.54 μ M	-	3	3	3	3	3	0.3 μ M
<i>drRNAsa</i> 163.4 μ M	-	-	5	15	20	25	
<i>drRNAsa</i> [μ M]		0	4.1	12.3	16.4	20.5	

4.12.2. Actividad oxidasa a diferentes concentraciones de sustrato

Para determinar los parámetros enzimáticos, se valoró la actividad oxidasa de ScPDI1 a diferentes concentraciones de sustrato. La Tabla muestra las diferentes mezclas de reacción preparadas para el ensayo (volúmenes en μL). A excepción de la mezcla blanco (BCO), cada mezcla de reacción (R) contenía Tris-HCl 100 mM pH 8.0, cCMP 4.5 mM, GSH 2 mM, GSSG 0.4 mM y ScPDI1 0.3 μM . Las reacciones se realizaron tal como en la sección 4.12.1.

Los parámetros enzimáticos de K_m y V_{\max} fueron determinados considerando una cinética Michaelis-Menden clásica. Primeramente, se determinó la velocidad inicial (en el estado estacionario) de cada ensayo (V_o) y, posteriormente, se realizó una gráfica de V_o contra $[\text{drRNAse}]$, la cual fue ajustada a un curva de regresión lineal (doble recíproco, ecuación de Lineweaver-Burk), utilizando el programa *GraphPad® Prism™ v.4* para Windows®. La constante K_{cat} aparente fue obtenida a partir de la fórmula $K_{\text{cat}} = V_{\max} / [\text{ScPDI1}]$, donde la V_{\max} corresponde al valor obtenido y la concentración de ScPDI1 fue una constante (0.3 μM) en la reacción.

4.12.3. Ensayos de inhibición de la actividad oxidasa

El efecto de algunos compuestos sobre la actividad oxidasa de ScPDI1 fue evaluado mediante ensayos de inhibición. Varios compuestos fueron ensayados: bacitracina, vancomicina, DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico]), DTDP (4,4'-ditiopiridina) y 2,4-diclorofenol; sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, sólo fue posible observar inhibición con bacitracina. Para las reacciones de inhibición enzimática se prepararon mezclas con diferentes concentraciones del inhibidor. La reacción se llevó a cabo durante 30 min a

Componente	BCO	RQ	R1	R2	R3	R4	R5	[FINAL]
Tris-HCl 1 M pH 8.0	20	20	20	20	20	20	20	100 mM
cCMP 45 mM	-	20	20	20	20	20	20	4.5 mM
H ₂ O destilada estéril	175	139.8	125	135	140	142	144	cbp
Redox 20X	5	5	5	5	5	5	5	1X
ScPDI 20.54 μM	-	3	3	3	3	3	3	0.3 μM
drRNAsa 163.4 μM	-	12.2	12.2	12.2	12.2	12.2	12.2	8.2 μM
Bacitracina (μM)		0	3.4	6.7	10.4	20.5	33.7	

temperatura ambiente. La actividad oxidasa remanente fue valorada tal como en la sección 4.12.1. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los componentes de cada mezcla de reacción se muestran en la siguiente Tabla (volúmenes en μL).

Los parámetros de inhibición IC₅₀ y K_i fueron determinados mediante una cinética de inhibición dosis-respuesta de pendiente variable. Primeramente, se determinó la velocidad inicial (en el estado estacionario) de cada ensayo (V_o) y, posteriormente, se realizó una gráfica de V_o contra log [inhibidor], la cual fue ajustada por mínimos cuadrados, utilizando el programa *GraphPad® Prism™ v.4* para Windows®.

4.13. Análisis de la actividad isomerasa de ScPDI1 recombinante

La actividad oxidorreductasa (isomerasa) de la enzima ScPDI1 fue evaluada mediante un ensayo de replegamiento y renaturalización de lisozima reoxidada aleatoriamente (*scrambled*, scLZM), utilizando un procedimiento estándar reportado en la literatura [Katiyar, *et al.*, 2001].

4.13.1. Ensayo de actividad lítica de lisozima

Primeramente, se evaluó la ausencia de actividad lítica de la scLZM, usando las membranas de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato. La siguiente Tabla muestra las mezclas de reacción (volúmenes en μL , preparadas en un microplaca). Inmediatamente después de preparar las mezclas, la microplaca se colocó en un lector espectrofotométrico y se registró la A_{450} cada 3 min, durante 15 min.

POCILLO	<i>M. lysodeikticus</i> 0.15 mg/mL	KH_2PO_4 0.1 M (pH 6.2)	nLZM 5 μM	scLZM 5 μM	LZM [μM]
A	200	-	-	-	B
B	200	20	-	-	0
C	200	12	8	-	2
D	200	12	-	8	2

4.13.2. Actividad isomerasa a diferentes concentraciones de enzima

La actividad isomerasa fue evaluada utilizando scLZM 30 μM y varias concentraciones de ScPDI1 (0.5, 1, 1.1, 1.7, 2, 2.3, 2.9, 3, 3.5, 4, 5, 5.8, 8.7, 11.3, y 11.6 μM). Inicialmente, se preparó la solución amortiguadora de replegamiento 5X RB (HEPES 500 mM pH 7.0; NaCl 100 mM; EDTA 10 mM; MgCl_2 25 mM) y la solución redox (8 μL de GSSG 50 mM y 20 μL de GSH 100 mM). Como se muestra en la Tabla, las diferentes mezclas se prepararon en una microplaca (volúmenes en μL).

Las mezclas se incubaron

Pocillo	5X RB	scLZM 221.9 μM	ScPDI1	H_2O
Blanco	40	27	-	127.4
Muestra	40	27	X	cbp 194.4

durante 5 min a 37 °C y, posteriormente, a cada pocillo se le añadieron 5.6 µL de la solución redox y se mezcló perfectamente. Inmediatamente, se colectó una muestra de 10 µL de cada pocillo y se acidificó con 10 µL de ácido acético 0.1 M pH 4 en otra microplaca. La primer microplaca fue incubada durante 1.5 h a 37 °C. La cinética de replegamiento y renaturalización fue monitoreada, tomando muestras de 10 µL cada 30 min. Posteriormente, las muestras fueron ensayadas para valorar la actividad lítica recuperada, tal como se en la sección 4.13.1.

4.13.3. Actividad isomerasa a diferentes concentraciones de sustrato

La actividad isomerasa fue evaluada utilizando ScPDI1 1 µM y varias concentraciones de scLZM (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, y 2.0 µM). Los ensayos se realizaron tal como se describe en la sección 4.13.2.

4.13.4. Efecto de urea sobre la actividad isomerasa

Debido a la interferencia de las actividades chaperona y anti-chaperona de ScPDI1 sobre su actividad isomerasa, se evaluó el efecto de la presencia de urea (1 M) en una reacción de actividad isomerasa con scLZM 6 µM y ScPDI1 2 µM. El ensayo fue realizado tal como en la sección 4.13.2.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. El gen *pd1* de levadura, codificante para ScPDI1

El gen de levadura codificante para ScPDI1 (NCBI No. NM_001178688) fue utilizado como molde para el diseño de oligonucleótidos sintéticos (Figura 10).

```

acactcggatccCAACAAGAGGCTGTGGCC
BamHI =====
ATGAAGTTTTCTGCTGGTGCCTCCTGTCATGGTCCCTCCTGCTGCTCGCTCCTCTGTTTTGCGCCCAACAAGAGGCTGTGGCCCTGAAGACTCCCGTGTCTTAAGTTGGCCACCGAC 120
M K F S A G A V L S W S S L L L A S S V F A Q Q E A V A P E D S A V V K L A T D
TCCTTCAATGAGTACATTCACTCGCACGACTTGGTCTTGGGAGTTTTTGTCCATGGTGTGGCCACTGTAAGAACATGGCTCCTGAATACGTTAAAGCCCGGAGACTTTAGTTGAG 240
S F N E Y I Q S H D L V L A E F F A P W C G H C K N M A P E Y V K A A E T L V E
AAAAACATTACCTTGGCCAGATCGACTGTACTGAAACCAGGATCTGTGTATGGAACACAACATTCAGGGTTCCTCAAGCTTGAAGATTTCAAAAACAGCGATGTTAACAACCTGATC 360
K N I T L A Q I D C T E N Q D L C M E H N I P G F P S L K I F K N S D V N N S I
GATTACGAGGACCTAGAACTGCCGAGGCCATTGCCAATTCATGATCAAGCAAAGCCAAACCGGCTGTGCGCGTTGTTGCTGATCTACCAGCTTACCTTGCTAACGAGACTTTTGTCACT 480
D Y E G P R T A E A I V Q F M I K Q S Q P A V A V V A D L P A Y L A N E T F V T
CCAGTTATCGTCCAATCCGGTAAGATTGACGCCGACTTCAACGCCACCTTTACTCCATGGCCAAACAACACTTCAACGACTACGACTTTGCTCCGCTGAAAACGACGACGATGATTC 600
P V I V Q S G K I D A D F N A T F Y S M A N K H F N D Y D F V S A E N A D D D F
AAGCTTCTATTACTTGGCCTCCGCCATGGACGAGCCTGTAGTATACAACGGTAAGAAGCCGATATCGCTGACGCTGATGTTTTGAAAAATGGTTGCAAGTGAAGCCCTGCCCTAC 720
K L S I Y L P S A M D E P V V Y N G K K A D I A D A D V F E K W L Q V E A L P Y
TTTGGTGAATCGACGGTTCGTTTTGCGCCAACTCGTCAAGCGGTTGCTTTGGTTACTTATTCACAATGACGAGGAAGAATTGGAAGAATACAAGCCTCTCTTTACCGAGTTG 840
F G E I D G S V F A Q Y V E S G L P L G Y L F Y N D E E E L E E Y K P L F T E L
GCCAAAAGAACAGAGGCTCAATGAACCTTGTAGCATCGATGCCGAAAATTCGGCAGACACCGCCGCACTTGAACATGAAGGAACAATTCCTCTATTTGCCATCCACGACATGACT 960
A K K N R G L M N F V S I D A R K F G R H A G N L N M K E Q F P L F A I H D M T
GAAGACTTGAAGTACGGTTTGCCTCAACTCTCTGAAGAGCGGTTTGAAGAACTTGAAGCTATTGAATCTTTGGTTAAGGACTTCTTGAAGGTTGAT 1080
E D L K Y G L P Q L S E E A F D E L S D K I V L E S K A I E S L V K D F L K G D
GCCTCCCAATCGTGAAGTCCCAAGAGATCTTCGAGAACCAAGATTCTCTGTCTTCCAATTGGTCGGTAAAGACCATGACGAAATCGTCAACGCCAAAGAGGAGCTTTCTTTGTTT 1200
A S P I V K S Q E I F E N Q D S S V F Q L V G K N H D E I V N D P K K D V L V L
TACTATGCCCCATGGTGGTCACTGTAAGAGATTGGCCCCAATTACCAAGAAGTACTGATACCTACGCCAACGCCACATCCGACGTTTTGATTGCTAAAGTACGACCACTGAAAAC 1320
Y Y A P W C G H C K R L A P T Y Q E L A D T Y A N A T S D V L I A K L D H T E N
GATGTCAGAGGCGCTGAATGAAGGTTACCCAACAATCGTCTTATACCCAGGTGTAAGAAGTCCGAATCTGTTGTACCAAGGTTCAAGATCCTTGGACTCTTTATTCGACTTCATC 1440
D V R G V V I E G Y P T I V L Y P G G K K S E S V V Y Q G S R S L D S L F D F I
CGGTAAGTGCTA
=====
AAGGAAAACGGTCACTTCGACGTCGACGGTAAGGCCTTGTACGAAGAAGCCAGGAAAAGCTGCTGAGGAAGCCGATGCTGACGCTGAATGGCTGACGAAGAAGATGCCATTACGAT 1560
K E N G H F D V D G K A L Y E E A Q E K A A E E A D A D A E L A D E E D A I H D
CTTAACATTgagctctcaca
===== PstI
CAATTGTAA 1569
E L *

```

Figura 10. Secuencia nucleotídica y polipeptídica de la enzima PDI1 de *S. cerevisiae*.

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

5.2. Clonación de la secuencia nucleotídica codificante para ScPDI1

La secuencia nucleotídica codificante para el péptido maduro de la enzima proteína disulfuro isomerasa de *S. cerevisiae* (ScPDI1) fue amplificada mediante PCR a partir del plásmido pCT38 (Tachibana y Stevens, 1992). Como se indica en la Figura 11, un fragmento del tamaño esperado (1,569 pb) fue amplificado y purificado posteriormente. El producto de PCR ScPDI1 fue digerido con las endonucleasas *Bam*HI y *Pst*I, ligado y clonado en los mismos sitios del plásmido de expresión bacteriana pQE30, usando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4.

El producto de la ligación fue utilizado para transformación bacteriana (*E. coli* XL1-Blue MRF'). A partir de una décima parte de la transformación, se obtuvieron 73 ufc/transformantes estables. De éstas, se seleccionaron aleatoriamente 7 colonias y se purificó el plásmido, Como análisis inicial, se realizó un ensayo de liberación endonucleolítica del inserto (ScPDI1), usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I. Como se observa en la Figura 12, todas las ufc analizadas poseen el patrón de restricción esperado; es decir, liberan el inserto (ScPDI1), por lo tanto, fueron consideradas como clonas positivas (portadoras del plásmido recombinante pQYPDI).

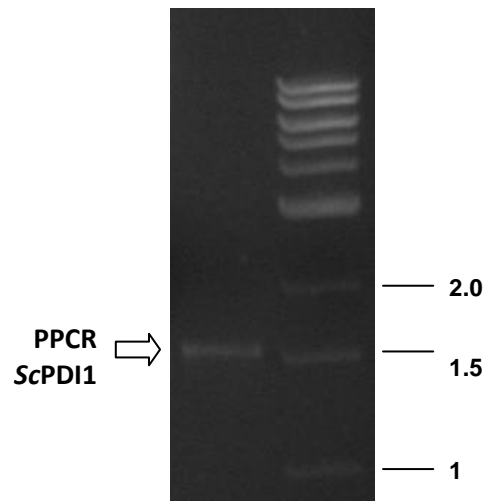


Figura 11. Separación electroforética del producto de PCR ScPDI1.

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

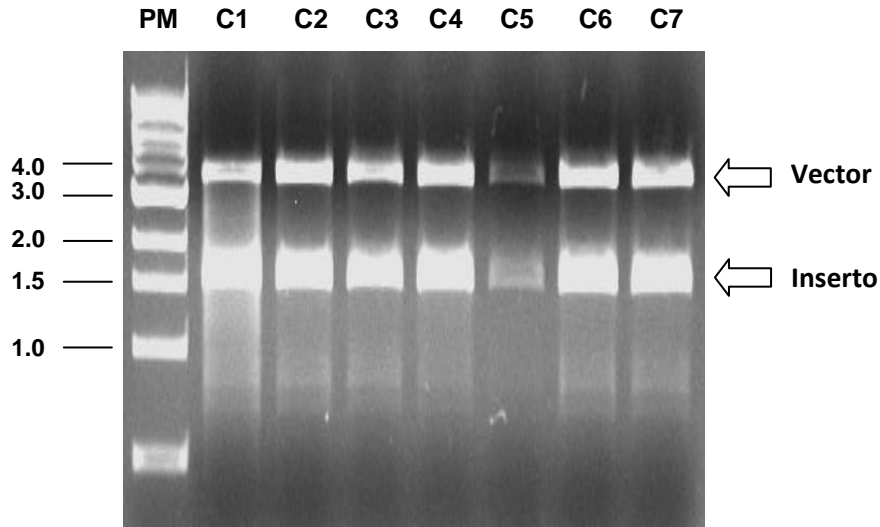


Figura 12. Separación electroforética de los productos de digestión para la liberación del inserto (ScPDI1) de 7 clonas estables (C1-C7).

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

5.3. Caracterización molecular de pQYPDI

La caracterización del plásmido pQYPDI de 4 clonas positivas (C1-C4) se realizó con las endonucleasas *EcoRV* (1), *HindIII* (2), y *HpaII* (3). Mediante un análisis *in silico*, se determinaron los fragmentos de digestión esperados (*EcoRV*: 4936 pb; *HindIII*: 3676, 937, 283 pb; *HpaII*: 963, 764, 538, 527, 408, 404, 242, 236, 190, 147, 128, 110, 76, 67, 42, 34, 34, 26 pb). Como se infiere de la Figura 13, las 4 clonas exhiben un patrón de restricción similar y concordante con el esperado.

5.4. pQYPDI, el plásmido de expresión de ScPDI1

Mediante el uso de herramientas de bioinformática, se realizó un análisis *in silico* del plásmido pQYPDI (ver Figura 14). La secuencia del gen *pdi1* de *S. cerevisiae* se encuentra fusionada (en fase) a la secuencia codificante para el

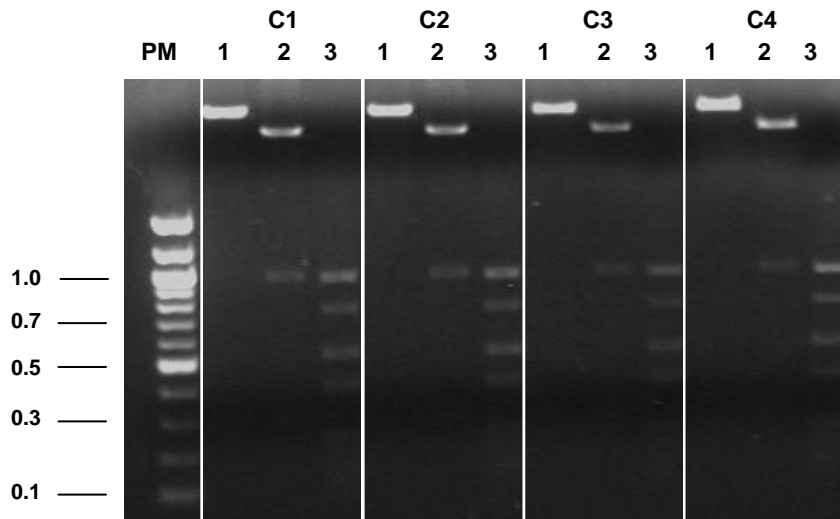


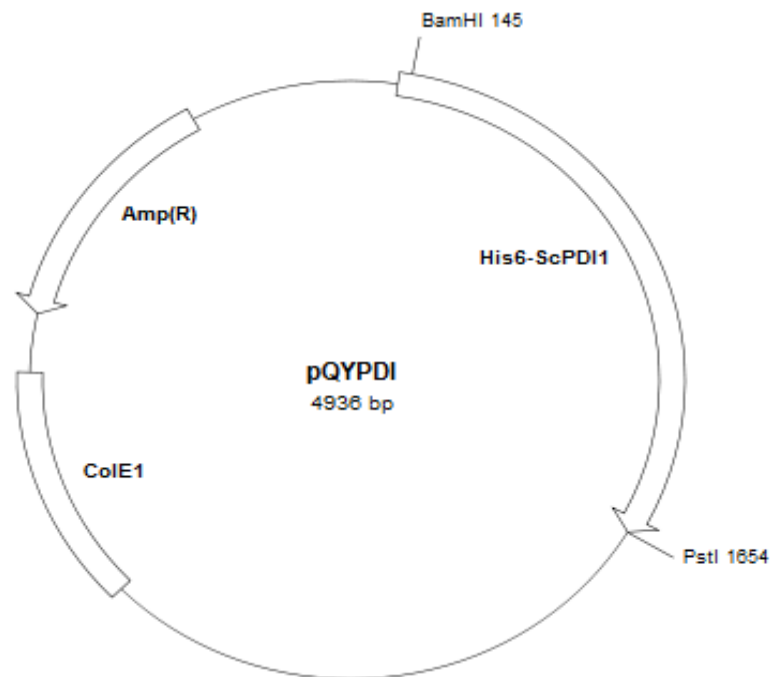
Figura 13. Separación electroforética de los productos de digestión para la caracterización del inserto (ScPDI1) de 4 clonas estables (C1-C4).

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

hexámero de histidinas. El control de la expresión está regulado por la fusión $T_5/lacO$. Teóricamente, ScPDI1 recombinante deberá presentar un peso molecular aproximado de 57 KDa.

5.5. Expresión y purificación de la proteína recombinante ScPDI1

Inicialmente, los estudios de expresión analítica (pequeña escala) fueron realizados utilizando 4 clonas (C1-C4). La expresión de ScPDI1 recombinante fue inducida por IPTG (Figura 15). Los resultados muestran una banda de 57 KDa (tamaño esperado para la ScPDI1 recombinante) en los carriles correspondientes a los cultivos inducidos, la cual no se observó en ausencia del inductor.



```

MRGSHHHHHH GSQQEAVAPE DSAVVKLATD SFNEYIQSHD LVLAEFFAPW CGHCKNMAPE 60
YVKAETLVE KNITLAQIDC TENQDLCMEH NIPGFPSLKI FKNSDVNNSI DYEGPRTAEA 120
IVQFMIKQSQ PAVAVVADLP AYLANETFVT PVIVQSGKID ADFNATFYSM ANKHFNDYDF 180
VSAENADDDF KLSIYLPSAM DEPVVYNGKK ADIADADVFE KWLQVEALPY FGEIDGSVFA 240
QYVESGLPLG YLFYNDEEEL EYKPLFTEL AKKNRGLMNF VSIDARKFGR HAGNLNMKEQ 300
FPLFAIHDMT EDLKYGLPQL SEEAFDELS D KIVLESKAIE SLVKDFLKG D ASPIVKSQEI 360
FENQDSSVFQ LVGKNHDEIV NDPKKDVLVL YYAPWCGHCK RLAPTYQELA DTYANATSDV 420
LIAKLDHTEN DVRGVVIEGY PTIVLYPGGK KSESVVYQGS RSLDSLFDI KENGHFDVDG 480
KALYEEAQEK AAEEDADAE LADEEDAHD EL 512

```

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

Figura 14. Representación circular del plásmido pQYPDI, secuencia polipeptídica de la proteína recombinante ScPDI1 y algunas de sus propiedades fisicoquímicas relevantes.

Posteriormente, ScPDI1 recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad níquel a partir de lisados bacterianos totales de una pastilla celular obtenida a partir de 500 mL de cultivo inducido con IPTG 0.1 mM. Una alícuota de cada fracción cromatográfica fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

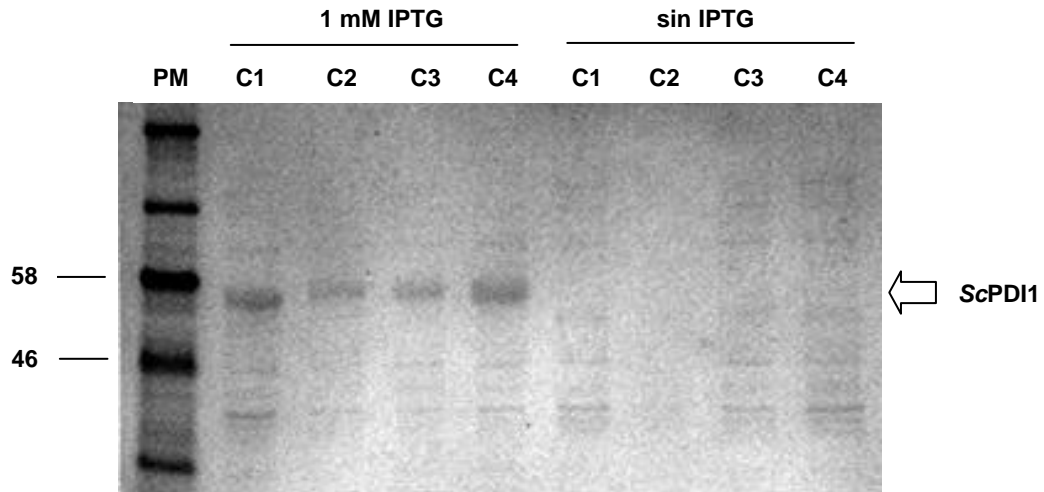


Figura 16. Separación electroforética de proteínas de los lisados bacterianos totales de 4 clones (C1-C4) que expresan la proteína recombinante ScPD11.

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

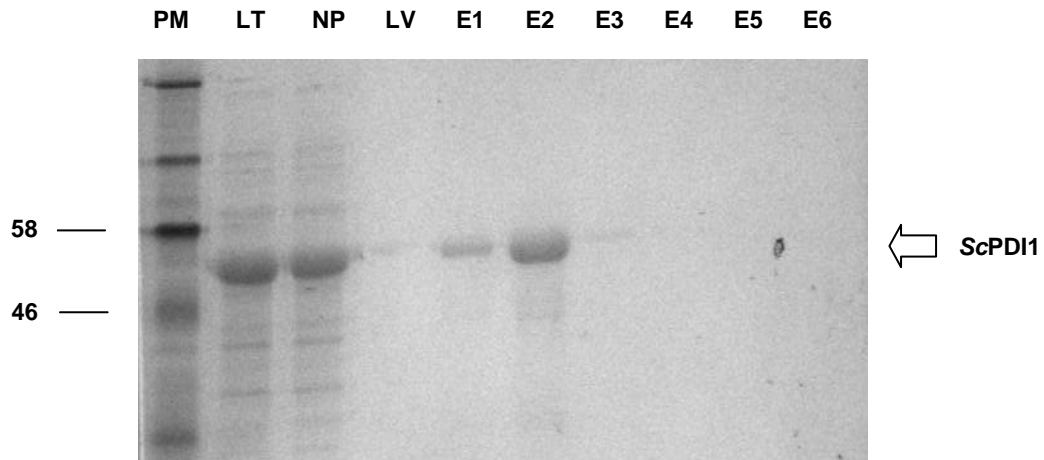


Figura 16. Separación electroforética y análisis de las fracciones colectadas durante la purificación de ScPD11 recombinante mediante cromatografía de afinidad a níquel.

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

Como se nota en la Figura 16, en la primeras 2 eluciones (E1 y E2) se recupera más del 90% de la ScPD11 recombinante; sin embargo, también se observa ésta en la fracción no pegada (NP). Por tal motivo, y para aumentar la

eficiencia de la recuperación, se realizaron dos corridas cromatográficas por cada lisado total bacteriano.

Finalmente, a partir de 5 mL de una solución que contiene la proteína ScPDI1 purificada, dos lotes (2.5 mL cada uno) fueron purificados mediante cromatografía de exclusión molecular. La proteína ScPDI1 recombinante fue recuperada y cuantificada, obteniéndose preparaciones con concentraciones de 20.54 y 18.52 μM , respectivamente.

5.6. ScPDI1 como enzima con actividad oxidasa

Como análisis inicial, se realizó un estudio comparativo de las actividades oxidasa de las enzimas ScPDI1 y EhPDI, usando a RNAsa A desnaturalizada y reducida (*drRNAsa*) como sustrato en un ensayo de replegamiento oxidativo estándar (Lyles y Gilbert, 1991). La Tabla 3 (ver Anexo) y la Figura 17 muestran los resultados obtenidos del ensayo, incluyendo el valor calculado de RNAsa activa recuperada.

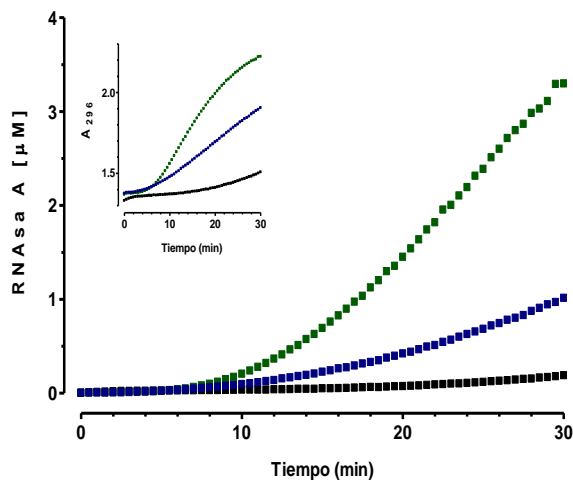


Figura 17. Representación gráfica del análisis comparativo de la actividad oxidasa de ScPDI1 y EhPDI.

Se muestra la cinética de replegamiento oxidativo de *drRNAsa* (8.2 μM) en ausencia de enzima (negro) y asistido por ScPDI1 (verde) o EhPDI (azul). Los resultados obtenidos experimentalmente se muestran en el panel superior, en tanto que los resultados calculados de RNAsa activa recuperada se muestran en el panel principal.

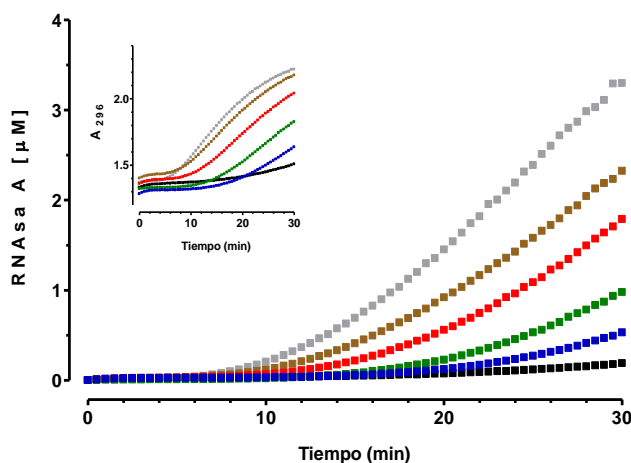


Figura 18. Representación gráfica del análisis del efecto de la concentración de ScPDI1 sobre la actividad oxidasa.

Se muestra la cinética de replegamiento oxidativo de *drRNAsa* (8.2 µM) asistido por diferentes concentraciones (µM) de ScPDI1: 0 (negro); 0.1 (azul); 0.3 (verde); 0.5 (rojo); 1.0 (café); 2.0 (gris). Los resultados obtenidos experimentalmente se muestran en el panel superior, en tanto que los resultados calculados de RNAsa activa recuperada se muestran en el panel principal.

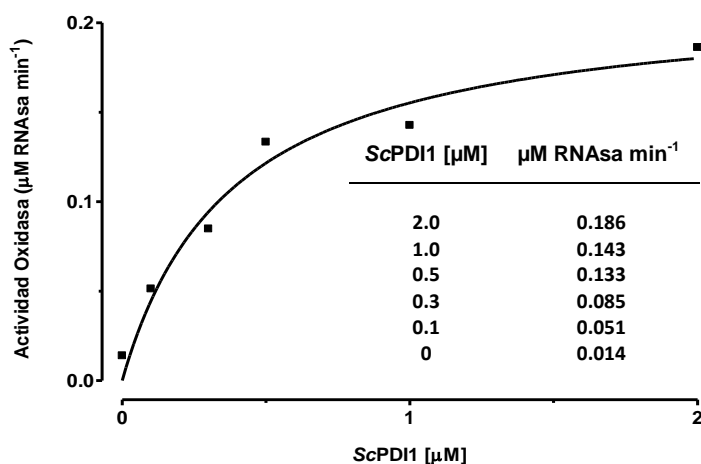


Figura 19. Representación gráfica del análisis dosis-dependiente de la actividad oxidasa en relación a la concentración de ScPDI1.

Se muestra el comportamiento dosis-dependiente del replegamiento oxidativo de *drRNAsa* (8.2 µM) asistido por diferentes concentraciones (µM) de ScPDI1. En el panel interno se encuentra la tabla que contiene los valores obtenidos de actividad enzimática en relación a la concentración de enzima.

Como se puede observar, ambas enzimas (ScPDI1 y *EhPDI*) exhiben actividad oxidasa. Además, a partir de la velocidad inicial (en el estado estacionario) fue posible determinar que ScPDI1 es aprox. 3.4 veces más eficiente que *EhPDI*. Aun más, en las condiciones ensayadas, ScPDI1 mostró una actividad específica de 0.09145 ± 0.007 µmol de RNAsa activa por min por µmol de ScPDI1. Considerando lo anterior, se procedió a analizar el efecto de la concentración de enzima ScPDI1 sobre la actividad oxidasa. El ensayo de replegamiento oxidativo de *drRNAsa* fue realizado a diferentes concentraciones de ScPDI1 (0 – 2 µM).

En la Tabla 4 (ver Anexo) y la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos del análisis, incluyendo el valor calculado de RNAsa activa recuperada. Como se puede observar, y era esperado, la actividad oxidasa es dependiente de la concentración de ScPDI1; esto es, a mayor concentración de enzima mayor actividad enzimática. Igualmente, a partir de la velocidad inicial fue posible determinar la concentración efectiva media (EC_{50}) de ScPDI1. Como se observa en la Figura 19, el análisis del efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática describe un patrón dosis-dependiente, con un perfil hiperbólico típico. Así, en las condiciones ensayadas, ScPDI1 mostró una EC_{50} de $0.383 \pm 0.021 \mu\text{M}$.

5.7. Análisis de la actividad oxidasa de ScPDI1

Posteriormente, se procedió a analizar el efecto de la concentración de sustrato *drRNAsa* sobre la actividad oxidasa. El ensayo de replegamiento oxidativo de *drRNAsa* fue realizado a diferentes concentraciones de *drRNAsa* (0 – 21 μM). En la Tabla 5 (ver Anexo) y la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos del análisis, incluyendo el valor calculado de RNAsa activa recuperada. Como se puede apreciar, la actividad oxidasa es dependiente de la concentración de sustrato (*drRNAsa*); esto es, a mayor concentración de sustrato mayor actividad enzimática. Igualmente, a partir de la velocidad inicial se determinaron los parámetros de K_m y V_{max} , considerando una cinética Michaelis-Menten (M-M). Como se observa en la Figura 21, el análisis del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática describe un patrón dosis-dependiente M-M típico. Así, en las condiciones ensayadas, ScPDI1 mostró una K_m de $6.135 \pm 0.813 \mu\text{M}$ y una V_{max} de $0.1095 \pm 0.0047 \mu\text{M RNAsa min}^{-1}$.

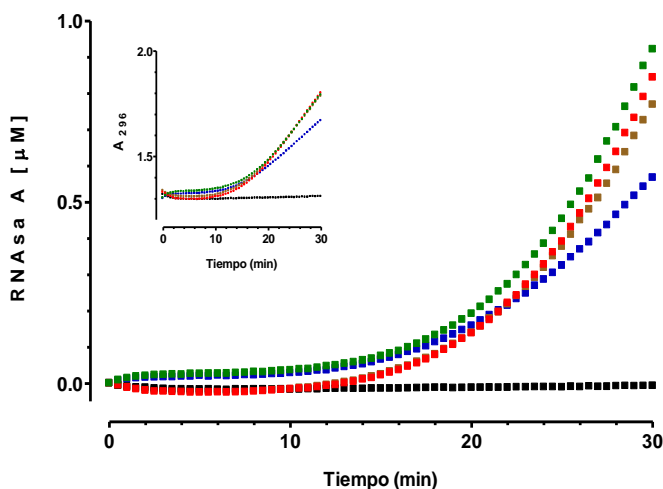


Figura 20. Representación gráfica del análisis del efecto de la concentración de *drRNA* sobre la actividad oxidasa.

Se muestra la cinética de replegamiento oxidativo de diferentes concentraciones de *drRNA* (μM) asistido por ScPDI1 ($0.3 \mu\text{M}$): 0 (negro); 4.1 (azul); 12.3 (café); 16.4 (rojo); 20.5 (verde). Los resultados obtenidos experimentalmente se muestran en el panel superior, en tanto que los resultados calculados de RNAasa activa recuperada se muestran en el panel principal.

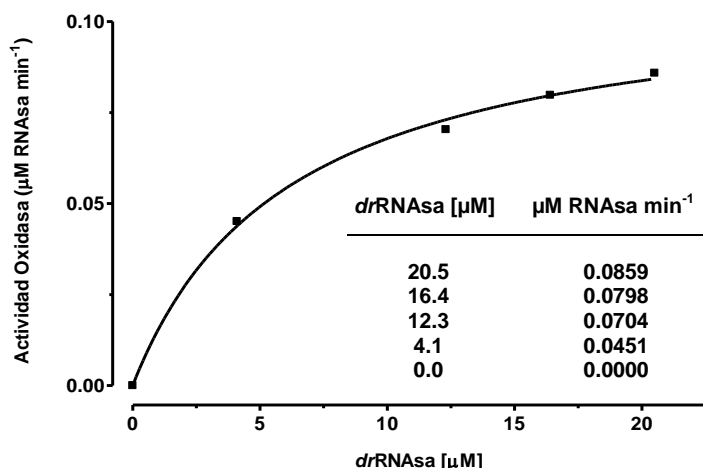


Figura 21. Representación gráfica del análisis dosis-dependiente de la actividad oxidasa en relación a la concentración de *drRNA*.

Se muestra el comportamiento dosis-dependiente del replegamiento oxidativo de diferentes concentraciones de *drRNA* (μM) asistido por ScPDI1 ($0.3 \mu\text{M}$). En el panel interno se encuentra la tabla que contiene los valores obtenidos de actividad enzimática en relación a la concentración de sustrato.

Adicionalmente, fue posible calcular el valor de K_{cat} ($K_{\text{cat}}=V_{\text{max}}/E_t$). Considerando que la concentración ScPDI1 en los ensayos fue de $0.3 \mu\text{M}$, la K_{cat} aparente calculada es de 0.365 min^{-1} ; es decir, cada mol de enzimas (ScPDI1) es capaz de convertir, mediante replegamiento oxidativo, 0.365 moles de sustrato (*drRNA*) en producto (RNAasa activa) por min. Además, utilizando la relación K_{cat}/K_m , se obtuvo un excelente valor de eficiencia enzimática ($991.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

5.8. Análisis de la inhibición de la actividad oxidasa de ScPDI1

El efecto de la concentración de bacitracina sobre la actividad oxidasa de ScPDI1 fue analizado mediante reacciones de inhibición de la enzima (0.3 μM) con diferentes concentraciones del inhibidor (0-34 μM). La actividad remanente fue determinada mediante ensayos de replegamiento oxidativo de *drRNAsa*. En la Tabla 6 (ver Anexo) y la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos del análisis,

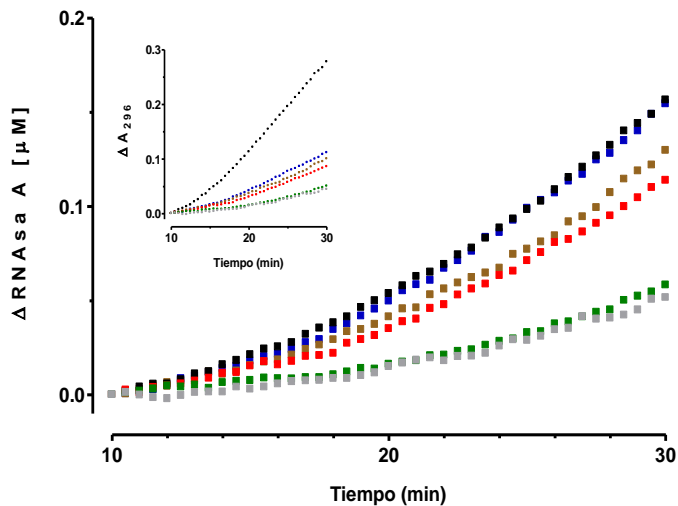


Figura 22. Representación gráfica del análisis del efecto de la concentración de bacitracina sobre la actividad oxidasa.

Se muestra la cinética de replegamiento oxidativo de *drRNAsa* (8.2 μM) asistido por ScPDI1 (0.3 μM) inhibida por diferentes concentraciones (μM) de bacitracina: 0 (negro); 3.4 (azul); 6.8 (café); 10.4 (rojo); 20.48 (verde); 33.8 (gris). Los resultados obtenidos experimentalmente se muestran en el panel superior, en tanto que los resultados calculados de RNAsa activa recuperada se muestran en el panel principal.

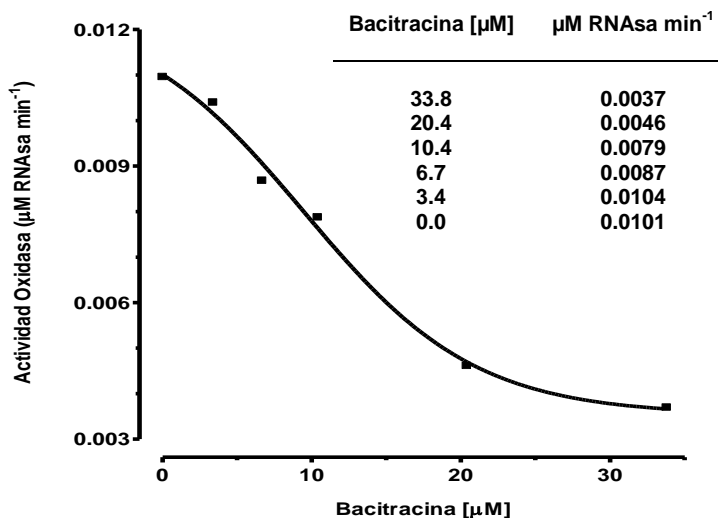


Figura 23. Representación gráfica del análisis dosis-dependiente de la actividad inhibitoria de bacitracina sobre la actividad oxidasa de ScPDI1.

Se muestra el comportamiento dosis-dependiente del replegamiento oxidativo de *drRNAsa* asistido por ScPDI1 inhibida por diferentes concentraciones (μM) de bacitracina. En el panel interno se encuentra la tabla que contiene los valores obtenidos de actividad enzimática en relación a la concentración de inhibidor.

incluyendo el valor calculado de RNAsa activa. Como se puede observar, la actividad oxidasa de ScPDI1 disminuye con respecto al aumento de la concentración de bacitracina; es decir, a mayor concentración de inhibidor menor actividad enzimática. Cabe mencionar dos situaciones experimentales que limitaron los ensayos: (i) se observó un alto nivel de incertidumbre en los primeros 10 min del ensayo, por tal motivo, estos datos no fueron considerados en el análisis; y (ii) se notó una interferencia en la absorbancia en ensayos con concentraciones de bacitracina mayores a 35 μM , por esa razón, los ensayos se limitaron a concentraciones menores a ésta.

Además, a partir de la velocidad inicial se determinaron los parámetros de IC_{50} y K_i . Como se observa en la Figura 23, el análisis del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática describe un patrón dosis-dependiente de pendiente variable. Así, en las condiciones ensayadas, bacitracina mostró una IC_{50} de 12.6 μM y una K_i de 5.4 μM . Adicionalmente, se analizó el efecto de otros inhibidores, tales como DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) y 4-DTDP (4,4'-ditiopiridina) sobre la actividad oxidasa de ScPDI1; sin embargo, no fue posible determinar su efecto debido a interferencia en los registros de absorbancia. Por otro lado, el antibiótico vancomicina y el 2,4-diclorofenol, que potencialmente pudieran actuar como inhibidores, no mostraron efecto inhibitorio sobre la actividad oxidasa de ScPDI1.

5.9. Análisis de la actividad isomerasa de ScPDI1

Primeramente, se determinó la actividad lítica remanente en la enzima scLZM. Como se observa en la Tabla 7 (ver Anexo) y la Figura 24, la enzima

scLZM presenta baja actividad lítica (menor a 25%); sin embargo, para fines experimentales, ésta actividad residual no interfiere.

Enseguida, se analizó la actividad isomerasa mediante un ensayo comparativo simple entre las enzimas ScPDI y *EhPDI*, usando una relación molar 6:1 (sustrato:enzima). La Figura 25 muestra que ScPDI1 exhibe una baja actividad isomerasa, incluso 7% menor que el control de replegamiento químico (sin enzima). Esto fue inesperado, ya que la actividad isomerasa es una característica enzimática

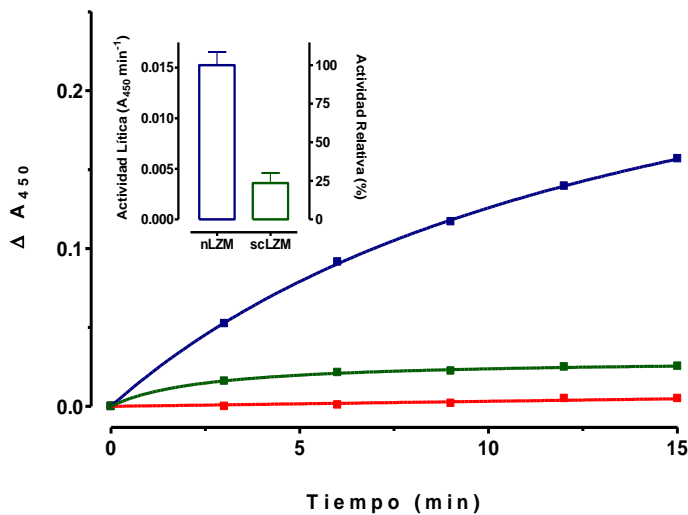


Figura 24. Representación gráfica del análisis de actividad de las soluciones de lisozima (LZM).

Se muestra la cinética de degradación lítica de las membranas de *M. lysodeikticus* en ausencia de LZM (rojo) y asistido por 2 μM nLZM (azul) o 2 μM scLZM (verde). La actividad lítica relativa se muestra en el panel superior.

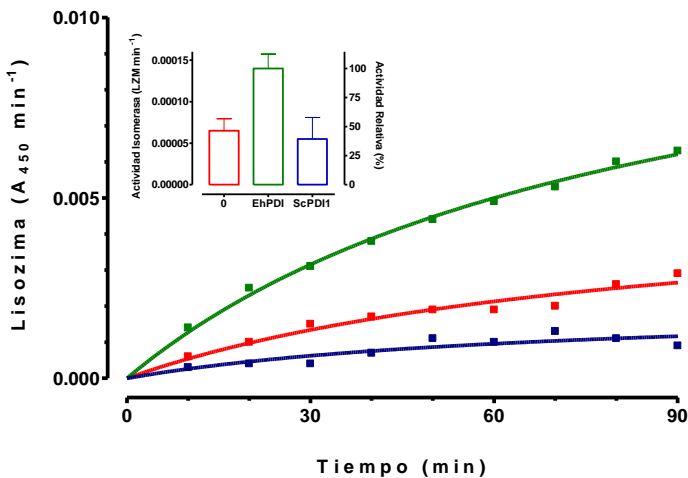


Figura 25. Representación gráfica del análisis comparativo de la actividad isomerasa de ScPDI1 y *EhPDI*.

Se muestra la cinética de replegamiento de scLZM (30 μM) en ausencia de enzima (rojo) y asistido por 5 μM ScPDI1 (azul) o 5 μM de *EhPDI* (verde). La actividad isomerasa relativa se muestra en el panel superior.

de ScPDI1 (LaMantia y Lennarz, 1993). Sin embargo, era conocido que otras actividades, como la chaperona y anti-chaperona, pudieran intervenir en la reacción (Puig y Gilbert, 1994).

Además, en la reacción de replegamiento asistido por ScPDI1 se observó turbidez y precipitación, lo que contribuyó a la disminución de la actividad isomerasa mostrada. Por lo tanto, este resultado fue atribuido a la actividad anti-chaperona que presenta ScPDI1 a altas concentraciones de sustrato (Puig y Gilbert, 1994; Sideraki y Gilbert, 2000).

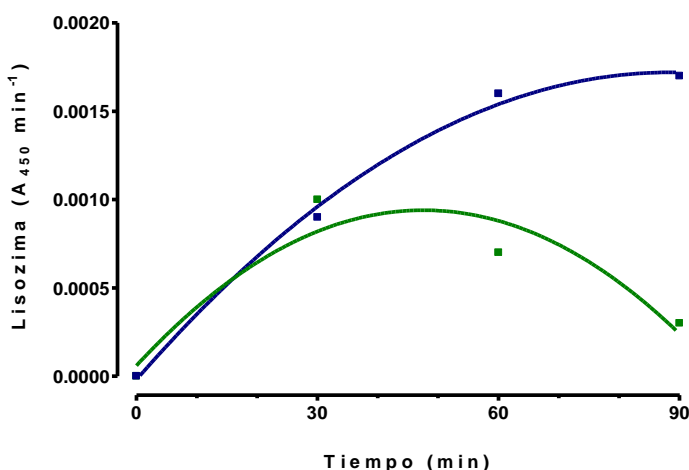


Figura 26. Representación gráfica del análisis de la actividad isomerasa de ScPDI1 en una relación equimolar con respecto al sustrato.

Se muestra la cinética de replegamiento de scLZM (5 μM) en ausencia de enzima (azul) y asistido por 5 μM ScPDI1 (verde).

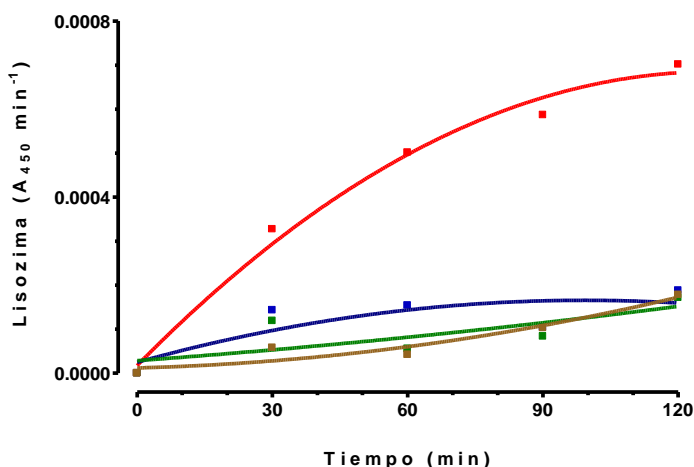


Figura 27. Representación gráfica del análisis de la actividad isomerasa de ScPDI1 a diferentes relaciones molares con respecto al sustrato.

Se muestra la cinética de replegamiento de scLZM (2 μM) en ausencia de enzima (rojo) y asistido por ScPDI1 a 1 μM (azul), 2 μM (verde) y 4 μM (café).

En el intento de valorar la actividad isomerasa de ScPDI1 sin la interferencia de otras actividades, se realizó un ensayo de replegamiento de lisozima en condiciones equimolares (1:1) de enzima y sustrato. Como se observa en la Figura 26, ScPDI1 sigue mostrando una baja actividad isomerasa, incluso interferida, probablemente, por la participación de la actividad chaperona (Puig y Gilbert, 1994). (LaMantia y Lennarz, 1993). Adicionalmente, y con fines comparativos, se realizó un ensayo a bajas concentraciones de sustrato y enzima en diferentes relaciones molares (2:1, 1:1 y 1:2). Los resultados mostrados en la Figura 27 indicaron que la interferencia por las actividades chaperona/anti-chaperona persistían.

Por último, se realizó un ensayo utilizando urea como agente caotrópico para intentar eliminar los agregados que se forman entre ScPDI1 y LZM (Sideraki y Gilbert, 2000). Como era esperado, urea favoreció la actividad isomerasa; sin embargo, de manera poco eficiente, ya que la actividad isomerasa siguió siendo menor a la observada para en la reacción no asistida (Figura 28).

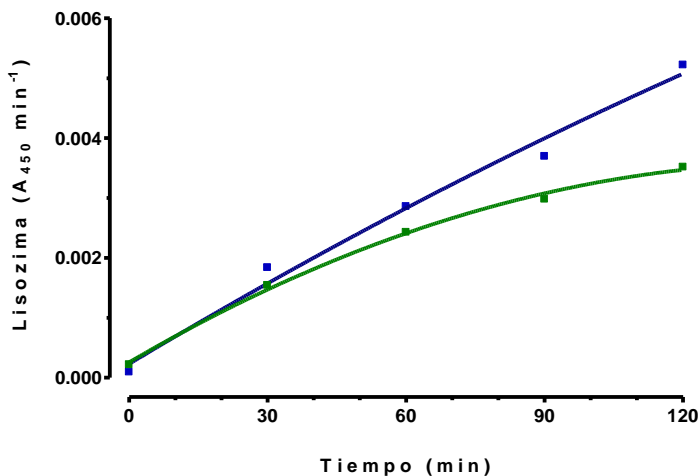


Figura 28. Representación gráfica del análisis de la actividad isomerasa de ScPDI1 usando urea como agente caotrópico.

Se muestra la cinética de replegamiento de 6 μM sclZM en ausencia de enzima (azul) y asistido por 2 μM ScPDI1 en presencia de 1 M urea (verde).

Aparentemente, el ensayo de actividad isomerasa mediante el replegamiento de scLZM no es el más apropiado para ScPDI1, a pesar de que esta metodología ha sido utilizada exitosamente para otras enzimas, como *EhPDI*. Por otro lado, la incorporación de urea al ensayo podría ayudar a reducir las actividades chaperona/anti-chaperona, las cuales interfieren en las determinaciones.

6. CONCLUSIONES

Mediante una par de oligonucleótidos específicos para el gen *pdi1* de *S. cerevisiae*, se amplificó la secuencia codificante para el péptido maduro ScPDI1, usando como molde el plásmido pCT38 (Tachibana y Stevens, 1992). El polipéptido maduro ScPDI1, etiquetado con un hexámero de histidinas en el extremo amino terminal, fue expresado en *E. coli*, a partir del plásmido recombinante pQYPDI (construido en este proyecto), y purificado a niveles mayores al 95%.

Los ensayos de replegamiento oxidativo de RNAsa A demostraron que la proteína recombinante ScPDI1 exhibe actividad oxidasa (AE específica = $0.09145 \pm 0.007 \mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) y una dependencia de la concentración de enzima, con una concentración efectiva media (EC_{50}) de $0.383 \pm 0.021 \mu\text{M}$.

Los ensayos de cinética enzimática mostraron una dependencia de la concentración de sustrato, en un comportamiento tipo Michaelis-Menten. A partir de estos, se obtuvo una K_m de $6.135 \pm 0.813 \mu\text{M}$ y una V_{max} de $0.1095 \pm 0.0047 \mu\text{M min}^{-1}$. Además, los valores aparentes calculados para la K_{cat} (0.365 min^{-1}) y la relación K_{cat}/K_m , ($991.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) señalan que ScPDI1 es oxidorreductasa con una eficiente actividad oxidasa. Por otro lado, los ensayos de inhibición indicaron que el antibiótico bacitracina inhibe la actividad oxidasa de ScPDI1 ($IC_{50} = 12.6 \mu\text{M}$ y $K_i = 5.4 \mu\text{M}$).

Aunque no fue posible obtener resultados concluyentes de la actividad isomerasa, las evidencias muestran que ScPDI1 si la exhibe. Es importante considerar, para futuros estudios, la optimización de un ensayo de actividad isomerasa (usando a scLZM como sustrato) que considere una concentración de urea que impida la interferencia de las actividades chaperona y anti-chaperona. O considerar la utilización de otro sustrato, como la scRNAsa, como una opción factible para valorar los parámetros cinéticos de ScPDI1.

Finalmente, es posible concluir que la proteína ScPDI1 recombinante (obtenida en este trabajo) muestra suficiente evidencia funcional para ser considerada como una enzima oxidorreductasa activa, por lo que puede representar un buen modelo comparativo de enzima PDI en ensayos bioquímicos y funcionales para otras oxidorreductasas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Christis C., Lubsen N., Braakman I. Protein folding includes oligomerization-examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *The FEBS Journal* (2008) 275: 4700-4727.
- Farquhar R., Honey N., Murant S., Dossier P., Schults L., Montgomery D., Ellis R., Freedman R., Tuite M. Protein disulfide isomerase is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* (1991) 108: 81-89.
- Fassio A., Sitia R. Formation, isomerisation and reduction of disulphide bonds during protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Histochemical Cell Biology* (2002) 117: 151-157.
- Hartwell L. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriological Reviews* (1974) 38: 164-198.
- Karp G. *Biología Celular y Molecular*, 4a. Edición. Editorial McGraw Hill, 2005.
- Katiyar S., Till E.A., Lennarz W.J. Studies on the function of yeast protein disulfide isomerase in renaturation of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* (2001) 1548: 47-56.
- Kimura T., Hosoda Y., Kitamura Y., Nakamura H., Horibe T., Kikuchi M. Functional differences between human and yeast protein disulfide isomerase family proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2004) 320: 359-365.
- Kleizen B., Braakman I. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology* (2004) 16: 343-349.
- Klug W.S. Cap. 2. Mitosis y meiosis. En *Conceptos de Genética*, 8a. Edición. Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A. (editores). Editorial Pearson, 2006.
- Kuwajima K. Protein folding *in vivo*. *Current Opinion in Biotechnology* (1992) 3: 462-467.
- Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) 227: 680-685.
- LaMantia M., Lennarz W. The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell* (1993) 74: 899-908.
- Lyles M., Gilbert H. Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease a by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochemistry* (1991) 30: 613-619.
- Madigan M.T. Cap. 14. *Biología de la Célula Eucariótica y Microorganismos Eucarióticos*. En *Biología de los Microorganismos*, 10a. Edición. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (editores). Editorial Pearson Prentice Hall, 2004.
- Morgan D.O. *The Cell Cycle: Principles of Control (Primers in Biology)*, 1a. Edición. Editorial New Science Press, Ltd., 2006.
- Müller-Esterl W. *Bioquímica: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. 1a. Edición. Editorial Reverté, 2008.

- Noiva R. Protein Disulfide Isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Cell and Developmental Biology* (1999) 10: 481-493.
- Nørgaard P., Westphal V., Tachibana C., Alsøe L., Holst B., Winther J. Functional differences in yeast protein disulfide isomerases. *The Journal of Cell Biology* (2001) 152: 553-562.
- Okada K., Hashimoto S., Imaoka S. Biological functions of protein disulfide isomerase as a target of phenolic endocrine-disrupting chemicals. *Journal of Health Science* (2010) 56: 1-13
- Pringle J.R., Broach J.R., Jones E.W. *The Molecular and Cellular Biology of Yeast Saccharomyces*, Vol. 3: Cell Cycle and Cell Biology. Editorial Cold Spring Harbor Monograph Series 21C, 1997.
- Puig A., Gilbert H. Proteins disulfide isomerase exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry* (1994) 269: 7764-7771.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a. Edición. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Schiene C., Fischer G. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Current Opinion in Structural Biology* (2000) 10: 40-45
- Sideraki V., Gilbert H. Mechanism of the anti-chaperone activity of protein disulfide isomerase: facilitated assembly of large, insoluble aggregates of denatured lysozyme and PDI. *Biochemistry* (2000) 39: 1180-1188.
- Solovyov A., Xiao R., Gilbert H. Sulfhydryl oxidation, not disulfide isomerization is the principal function of protein disulfide isomerase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* (2004) 279: 34095-34100.
- Tachibana C., Stevens T.H. The yeast EUG1 gene encodes an endoplasmic reticulum protein that is functionally related to protein disulfide isomerase. *Molecular and Cellular Biology* (1992) 12: 4601-4611.
- Tachikawa H., Miura T., Katakura Y., Mizunaga T. Molecular structure of yeast gene, PDI1, encoding protein disulfide isomerase that is essential for cell growth. *Journal of Biochemistry* (1991) 110: 306-313.
- Tian G., Xiang S., Noiva R., Lennarz W., Schindelin H. The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell* (2006) 124: 61-73.
- Turano C., Coppari S., Altieri F., Ferraro A. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *Journal of Cellular Physiology* (2002) 193: 154-163.
- Wang Q., Chang A. Eps1: a novel PDI-related protein involved in ER quality control in yeast. *The EMBO Journal* (1999) 18: 5972-5982.
- Westphal V., Darby N., Winther J. Functional properties of the two redox-active sites in yeast protein disulfide isomerase *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Molecular Biology* (1999) 286: 1229-1239.
- Wetterau J., Combs K., Spinner S., Joiner B. Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal tryglyceride transfer protein complex. *The Journal of Biological Chemistry* (1990) 266: 9800-9807.
- Wilkinson B., Gilbert H. Protein disulfide isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta* (2004) 1699: 35-44.

ANEXO. Tablas de resultados

Tabla 3. Análisis comparativo de las actividades oxidasa de las enzimas PDI de levadura (*ScPDI1*) y amiba (*EhPDI*).

Media y D.E. de las A_{296} de dos experimentos independientes. RNAsa en μM . Como ejemplo, se muestran los registros de cada 4 min.

Tiempo (min)	RQ (control)			ScPDI1 2 μM			EhPDI 2 μM		
	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa
0	1.331	0.070	0.000	1.369	0.073	0.000	1.375	0.059	0.000
4	1.357	0.069	0.022	1.385	0.078	0.013	1.394	0.079	0.015
8	1.367	0.067	0.030	1.473	0.088	0.097	1.444	0.087	0.060
12	1.375	0.065	0.038	1.657	0.063	0.363	1.514	0.091	0.136
16	1.390	0.063	0.052	1.840	0.038	0.815	1.604	0.100	0.260
20	1.411	0.064	0.072	1.991	0.031	1.424	1.693	0.108	0.418
24	1.442	0.065	0.107	2.107	0.030	2.141	1.783	0.111	0.626
28	1.481	0.067	0.153	2.193	0.034	2.903	1.866	0.114	0.872

Tabla 4. Análisis del efecto de la concentración de *ScPDI1* sobre la actividad oxidasa.

Media y D.E. de las A_{296} de dos experimentos independientes. RNAsa en μM . Como ejemplo, se muestran los registros de cada 4 min.

Tiempo (min)	ScPDI1 0.0 μM			ScPDI1 2.0 μM			ScPDI1 1.0 μM		
	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa
0	1.331	0.070	0.000	1.369	0.073	0.000	1.401	0.006	0.000
4	1.357	0.069	0.022	1.385	0.078	0.013	1.431	0.011	0.024
8	1.367	0.067	0.030	1.473	0.088	0.097	1.474	0.009	0.063
12	1.375	0.065	0.038	1.657	0.063	0.363	1.598	0.002	0.209
16	1.390	0.063	0.052	1.840	0.038	0.815	1.758	0.007	0.494
20	1.411	0.064	0.072	1.991	0.031	1.424	1.911	0.011	0.917
24	1.442	0.065	0.107	2.107	0.030	2.141	2.034	0.015	1.423
28	1.481	0.067	0.153	2.193	0.034	2.903	2.138	0.022	2.036

Tiempo (min)	ScPDI1 0.5 μM			ScPDI1 0.3 μM			ScPDI1 0.1 μM		
	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa
0	1.360	0.033	0.000	1.321	0.032	0.000	1.283	0.017	0.000
4	1.391	0.000	0.026	1.330	0.005	0.007	1.310	0.009	0.022
8	1.407	0.004	0.040	1.335	0.007	0.012	1.315	0.011	0.027
12	1.472	0.008	0.106	1.361	0.006	0.034	1.324	0.011	0.035
16	1.592	0.003	0.268	1.424	0.010	0.098	1.353	0.017	0.064
20	1.735	0.006	0.553	1.521	0.004	0.224	1.406	0.025	0.123
24	1.870	0.008	0.953	1.645	0.004	0.450	1.486	0.036	0.233
28	1.990	0.007	1.480	1.769	0.006	0.776	1.584	0.042	0.411

Tabla 5. Análisis del efecto de la concentración de drRNAsa sobre la actividad oxidasa.

Media y D.E. de las A_{296} de dos experimentos independientes. RNAsa en μM .

Tiempo (min)	drRNAsa 20.5 μM			drRNAsa 16.4 μM			drRNAsa 12.3 μM		
	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa
0	1.304	0.009	0.000	1.330	0.023	0.000	1.338	0.003	0.000
4	1.332	0.003	0.024	1.298	0.021	-0.024	1.309	0.011	-0.022
8	1.340	0.004	0.031	1.299	0.018	-0.023	1.311	0.012	-0.021
12	1.357	0.001	0.047	1.320	0.018	-0.007	1.332	0.015	-0.005
16	1.399	0.004	0.089	1.373	0.018	0.037	1.386	0.023	0.041
20	1.481	0.004	0.192	1.468	0.015	0.138	1.477	0.035	0.139
24	1.595	0.006	0.385	1.594	0.006	0.327	1.597	0.049	0.316
28	1.726	0.006	0.706	1.732	0.001	0.636	1.722	0.057	0.583

Tiempo (min)	drRNAsa 4.1 μM			drRNAsa 0.0 μM		
	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa
0	1.301	0.039	0.000	1.319	0.003	0.000
4	1.322	0.014	0.018	1.297	0.019	-0.017
8	1.326	0.010	0.021	1.296	0.018	-0.018
12	1.341	0.010	0.035	1.299	0.018	-0.016
16	1.384	0.002	0.077	1.301	0.015	-0.014
20	1.451	0.003	0.156	1.303	0.018	-0.013
24	1.535	0.011	0.282	1.305	0.017	-0.011
28	1.626	0.012	0.458	1.309	0.015	-0.008

Tabla 6. Análisis del efecto de la concentración de bacitracina sobre la actividad oxidasa de ScPDI1.

Media y D.E. de las A_{296} de tres experimentos independientes. RNAsa en μM .

Tiempo (min)	Bacitracina 0.0 μM			Bacitracina 3.4 μM			Bacitracina 6.8 μM		
	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa
0	1.042	0.115	0.000	0.909	0.017	0.000	0.922	0.021	0.000
4	1.027	0.108	-0.012	0.918	0.029	0.012	0.929	0.015	0.007
8	1.030	0.113	-0.010	0.923	0.026	0.016	0.934	0.016	0.012
12	1.041	0.117	0.000	0.933	0.025	0.027	0.942	0.016	0.020
16	1.062	0.122	0.019	0.947	0.025	0.043	0.953	0.013	0.032
20	1.089	0.129	0.048	0.970	0.026	0.072	0.973	0.015	0.055
24	1.119	0.143	0.083	0.997	0.023	0.108	0.993	0.015	0.081
28	1.152	0.147	0.126	1.024	0.024	0.150	1.021	0.009	0.121

Tiempo (min)	Bacitracina 10.40 μM			Bacitracina 20.48 μM			Bacitracina 33.8 μM		
	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa	Media	D.E.	RNAsa
0	0.877	0.018	0.000	0.926	0.033	0.000	0.910	0.005	0.000
4	0.885	0.010	0.009	0.938	0.023	0.014	0.929	0.014	0.020
8	0.890	0.009	0.014	0.941	0.022	0.016	0.923	0.018	0.014
12	0.898	0.007	0.023	0.944	0.018	0.020	0.923	0.012	0.014
16	0.908	0.008	0.034	0.948	0.020	0.024	0.931	0.014	0.022
20	0.923	0.005	0.053	0.955	0.022	0.031	0.939	0.013	0.031
24	0.945	0.004	0.082	0.966	0.025	0.043	0.949	0.010	0.042
28	0.967	0.005	0.113	0.980	0.030	0.060	0.961	0.013	0.057

Tabla 7. Determinación de actividad lítica de las soluciones de lisozima (*nLZM* y *scLZM*).

Media y D.E. de las A_{450} de dos experimentos independientes.

Tiempo (min)	0		nLZM 2 uM		scLZM 2 uM	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.053	0.012	0.016	0.006
6	0.001	0.000	0.092	0.001	0.022	0.006
9	0.002	0.000	0.117	0.007	0.023	0.006
12	0.005	0.000	0.140	0.008	0.025	0.004
15	0.005	0.000	0.157	0.008	0.026	0.004