



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

**Expresión, purificación y caracterización funcional
de la actividad reductasa de la PDI/P4HB humana**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

QFB. Blanca Citlali Saucedo Hinojosa

Tijuana, B. C.

Enero de 2011.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC,
con el apoyo del
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA.

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

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ABREVIACIONES.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Plegamiento de proteínas	10
1.2. Plegamiento asistido de proteínas en el retículo endoplásmico.....	11
1.3. Enlaces disulfuro	12
1.4. La familia PDI humana	13
1.5. Estructura de PDI	15
1.6. Propiedades catalíticas de PDI.....	16
1.7. La proteína PDI fuera del RE	18
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo general	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. Reactivos químicos.....	23
4.2. Oligonucleótidos sintéticos	23
4.3. Reactivos biológicos	24
4.3.1. El plásmido pQE30	24
4.3.2. Plásmido pCMV6-XL4	25
4.3.3. Enzimas, proteínas y otros reactivos biológicos.....	25
4.4. Células y medios de cultivo	26
4.5. Equipo	26
4.6. Amplificación de la secuencia codificante para la PDI de humano	26
4.7. Construcción del plásmido recombinante pQHUPDI	27
4.7.1. Digestión de PPCR HuPDI.....	27
4.7.2. Digestión del plásmido pQE30	27
4.7.3. Ligación	28
4.8. Transformación bacteriana y selección de transformantes	28

4.8.1.	<i>Transformación bacteriana mediante choque térmico</i>	28
4.8.2.	<i>Selección de transformantes estables.....</i>	29
4.8.3.	<i>Identificación y caracterización molecular del plásmido pQHuPDI.....</i>	29
4.9.	Análisis de la expresión de la proteína HuPDI recombinante.....	30
4.9.1.	<i>Inducción de la expresión a mini-escala.....</i>	30
4.9.2.	<i>Fraccionamiento y análisis de solubilidad</i>	31
4.10.	Purificación de la proteína HuPDI recombinante.....	31
4.10.1.	<i>Extracción de proteínas mediante lisis celular en condiciones nativas.....</i>	31
4.10.2.	<i>Cromatografía de afinidad a níquel.....</i>	32
4.10.3.	<i>Cromatografía de exclusión molecular.....</i>	33
4.10.4.	<i>Determinación de la concentración</i>	33
4.11.	Caracterización de la actividad reductasa de HuPDI recombinante	33
4.11.1.	<i>Ensayo de la actividad reductasa</i>	33
4.11.2.	<i>Dependencia de la actividad reductasa a la concentración de enzima</i>	34
4.11.3.	<i>Dependencia de la actividad reductasa a la concentración de sustrato.....</i>	34
4.11.4.	<i>Efecto del pH sobre la actividad reductasa</i>	35
4.12.	Bacitracina como inhibidor de HuPDI recombinante.....	35
4.12.1.	<i>Evaluación de bacitracina como inhibidor</i>	35
4.12.2.	<i>Efecto de bacitracina sobre la actividad reductasa.....</i>	36
4.13.	Bionformática y análisis estadístico	36
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	37
5.1.	Amplificación del fragmento codificante para el polipéptido maduro de HuPDI.....	37
5.2.	Construcción del plásmido recombinante pQHuPDI.....	39
5.3.	Análisis de expresión de la proteína HuPDI recombinante	42
5.4.	Expresión a midi-escala y purificación de la proteína HuPDI recombinante	44
5.5.	La proteína HuPDI recombinante exhibe actividad reductasa	45
5.6.	La actividad reductasa es dependiente de la concentración de enzima	47
5.7.	La actividad reductasa depende de la concentración del sustrato	49
5.8.	La actividad reductasa de HuPDI es dependiente del pH.....	52
5.9.	La Bacitracina inhibe la actividad reductasa de HuPDI recombinante	54
5.10.	La actividad reductasa depende de la concentración del inhibidor.....	56
6.	CONCLUSIONES.....	58
7.	REFERENCIAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plegamiento en el RE.	11
Figura 2. Organización de dominios y estructura 3D de la enzima PDI1 de <i>S. cerevisiae</i>	12
Figura 3. Organización de dominios de la proteína PDI de humano [Turano, 2002].....	15
Figura 4. Oxidación/Reducción catalizada por PDI [Wilkinson B, 2004].....	16
Figura 5. Mecanismo de la reacción de intercambio ditiol-disulfuro.	17
Figura 6. Isomerización de enlaces disulfuros catalizada por PDI [Wilkinson B, 2004].	18
Figura 7 Representación esquemática del plásmido pQE30 (QIAGEN).....	24
Figura 8. Secuencia nucleotídica, y polipeptídica deducida, del ADN complementario codificante para la proteína PDI/P4HB de humano.....	37
Figura 9. Separación electroforética (gel de agarosa al 1.5%) del fragmento de ADNc codificante para el polipéptido maduro de la proteína PDI de humano.....	38
Figura 10. Representación esquemática del plásmido recombinante pQHuPDI.	39
Figura 11. Separación electroforética (gel de agarosa al 1.5%) de los productos de la digestión de las clonas pQHuPDI (C1 – C6) con las endonucleasas Bam HI y Hind III.....	40
Figura 12. Separación electroforética (gel de agarosa al 2%) de los fragmentos de restricción obtenidos de la caracterización molecular del plásmido recombinante pQHuPDI (C4).....	41
Figura 13. Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12.5%) de los lisados bacterianos totales de la clona C4, que porta el plásmido pQHuPDI, obtenidos en condiciones de inducción y temperatura diferentes.	42
Figura 14. Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12.5%) de las fracciones bacterianas soluble, insoluble y total de la clona C4, que porta el plásmido pQHuPDI, obtenidas en ausencia y presencia de inductor.	43
Figura 15. Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12.5%) de las fracciones colectadas durante la cromatografía de afinidad a níquel para purificar la proteína HuPDI recombinante.....	45
Figura 16. Actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante.	46
Figura 17. Dependencia de la actividad reductasa a la concentración de enzima.....	48
Figura 18. Dependencia de la actividad reductasa a la concentración de sustrato.....	50
Figura 19. Ajuste Lineweaver-Burk y MM de la dependencia de la actividad reductasa a la concentración de sustrato.....	52
Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad reductasa. Representación gráfica de la actividad reductasa con respecto al valor de pH.....	53
Figura 21. Efecto inhibitor de bacitracina sobre la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante.	55
Figura 22. Efecto de la concentración de bacitracina sobre la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Familia de proteínas PDI de humano.....	14
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos sintéticos utilizados para la amplificación de la secuencia codificante para el polipéptido maduro de la PDI de humano.....	24
Tabla 3. Análisis de la actividad reductasa de la enzima HuPDI recombinante, comparada con la enzima EhPDI y la reducción no catalítica.	46
Tabla 4. Resultados de la cinética de reducción a diferentes concentraciones de enzima.	47
Tabla 5. Resultados de la dependencia de la actividad reductasa a la concentración enzima.	48
Tabla 6. Resultados de la cinética de reducción a diferentes concentraciones de sustrato.	50
Tabla 7. Resultados de la dependencia de la actividad reductasa a la concentración sustrato.	51
Tabla 8. Resultados del efecto del pH sobre la actividad reductasa.	53
Tabla 9. Resultados del efecto de bacitracina sobre la actividad reductasa.	54
Tabla 10. Efecto de la concentración del inhibidor bacitracina sobre la velocidad de reacción.....	56

ABREVIACIONES

ADN: Acido desoxirribonucleico.
ADNc: ADN complementario.
AE: actividad específica.
A₆₅₀: Absorbencia a 650 nm de longitud de onda.
BM: biología molecular.
C: cisteína.
CE₅₀: Concentración efectiva media.
CI: Con inductor.
CI₅₀: Concentración inhibitoria media.
CGHC: cisteína, glicina, histidina, cisteína.
dNTPs: desoxirribonucleotidos trifosfatados.
DTT: ditioneitol.
E. coli: *Escherichia coli*.
EDTA: acido etilendiamino tetra acético.
FI: fracción insoluble.
FS: fracción soluble.
HuPDI: PDI humana.
HuPDIr: PDI humana recombinante.
IPTG: isopropil-β-D- tiogalactopiranosido.
Kcat: constante catalítica o número de recambio.
KDa: kilodalton.
KDEL: lisina, aspártico, glutámico, leucina.
KI: constante de inhibición.
Km: constante de michaelis.
LB: Luria-Bertoni.
LBT: Lisados bacterianos totales.
M: molar.
MM: Michaelis-Menten.
N-terminal: amino terminal.
P4HB: subunidad beta de la prolil 4 hidroxilasa.
PDI: proteína disulfuro isomerasa.
PS: péptido señal.
RE: Retículo Endoplásmico.
RMN: resonancia magnética nuclear.
SI: sin inductor.
SRP: partícula de reconocimiento de señal.
SRPR: receptor de la partícula de reconocimiento de señal.
TEMED: tetrametiletilendiamina.
Tris: tris[hidroximetil]-aminometano.
Trx: tiorredoxina.
Vo: velocidad inicial.
Vmax: velocidad máxima.

RESUMEN

Para la célula es muy importante que las proteínas estén correctamente plegadas, ya que una proteína mal plegada es incapaz de realizar su función. Además, el plegamiento inadecuado de las proteínas puede llevar a la formación de agregados, los cuales pueden llegar a acumularse, causando daño celular y por consecuencia enfermedades [Dobson, 2001]. Como ejemplos de lo anterior tenemos a el bocio congénito con hipertiroidismo [Kim, 1996], la enfermedad de Alzheimer y las infecciones causadas por priones [Harper y Lansbury, 1997]. Por lo tanto, la célula tiene mecanismos que aseguran el correcto plegamiento de las proteínas, los cuales incluyen enzimas que aceleran el proceso de plegamiento y chaperonas moleculares que inhiben la agregación. Un ejemplo de este tipo de proteína es: la proteína disulfuro isomerasa (PDI; E.C. 5.4.3.1), una oxidoreductasa y chaperona residente del retículo endoplásmico (RE) [Wilkinson B, 2004]. Esta enzima es multifuncional y se ha encontrado fuera del RE, sin embargo aun se desconoce en su totalidad las funciones que esta enzima realiza fuera del RE, en donde al parecer, su actividad es principalmente como catalizadora de la reducción de puentes disulfuro.

El primer paso para el estudio de la estructura y función de una proteína es su extracción o producción. En este trabajo se expreso la enzima PDI humana recombinante en células de *Escherichia coli* utilizando un vector de expresión, denominado pQHUPDI. La enzima PDI fue expresada con una etiqueta de seis Histidinas en el extremo N-terminal, lo cual permitió la producción soluble de la enzima y su purificación con cromatografía de afinidad a níquel. Como resultado se obtuvieron 11.15 mg de proteína soluble a partir de 500 mL de cultivo bacteriano. La enzima PDI humana recombinante fue catalíticamente activa, como se pudo demostrar en los análisis de la actividad reductasa, que se realizaron con la insulina como sustrato de la PDI.

ABSTRACT

For a cell, it is very important that proteins are correctly folded. A misfolded protein is likely to lose its normal function, and therefore lead to the accumulation of aggregates which cause a disease [Dobson, 2001]. Among these diseases is goiter with hypothyroidism [Kim, 1996], Alzheimer's disease and prion infections [Harper and Lansbury, 1997]. Thus, our cells are packed with mechanisms that ensure a correct folding process of proteins; these include proteins that catalyze the folding process and molecular chaperones that inhibit aggregation. An example of these proteins is: protein disulfide isomerase (PDI; E.C.5.4.3.1), an oxidoreductase and chaperone of the endoplasmic reticulum (ER) [Wilkinson B, 2004]. This enzyme is multifunctional and has been found outside the ER, where apparently its function is mostly to catalyze the reduction of disulfide bonds, however its function outside the ER is not well known yet.

The first step towards understanding both the function and structure of a protein is its extraction or production. In the work described here, the recombinant human PDI was expressed in *Escherichia coli* using an expression vector, named pQHUPDI. PDI was expressed with an N-terminal tag of six Histidines, which allowed a soluble production and its purification with a nickel affinity chromatography. As a result 11.15 mg of soluble protein were obtained from 500 mL of bacterial culture. The recombinant human PDI enzyme was active, as demonstrated by the enzymatic reduction assays, with insulin as a substrate for PDI.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Plegamiento de proteínas

El plegamiento correcto de una proteína es la búsqueda de una estructura única, biológicamente activa, dentro de varias posibles estructuras [Zheng y Gilbert, 2001]. La correcta estructura tridimensional de la proteína es requisito para su funcionalidad y, por lo tanto, para la vida [Christis, 2008]. Anfinsen demostró que existen proteínas que pueden adquirir su estructura nativa sin asistencia, ya que la información requerida está contenida en su secuencia primaria [Anfinsen, 1973]. Por otro lado, Levinthal señaló que es prácticamente imposible que una proteína pruebe todas las conformaciones que puede adquirir, lo cual le tomaría muchísimo tiempo; mientras que, el plegamiento de proteínas en un célula es muy rápido [Karplus, 1997].

La “paradoja de Levinthal” llevó al concepto de un proceso energético tipo embudo, en el cual se minimizan las opciones conformacionales que puede probar una proteína, logrando en un menor tiempo la conformación más estable de menor energía [Dinner, 2000]. Sin embargo, conforme más grande y compleja es una proteína, más complejo se vuelve su plegamiento, por lo que durante la búsqueda de la conformación nativa, es posible que surjan conformaciones no nativas con interacciones no deseadas, dando como resultado un plegamiento incorrecto [Dobson, 2001].

1.2. Plegamiento asistido de proteínas en el retículo endoplásmico

El RE es un compartimento celular con múltiples funciones, entre las que figuran el metabolismo de carbohidratos, la destoxificación de fármacos, el almacenamiento de calcio, y la síntesis de fosfolípidos; sin embargo, se considera que su función principal es el plegamiento y la modificación post-traducciona de proteínas destinadas para secreción, incluyendo proteínas de la membrana plasmática y otros compartimientos intracelulares de la vía secretora (Figura 1) [Hatahet y Ruddock, 2007].

Durante la biosíntesis de proteínas de secreción, el extremo N-terminal de una proteína funciona como péptido señal (PS), el cual es reconocido por la partícula de reconocimiento de señal (SRP). La unión PS-SRP detiene temporalmente la traducción y dirige al ribosoma hacia un poro de translocación en la membrana plasmática del RE, donde el SRP es reconocido por un

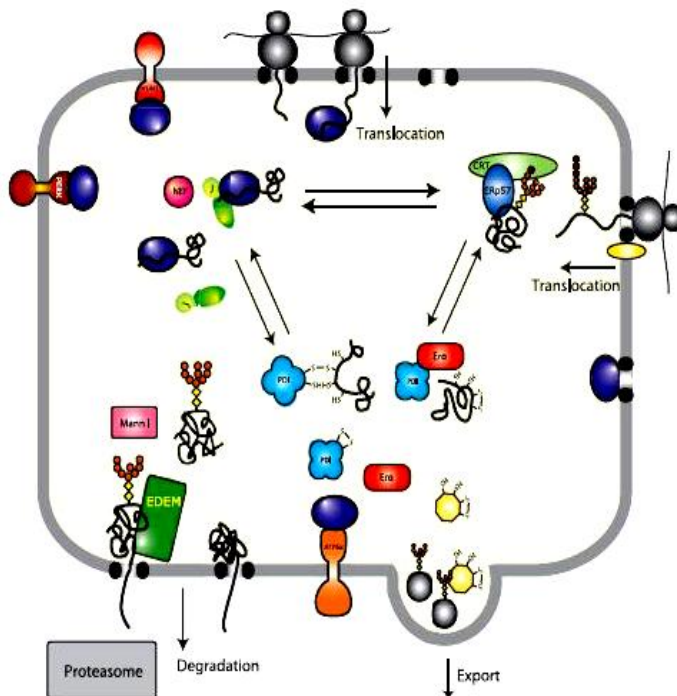


Figura 1. Plegamiento en el RE.

Una proteína recién sintetizada entra al RE a través de un poro de translocación, comienza a plegarse y puede ser glucosilada. Inmediatamente, se asocia con uno de los factores de plegamiento dependiendo de sus características (hidrofobicidad, cisteínas libres y azúcares). Una proteína puede ser transportada de un sistema de chaperonas a otro en secuencia, o puede usar una sola chaperona. En algunos casos cuando la chaperona de preferencia no está disponible, otra puede sustituirla. Si es liberada del sistema de chaperonas y se considera que ha sido plegada correctamente, entonces puede salir del RE. Si está incorrectamente plegada, será degradada [Christis, 2008].

receptor (SRPR). Posteriormente, el SRP es liberado y la traducción es concluida. Mientras el polipéptido naciente es translocado hacia el lumen del RE, un grupo de proteínas asisten su plegamiento. Es conocido que algunos factores que asisten el plegamiento, como PDI, sobrepasan la cantidad biológicamente necesaria, alcanzando concentraciones milimolares [Marquardt, 1993].

1.3. Enlaces disulfuro

Muchas proteínas que se sintetizan en el RE contienen enlaces disulfuros que estabilizan su estructura nativa. Los enlaces covalentes, producidos por la oxidación de dos residuos de cisteína (tioles libres), son importantes para el plegamiento y la estabilización de una proteína, ya que restringen su flexibilidad y dan direccionalidad a este proceso [Christis, 2008].

Debido a que cada residuo de cisteína tiene el potencial de formar un enlace disulfuro con otra

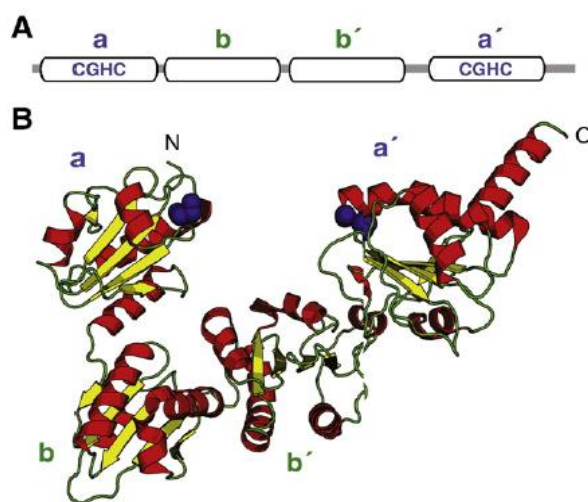


Figura 2. Organización de dominios y estructura 3D de la enzima PDI1 de *S. cerevisiae*.

(A) Organización de dominios de la ScPDI. Los dominios tipo tioredoxina se muestran como rectángulos redondeados con letras moradas indicando los dominios catalíticos (a y a') y letras verdes mostrando los dominios inactivos (b y b'). Se muestran las secuencias de los sitios activos. La extensión del extremo C-terminal más allá del dominio a' constituye una hélice-α prominente visible en la estructura cristalizada de Pdiip.

(B) Las hélices α se muestran de color rojo, las β-plegadas de color amarillo y las horquillas en verde. Las cisteínas del sitio activo se representan con esferas moradas [Appenzeller-Herzog, 2008].

cisteína cercana, la correcta formación de los enlaces disulfuro nativos es un paso limitante en el plegamiento de proteínas *in vitro* e *in vivo* [Kersteen, 2005].

Las células eucariotas producen diversas y muy complejas estructuras con enlaces disulfuro, principalmente en el RE, donde el ambiente oxidativo es propicio, y la catálisis de la formación de los puentes disulfuro fue demostrada para la enzima PDI. La figura 2 muestra la organización de dominios y la estructura cristalográfica de la proteína PDI1 de *S. cerevisiae* [Appenzeller-Herzog, 2008].

1.4. La familia PDI humana

Aunque la PDI es el modelo de las oxidoreductasas del RE, no es la única. A la fecha, la familia de enzimas PDI de humano consta de 19 miembros, y sigue creciendo. Todas las secuencias PDI contienen una secuencia señal y al menos un dominio tipo tiorredoxina, aunque difieren en su organización de dominios, especificidad de tejido y secuencia del sitio activo [Christis, 2008]. Aun cuando el nombre de esta enzima lleva implícita una función isomerasa, esta actividad no ha sido demostrada experimentalmente para todos los miembros de la familia. Por ello, la clasificación de las proteínas de la familia PDI de humano se basa principalmente en sus semejanzas de secuencia-estructura y en su localización, dejando en segundo término la función y las propiedades enzimáticas.

La Tabla 1 muestra una panorámica global de las características estructurales de la familia de proteínas PDI de humano. La mayoría son solubles, con una secuencia señal para retención en el RE en el extremo C-terminal (KDEL), con al menos un dominio tipo tiorredoxina activo (Trx-*a*). Los dominios Trx-*a* usualmente contienen el motivo catalítico CXXC, mientras que los dominios Trx-*b* (catalíticamente inactivos) no contienen este sitio activo [Appenzeller-Herzog, 2008].

Tabla 1. Familia de proteínas PDI de humano.

Nombre	No. de Acceso	Longitud (aa)	Localización en el RE	Organización de dominios	Dominios tipo Trx-a	Secuencia del sitio activo
Hag 3	Q8TD06	165	QSEL	a	1	CQYS
ERp18	O95881	172	EDEL	a	1	CGHC
Hag 2	O95994	175	KTEL	a	1	CPHS
ERp29	P30040	261	KEEL	b-D	0	-
ERp27	Q96DNO	273	KVEL	b-b'	0	-
ERp44	Q9BS26	406	RDEL	a-b-b'	1	CFRS
ERp46	Q8NBS9	432	KDEL	a°-a-a'	3	CGHC,CGHC, CGHC
P5	Q15084	440	KDEL	a°-a-b	2	CGHC,CGHC
ERp57	P30101	505	QEDL	a-b-b'-a'	2	CGHC,CGHC
PDI	P07237	508	KDEL	a-b-b'-a'	2	CGHC,CGHC
PDIr	Q14554	519	KEEL	b-a°-a-a'	3	CSMC, CGHC, CPHC
PDIp	Q13087	525	KEEL	a-b-b'-a'	2	CGHC, CTHC
PDILT	Q8N807	584	KEEL	a-b-b'-a'	2	SKQS, SKKC
ERp72	PI3677	645	KEEL	a°-a-b-b'-a'	3	CGHC, CGHC, CGHC
ERdj5	Q81PX1	793	KDEL	J-a''-b-a°-a-a'	4	CSHC, CPPC, CHPC, CGPC
TMX	Q9H3N1	280	-	a	1	CPAC
TMX2	Q9Y320	296	KKDK	a	1	SNDC
TMX4	Q9HIE5	349	RQR	a	1	CPSC
TMX3	FLJ20793	454	KKKD	a-b-b'	1	CGHC

Las proteínas PDI se enlistan de acuerdo a su tamaño. Los nombres de las PDI solubles se escribieron en color negro y las transmembranales en azul [Appenzeller-Herzog C, 2008].

La variedad de miembros de la familia de proteínas PDI de humano refleja la importancia de la formación correcta de enlaces disulfuro en los polipéptidos; además; existen estudios que demuestran que cada miembro cumple una función específica en la asistencia del plegamiento y/o en diferentes etapas del proceso [Norgaard, 2001; Christis, 2008].

1.5. Estructura de PDI

La PDI/P4HB humana es un polipéptido de 508 residuos de aminoácidos con un peso molecular calculado de 57 KDa, residente del RE, que participa en la formación de enlaces disulfuro (oxidasa) y cataliza el rearreglo de enlaces disulfuro incorrectamente formados (isomerasa).

La PDI humana está organizada en cinco dominios, designados en orden secuencial *a*, *b*, *b'*, *a'* y *c* (Figura 3). Los dominios *a* y *a'* son altamente homólogos a la tiorredoxina de bacterias las cuales poseen un sitio activo independiente con dos cisteínas en la secuencia CGHC, las cuales están involucradas en las actividad ditiol-disulfuro oxidoreductasa. Los dominios inactivos *b* y *b'* son similares en secuencia entre ellos, pero no con los dominios *a* y *a'*. La estructura tridimensional de los dominios *a* y *b* ha sido resuelta mediante resonancia magnética

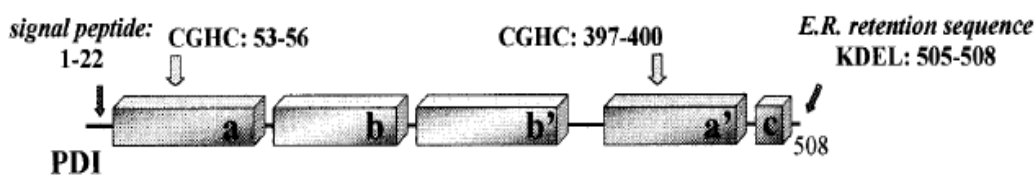


Figura 3. Organización de dominios de la proteína PDI de humano [Turano, 2002].

nuclear (RMN). De estas estructuras, no sorprende que los dominios *a* adopten un plegamiento similar a la tioredoxina bacteriana, pero es interesante que los dominios *b* también adquieran esa conformación, aun cuando exhiben una baja homología en su estructura primaria. Hasta la fecha, no ha sido posible resolver la estructura de la PDI de humano completa [Zapun, 1999; Wilkinson, 2004].

1.6. Propiedades catalíticas de PDI

La enzima PDI de humano tiene dos sitios activos conservados, ambos se caracterizan por la presencia de un motivo estructural CGHC, los cuales pueden formar un enlace disulfuro (enzima activa como oxidasa), o un ditiol (enzima activa como reductasa/isomerasa) [Chakravarthi, 2006].

Las reacciones que la PDI puede catalizar, oxidación, reducción o isomerización, dependen tanto de la constante de equilibrio de la reacción total como del estado redox del sitio activo [Wilkinson, 2004]. Cuando la PDI se encuentra en su estado oxidado, el disulfuro puede ser transferido a un sustrato (oxidación), como resultado el sitio activo de PDI queda reducido.

Por otro lado, cuando PDI se encuentra en su estado reducido, el disulfuro del sustrato puede ser reducido y el sitio activo de PDI queda en su estado oxidado (Figura 4), esta reacción de intercambio tiol-disulfuro procede a través de la formación de disulfuros mixtos

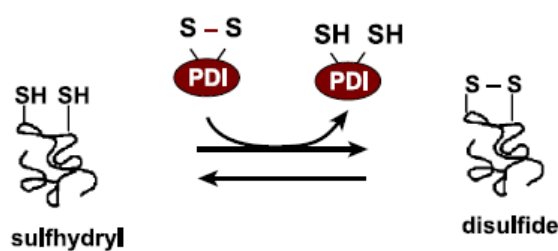


Figura 4. Oxidación/Reducción catalizada por PDI [Wilkinson B, 2004].

transitorios entre la enzima y el sustrato (Figura 5) [Appenzeller-Herzog, 2008].

La formación de enlaces disulfuros que ocurre durante el proceso de plegamiento es propensa a error, dando como resultado la formación de enlaces disulfuros incorrectos. En un polipéptido con enlaces disulfuros incorrectos, la isomerización es importante para adquirir su conformación nativa (Figura 6) [Schwaller, 2003]. La isomerización requiere del rompimiento de un enlace disulfuro en el sustrato y la formación de uno nuevo entre diferentes residuos de cisteína. La isomerización es un conjunto de ciclos repetidos de reducción y reoxidación, dando como resultado un rearrreglo de enlaces disulfuros, hasta lograr la configuración correcta y una estructura nativa estable (cinéticamente o termodinámicamente) [Wilkinson B, 2004].

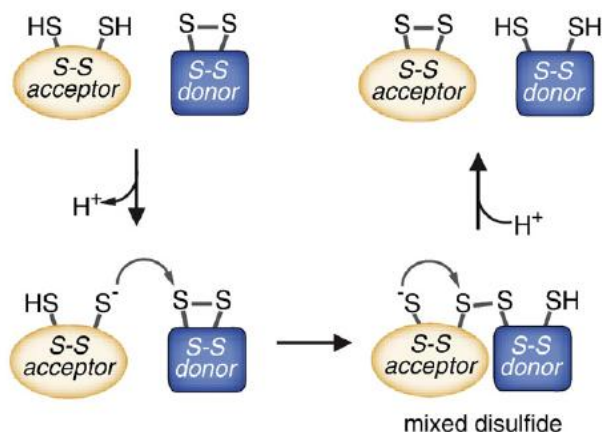


Figura 5. Mecanismo de la reacción de intercambio ditiol-disulfuro.

La reacción de intercambio ditiol-disulfuro entre el donador y el aceptor ocurre a través de dos residuos de cisteína: en el primer paso, una cisteína del aceptor es desprotonada para formar un anión tiolato reactivo, el cual a su vez ataca al enlace disulfuro del donador. Como consecuencia, se forma un enlace disulfuro mixto transitorio, el cual posteriormente es liberado por el ataque de un anión tiolato derivado de una segunda cisteína del aceptor. Esta reacción se completa con la protonación de un anión tiolato en el donador. La PDI tiene una secuencia CXXC catalíticamente activa, que puede actuar como donador o aceptor de disulfuros, catalizando la oxidación y reducción de sus sustratos [Ellgard L, 2008].

1.7. La proteína PDI fuera del RE

Existen evidencias de que algunas proteínas PDI se localizan fuera del RE, aunque se desconocen aún los mecanismos mediante los cuales éstas escapan de este compartimento celular [Turano, 2002]. Recientemente, las PDI

han sido localizadas en la superficie de varios tipos celulares, incluyendo hepatocitos, células exocrinas pancreáticas y plaquetas [Mezghrani, 2000]. Debido a que las condiciones redox de cada compartimento son diferentes, las funciones de la PDI también pueden ser diferentes dependiendo de su localización celular [Turano, 2002].

Así, se le han podido asignar algunas funciones a la PDI de superficie celular.. Al parecer, los dominios Trx están involucrados en la actividad reductora presente en la membrana celular, de tal manera que los enlaces disulfuro de macromoléculas que tienen contacto con la célula pueden ser reducidos o reorganizados [Wilkinson, 2004]. Recientemente, se ha observado que la enzima PDI participa en la adhesión de plaquetas [Lahav J, 2002]; además, juega un papel importante en el proceso de infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y Sindbis [Abell y Brown, 1993], reduciendo los enlaces disulfuro de las glucoproteínas virales que interaccionan con receptores celulares [Ryser, 1994].

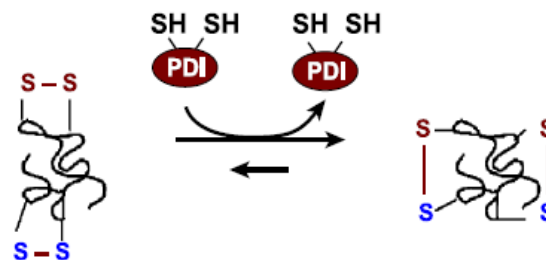


Figura 6. Isomerización de enlaces disulfuros catalizada por PDI [Wilkinson B, 2004].

1.8 Expresión heteróloga de proteínas.

El avance en la tecnología y en la ciencia ha facilitado el estudio de la célula a nivel molecular. A partir de los 1970's el ADN se convirtió en una molécula fácil de manipular, de manera que ahora la ingeniería genética y la biotecnología han permitido a la comunidad científica la producción de varias proteínas recombinantes para su estudio morfológico y funcional [Alberts, 2008)]. Existe un gran interés por la expresión heteróloga de proteínas debido a su uso en la industria farmacéutica e industrial, en los últimos años muchas proteínas recombinantes están siendo utilizadas en la clínica, por ejemplo existen proteínas recombinantes para factores de coagulación, la eritropoyetina, la hormona de crecimiento y la insulina [Voet, 2009]. Algunas de las ventajas de utilizar las proteínas recombinantes son la eliminación de el riesgo de transmitir enfermedades infecciosas y de ocasionar una respuesta inmunitaria como puede ocurrir con el uso de proteínas que han sido extraídas de tejidos animales [Rang, 2008].

La producción de proteínas recombinantes, ya sea para estudios estructurales, para análisis bioquímicos o para uso terapéutico, requiere del éxito de tres factores: la expresión, la solubilidad y la purificación, por lo que actualmente se buscan nuevos y mejores protocolos para la producción de proteínas recombinantes [Esposito, 2006]. La producción de la PDI humana se ha realizado principalmente en *Escherichia coli*, aunque también se ha expresado en *Bacillus brevis* [Tojo, 1994] y en células del insecto *Spodoptera frugiperda* [Vuori, 1992]. En este trabajo se expresó la PDI humana recombinante en *Escherichia coli*.

2. JUSTIFICACIÓN

Aproximadamente, una tercera parte de las proteínas sintetizadas en células humanas poseen enlaces disulfuro, estos son indispensables para la adopción de su estructura y el desempeño de su función. La proteína disulfuro isomerasa (PDI) asiste al plegamiento de proteínas, mediante la formación y reorganización de enlaces disulfuro en el retículo endoplásmico. Las proteínas incorrectamente plegadas pierden su función y forman agregados insolubles, los cuales interfieren con la correcta función celular. Varias enfermedades se han podido asociar al plegamiento incorrecto de algunas proteínas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, el bocio, el enfisema y algunas enfermedades causadas por priones.

Se ha demostrado también que la reducción de enlaces disulfuro es una de las funciones más importantes de la enzima PDI fuera del retículo endoplásmico. La importancia de la función disulfuro reductasa en la superficie celular destaca por el aumento de tioles en la leucemia y en la infección por HIV, por lo que terapias basadas en la modulación de PDI podrían ser aplicadas a estas y otras enfermedades.

Debido a la importancia de la enzima PDI en el funcionamiento celular y considerando tanto sus posibles aplicaciones biotecnológicas (facilitadora del plegamiento), así como su uso como molécula blanco para el diseño de nuevos inhibidores específicos. Se propone utilizar a la enzima PDI de humano como proteína modelo para caracterizar la actividad reductasa *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo para la expresión de la Proteína Disulfuro Isomerasa humana, utilizando un sistema de expresión recombinante en el citoplasma de *Escherichia coli*. Y su purificación mediante métodos cromatográficos.

3.2. Objetivos específicos

1. Obtener un fragmento del gen humano codificante para el péptido maduro de la proteína PDI/P4HB mediante una reacción de PCR, utilizando un plásmido comercial como molde y un par de oligonucleótidos gen-específicos como iniciadores de la reacción.
2. Obtener un plásmido recombinante de expresión citosólica de la proteína HuPDI mediante técnicas de biología molecular.
3. Realizar estudios, a pequeña escala, de la expresión de la proteína HuPDI mediante un análisis de fracciones bacterianas y separación electroforética de proteínas en gel de poliacrilamida.
4. Obtener la proteína HuPDI recombinante pura, mediante métodos cromatográficos de afinidad y exclusión molecular.
5. Realizar ensayos de caracterización bioquímica de la actividad reductasa a diferentes concentraciones de enzima y sustrato, y determinar los parámetros enzimáticos de CE_{50} , K_m , V_{max} y K_{cat} .

6. Determinar el efecto del pH sobre la actividad reductasa y el pH óptimo para esta actividad.
7. Determinar el efecto inhibidor de la bacitracina sobre la actividad reductasa, y determinar los parámetros de inhibición CI_{50} y K_i .

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos químicos

Todos los reactivos químicos y soluciones químicas fueron de calidad biología molecular (grado BM). Cloruro de sodio, azul de bromofenol, etanol, ácido etilendiamino tetra- acético (EDTA) y solución de lisis *CellLytic®* B fueron comprados de *Sigma*. N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y azul de *Coomassie* R250 fueron obtenidos de *Biorad*. De la compañía *IBI* se compraron tris[hidroximetil]-aminometano (Tris) y ditioneitol (DTT). Los reactivos persulfato de amonio, ácido acético e hidróxido de sodio (*JT Baker*), IPTG y ampicilina (*Flucka*), acrilamina y bis-acrilamida (*EMD*), isopropanol (*Productos Químicos de Monterrey*), imidazol (*Fisher Biotech*), glicerol (*ICN*), y 2-mercaptoetanol (*Omnipur*) fueron adquiridos de diferentes proveedores.

4.2. Oligonucleótidos sintéticos

El diseño de oligonucleótidos y el cálculo de tamaño molecular del producto esperado fueron realizados utilizando como molde la secuencia del gen PDI/P4HB de humano (NCBI *GenBank™* Acc. No. NM_000918). Los oligonucleótidos BamPDIH y HsPDIR2 fueron adquiridos a través del servicio de síntesis química de las compañías *Genosys* y *Operon*, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos sintéticos utilizados para la amplificación de la secuencia codificante para el polipéptido maduro de la PDI de humano.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Enzima de restricción	Tm (°C)
BamPDIH	cgggatccGACGCCCCCGAGGAGGAGGAC	<i>Bam</i> HI	74°C
HsPDIR2	gcccaagcttACAGTTCATCTTTCACAGCTTTCTG	<i>Hind</i> III	70°C

4.3. Reactivos biológicos

4.3.1. El plásmido pQE30

El ADN codificante para el polipéptido maduro de PDI de humano fue clonado en el vector pQE30 (Qiagen). El plásmido pQE30 (Figura 7) tiene un origen de replicación ColE1, una secuencia de seis histidinas en el extremo 5' que facilita la purificación de las proteínas recombinantes, un sitio de clonación múltiple, y un promotor T5/LacO. Además, contiene como marcador de selección el gen codificante para la enzima β -lactamasa bacteriana.

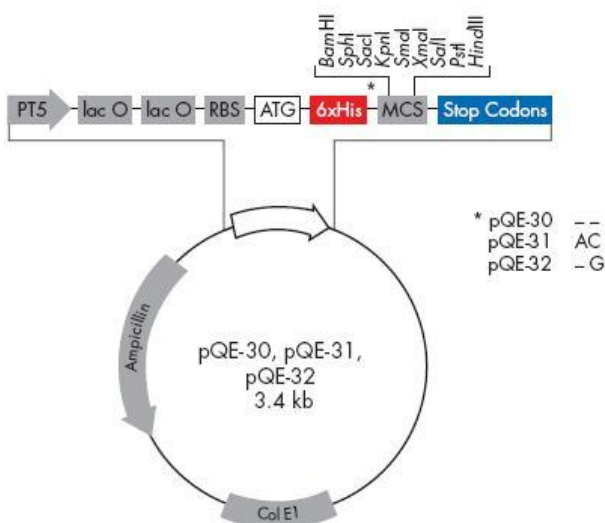


Figura 7 Representación esquemática del plásmido pQE30 (QIAGEN).

Se muestra el origen de replicación ColE1 (barra gris), el gen β -lactamasa (flecha gris). El promotor T5/LacO, el sitio de unión a ribosoma, la etiqueta de histidinas en el extremo 5', el sitio de clonación y los codones de paro se identifican con una flecha blanca.

4.3.2. Plásmido pCMV6-XL4

El plásmido pCMV6-XL4 de *OriGene* tiene insertado el ADNc que codifica para la PDI humana. El cADN se encuentra insertado entre el *EcoRI* y *SalI* y fue liberado antes de la amplificación. Este plásmido de expresión es de 4.7 Kb, tiene dos promotores, CMV para células eucariotas y T7 para bacterias, tiene un origen de replicación bacteriano *ColE1*, y un gen para la β -lactamasa.

4.3.3. Enzimas, proteínas y otros reactivos biológicos

Para la reacción de PCR, se utilizó la enzima *Taq ADN polimerasa* de *Roche* y los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) de *New England Biolabs*. La ligación se realizó usando la enzima *T4 ADN ligasa* de *Roche*. Las digestiones endonucleolíticas fueron realizadas usando las enzimas de restricción *BamHI*, *HindIII*, *ClaI*, *PstI* y *XhoI* de *New England Biolabs*. Los marcadores de peso molecular de ADN (DNA Ladder y λ -*HindIII*) y de proteínas (*Protein Marker Broad Range* y *Prestained Marker Broad Range*) fueron obtenidas de *New England Biolabs*.

Para los ensayos de reductasa se utilizó la insulina de páncreas de bovino de *Sigma* o la insulina recombinante humana (*Humulin® R*) de *Eli Lilly & Co*. Los ensayos de inhibición fueron realizados utilizando el antibiótico *bacitracina* de *Calbiochem*. La enzima *EhPDI* fue obtenida de la reserva de proteínas recombinantes del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Baja California.

4.4. Células y medios de cultivo

Para los experimentos de clonación molecular y expresión de proteínas, se utilizó la cepa XL1-Blue MRF' (*Stratagene*) de *Escherichia coli*. Los medios de cultivo LB y 2X YT fueron preparados de acuerdo a protocolos estándar de laboratorio [Sambrook, 1989].

4.5. Equipo

Para visualización de los geles (de agarosa teñidos con bromuro de etidio o de poliacrilamida teñidos con azul de *Coomassie*) se utilizó el fotodocumentador *Gel Doc*® 2000 de *Biorad*. Los micro-ensayos turbidimétricos fueron analizados usando el lector de microplacas *Microplate Reader* 680 de *Biorad*. Las lecturas de absorbancia UV se realizaron en el espectrofotómetro *Smartspec*® *Plus* de *Biorad*. La reacción de PCR fue realizada en un termociclador *Techne* de *Techgene*.

4.6. Amplificación de la secuencia codificante para la PDI de humano

La región codificante para el polipéptido maduro de la enzima PDI/P4HB de humano fue amplificada en una reacción de 50 µL con la siguiente composición: 2 ng de un plásmido comercial (Origene No. de Cat. SC119620) como molde, 20 pmol de cada uno de los oligonucleótidos (BamPDIH y HsPDIR2) como iniciadores y 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa como enzima polimerizante, en una solución amortiguadora 1X (*Roche*) suplementada con dNTPs a 0.2 mM. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de

desnaturalización inicial (2 min a 94 °C), 35 ciclos de amplificación exponencial (20 seg a 94 °C, 20 seg a 55 °C, 20 seg a 72 °C), y un ciclo de extensión final (7 min a 72 °C). El producto fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Posteriormente, el producto de amplificación (PPCR HuPDI) fue purificado utilizando el estuche comercial *QIAprep® PCR purification Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo proporcionado por fabricante.

4.7. Construcción del plásmido recombinante pQHuPDI

4.7.1. Digestión de PPCR HuPDI

El producto de amplificación PPCR HuPDI purificado fue digerido con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III. Se preparo una mezcla de reacción con la siguiente composición: 27 µL del producto de PCR (aproximadamente 2ng), 3µL de la solución amortiguadora 10X NEB2 y 10 U de cada enzima. La mezcla de reacción fue incubada durante 2 hrs a 37 °C. El producto de la digestión fue purificado utilizando el estuche comercial *QIAprep® PCR Purification Kit* (Qiagen) y analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL).

4.7.2. Digestión del plásmido pQE30

El plásmido comercial pQE30 (Qiagen) fue digerido con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III. Se preparo una mezcla de reacción de 25 µL con la siguiente composición: solución amortiguadora 1X NEB2, 500 ng de plásmido y 20 U de cada endonucleasa. Esta mezcla fue incubada durante 2 h a 37 °C. El producto de la digestión fue purificado utilizando el estuche

comercial *QIAprep® PCR Purification Kit* (Qiagen) y analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL).

4.7.3. Ligación

La ligación del fragmento de ADN codificante para HuPDI y el plásmido pQE30 fue realizada utilizando la enzima *T4 ADN ligasa*. Se preparó una mezcla de reacción con la siguiente composición: solución amortiguadora 1X de ligasa (suplementada con ATP), 2 ng del plásmido digerido, 20 ng del inserto digerido y 5 U de la enzima, en un volumen final de 10 µL. La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 2 h.

4.8. Transformación bacteriana y selección de transformantes

4.8.1. Transformación bacteriana mediante choque térmico

El producto de la ligación fue transfectado a células de *E. coli* XL1-Blue MRF' competentes mediante choque térmico. Las células competentes fueron preparadas mediante tratamiento con CaCl₂, siguiendo un protocolo estándar de laboratorio [Sambrook, 1989]. 5 µL de la reacción de ligación fueron mezclados con 100 µL de suspensión de células bacterianas competentes en un microtubo. La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min. El choque térmico fue realizado colocando el microtubo en un termobloque a 42 °C durante 5 min e inmediatamente colocado en hielo durante 5 min. Las células bacterianas fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de medio líquido 2X YT e incubación durante 30 min a 37 °C.

4.8.2. Selección de transformantes estables

Para seleccionar las transformantes estables, 100 y 900 μL de la suspensión celular fueron sembradas (plaqueadas) en cajas petri con medio sólido LB, suplementado con ampicilina (150 $\mu\text{g/mL}$). Los cultivos fueron incubados durante la noche a 37 °C. Las transformantes capaces de crecer en presencia del antibiótico fueron consideradas como estables.

4.8.3. Identificación y caracterización molecular del plásmido pQHUPDI

Para la selección de clonas positivas, es decir que contengan plásmido pQHUPDI, 6 colonias fueron seleccionadas al azar e inoculadas en 3 mL de medio de cultivo líquido LB, suplementado con ampicilina (150 $\mu\text{g/mL}$). Los cultivos fueron incubados durante la noche a 37°C, con agitación (300 rpm). Posteriormente, el plásmido fue purificado utilizando el estuche comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen).

El escrutinio inicial, para identificar la presencia del inserto en los plásmidos purificados, fue realizado mediante digestión con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III. Posteriormente, un análisis endonucleolítico más extenso, fue llevado a cabo utilizando las endonucleasas *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I, *Cla*I y *Xho*I. Se realizaron reacciones de 10 μL con la siguiente composición: solución amortiguadora 1X, 3 μL de plásmido purificado, y 5 o 10 U de las endonucleasas correspondientes. Estas mezclas de reacción fueron incubadas durante 1 h a 37°C y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, con 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio.

4.9. Análisis de la expresión de la proteína HuPDI recombinante

4.9.1. Inducción de la expresión a mini-escala

Diez microlitros de un cultivo líquido de una clona positiva, que presuntamente contiene el plásmido recombinante pQHUPDI, se utilizaron para inocular y preparar cultivo joven de 2 mL en medio líquido LB, suplementado con ampicilina (150 µg/mL). El cultivo fue incubado durante la noche a 37°C, con agitación (300 rpm). Al día siguiente, 60 µL del cultivo se utilizaron para inocular 3 mL de medio líquido LB, suplementado con ampicilina (150 µg/mL). El cultivo fue incubado durante 2 h a 37 °C, con agitación de 300 rpm (pre-inducción). Posteriormente, una fracción de 1.5 mL del cultivo fue transferida a un tubo estéril y suplementada con 1.5 µL del inductor (una solución 1M de IPTG, 1 mM final) (fracción CI). El cultivo remanente (1.5 mL) permaneció sin inductor (fracción SI); ambas fracciones del cultivo fueron incubados otras 4 h a 37°C, con agitación (300 rpm). A partir de 1 mL de cada cultivo (CI y SI), se obtuvieron pastillas celulares mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 2 min. Los lisados bacterianos totales (LBT) fueron obtenidos mediante resuspensión de las pastillas celulares en 200 µL de una solución 2X SDS PAGE, seguida de una lisis por calor a una Temperatura > 95 °C durante 10 min. La expresión de la proteína HuPDI recombinante fue analizada mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5%, teñido con azul de *Coomassie*.

4.9.2. Fraccionamiento y análisis de solubilidad

A partir de dos cultivos jóvenes, uno con inductor (CI) y otro sin inductor (SI), se prepararon pastillas celulares de 1 mL de cultivo para preparar (i) LBT y (ii) fracción soluble (FS) e insoluble (FI) en condiciones nativas. Los LBT fueron obtenidos mediante resuspensión de las pastillas celulares en 800 µL de una solución 2X SDS PAGE, seguida de una lisis por calor. Para el análisis de solubilidad, las pastillas celulares fueron resuspendidas mediante vórtex ligero en 0.4 mL del reactivo *CellLytic*® B y agitadas durante 10 min. Las fracciones FS y FI fueron obtenidas mediante centrifugación a máxima velocidad durante 5 min. Los sobrenadantes (FS) fueron transferidos a microtubos limpios y mezclados con 400 µL de una solución 2X SDS PAGE, en tanto que los precipitados (FI) fueron resuspendidos en 800 µL de 2X SDS PAGE. Ambas fracciones fueron desnaturalizadas mediante calor a una Temperatura > 95 °C durante 10 min. Muestras de LBT, FS y FI fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12.5%.

4.10. Purificación de la proteína HuPDI recombinante

4.10.1. Extracción de proteínas mediante lisis celular en condiciones nativas

Un cultivo de 100 mL que expresa la proteína HuPDI recombinante fue preparado a una dilución 1:50 de un cultivo joven que porta el plásmido pQHuPDI. El cultivo fue pre-inducido durante 2 h a 37 °C, con agitación (300 rpm). La expresión proteica fue inducida con 0.1 mM de IPTG e incubada durante 4 h a 37 °C, con agitación (300 rpm). La pastilla celular fue obtenida mediante centrifugación a 4,500 rpm durante 15 min a 4°C. La lisis celular en condiciones

nativas fue realizada mediante resuspensión de la pastilla celular con 5 mL del reactivo *CellLytic*® B, 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, incubación a temperatura ambiente durante 15 min (con agitación). La fracción soluble (FS) fue obtenida mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante (FS) fue transferido a un tubo cónico y almacenado en refrigeración.

4.10.2. Cromatografía de afinidad a níquel

Para obtener suficiente proteína para los estudios bioquímicos, se prepararon fracciones solubles (FS) de 5 lotes de 100 mL de cultivos bacterianos que expresan la proteína HuPDI recombinante. La proteína recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad a níquel utilizando la resina de agarosa-NTA-Ni (Qiagen). El hexámero de histidinas presente en el extremo N-terminal de la proteína recombinante interacciona con el níquel, formando un enlace de coordinación, el cual facilita el proceso de purificación. La columna de 0.5 mL de cama fue acondicionada con 10 volúmenes de solución amortiguadora de lavado [100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; suplementada 300 mM de NaCl y 20 mM de imidazol (pH 8.0)]; enseguida, las FS fueron cargadas en la columna y se permitió la unión de la proteína HuPDI recombinante mediante el flujo permitido por la gravedad; posteriormente, la columna fue lavada con 10 volúmenes de la solución amortiguadora de lavado; finalmente, la proteína HuPDI recombinante fue recuperada en fracciones de 0.5 mL utilizando una solución amortiguadora de elución [100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; suplementada 300 mM de NaCl y 250 mM de imidazol (pH 8.0)]. Una muestra de LBT, FS, FNP (fracción no pegada), W (lavado) y las primeras 5 fracciones de

elución (E1-E5) fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% y analizadas mediante tención con azul de *Coomassie*.

4.10.3. Cromatografía de exclusión molecular

La proteína HuPDI recombinante fue estabilizada en solución amortiguadora 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0) mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna PD-10 (*Amersham Biosciences*) y el procedimiento proporcionado por el proveedor. Las columnas PD-10 contienen una cama de *Sephadex*® G-25 que permite la separación de moléculas de alto peso molecular ($M_r > 5000$) de las sustancias de bajo peso molecular ($M_r < 1000$).

4.10.4. Determinación de la concentración

La concentración de la proteína fue determinada mediante espectrofotometría UV a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado ($\epsilon^{0.1\%} = 0.807$). El coeficiente de extinción molar fue calculado en línea usando el programa *ProtParam Tool* (expasy.org/tools/protparam.html) del servidor ExPASy (expasy.org).

4.11. Caracterización de la actividad reductasa de HuPDI recombinante

4.11.1. Ensayo de la actividad reductasa

La enzima PDI cataliza la reducción de enlaces disulfuro de la insulina, activada por ditioneitol (DTT). Cuando insulina se reduce, la subunidad B se agrega y precipita, lo cual puede ser registrado espectrofotométricamente a 650 nm (Holmgren, 1979). La actividad reductora de

la proteína HuPDI recombinante fue analizada utilizando insulina bovina como sustrato en un micro-ensayo turbidimétrico.

En microplaca, se prepararon mezclas de 100 μ L conteniendo una solución amortiguadora 100 mM de NaH_2PO_4 pH (7.0) suplementada con 2 mM de EDTA, 100 μ M de insulina, 4.0 μ M de HuPDI recombinante, y (en último lugar) 0.3 mM de DTT. Como controles se prepararon un blanco (carente de enzima PDI y DTT), un control de reducción química (carente de enzima) y un control interno (2.5 μ M de *Eh*PDI recombinante). Inmediatamente después de añadir el volumen correspondiente de DTT, la microplaca fue colocada en un lector y se registro la A_{650} cada 10 min, durante 90 min, a temperatura ambiente. El ensayo se realizó por duplicado.

4.11.2. Dependencia de la actividad reductasa a la concentración de enzima

En microplaca, se prepararon mezclas de 100 μ L conteniendo una solución amortiguadora 100 mM de NaH_2PO_4 pH (7.0) suplementada con 2 mM de EDTA, 100 μ M de insulina, diferentes concentraciones de HuPDI recombinante (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, y 0.6 μ M), y 0.3 mM de DTT. Como controles se prepararon un blanco (carente de enzima PDI y DTT) y un control de reducción química (carente de enzima). Inmediatamente después de añadir el volumen correspondiente de DTT, la microplaca fue colocada en un lector y se registro la A_{650} cada 10 min, durante 90 min, a temperatura ambiente, el ensayo se realizó por triplicado.

4.11.3. Dependencia de la actividad reductasa a la concentración de sustrato

Se prepararon, mezclas por triplicado de 100 μ L en microplaca conteniendo una solución amortiguadora 100 mM de NaH_2PO_4 pH (7.0) suplementada con 2 mM de EDTA, diferentes

concentraciones de insulina (75, 100, 150, 200, y 300 μM), 0.3 μM de HuPDI recombinante, y 0.3 mM de DTT. Como controles se prepararon un blanco (carente de insulina y DTT) y un control de reducción química (carente de insulina). Inmediatamente después de añadir el volumen correspondiente de DTT, la microplaca fue colocada en un lector y se registro la A_{650} cada 10 min, durante 90 min, a temperatura ambiente.

4.11.4. Efecto del pH sobre la actividad reductasa

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante se utilizó una solución amortiguadora universal (Ellis, 1961), con algunas modificaciones. La actividad reductasa fue analizada en un rango de pH = 4 a 8.5.

En microplaca, se prepararon mezclas por triplicado de 100 μL conteniendo 50 mM de una solución amortiguadora universal (pH = X) suplementada con 2 mM de EDTA, 100 μM de insulina, 0.3 μM de HuPDI recombinante, y 0.3 mM de DTT. Como controles se prepararon un blanco (carente de PDI, insulina y DTT), un control de reducción química (carente de PDI) y un control de efecto del pH sobre la mezcla de proteínas (sin DTT). Inmediatamente después de añadir el volumen correspondiente de DTT, la microplaca fue colocada en un lector y se registró la A_{650} cada 10 min, durante 90 min, a temperatura ambiente.

4.12. Bacitracina como inhibidor de HuPDI recombinante

4.12.1. Evaluación de bacitracina como inhibidor

Bacitracina es un antibiótico que tiene actividad inhibitoria de las funciones reductivas y oxidativas de la PDI (Mandel, 1993). Inicialmente, se preparó una reacción de inhibición de 100

μL conteniendo 1 μM de HuPDI recombinante y 0.5 mM de bacitracina; además, se preparó un control sin inhibidor. Las reacciones fueron incubadas durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la actividad reductasa remanente fue analizada siguiendo el protocolo previamente descrito (4.11.1.). La determinación se realizó por triplicado.

4.12.2. Efecto de bacitracina sobre la actividad reductasa

Inicialmente, se prepararon reacciones de inhibición de 100 μL conteniendo 1 μM de HuPDI recombinante y diferentes concentraciones de bacitracina (0.061, 0.270, 1.014, 1.487, y 2.501 mM); además, se preparó un control sin inhibidor. Las reacciones fueron incubadas durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la actividad reductasa remanente fue analizada siguiendo el protocolo previamente descrito (4.11.1.). La determinación se realizó por triplicado.

4.13. Bionformática y análisis estadístico

Todos los cálculos y predicciones se realizaron utilizando el programa *Gene Construction Kit*® v3.0 para Mac (*Textco BioSoftware*), y los servidores NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y ExPASy (www.expasy.org).

Para el análisis estadístico, los ajustes por mínimos cuadrados de regresión lineal o no lineal, y el cálculo de los parámetros de cinética enzimática y de inhibición se utilizó el paquete de computación *Prism*® v4.03 para Windows (*GraphPad Software, Inc*).

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Amplificación del fragmento codificante para el polipéptido maduro de HuPDI

La secuencia de ADN complementario codificante para la proteína PDI/P4HB de humano (Figura 8) disponible en la base de datos de *GenBank*TM del NCBI (No. Ac. NM_000918) fue utilizada para diseñar un par de oligonucleótidos sintéticos, intencionados para amplificar el polipéptido maduro.

```

                                     Bam HI
                                cgggatcc gac gcc ccc gag gag gag gac
atg ctg cgc cgc gct ctg ctg tgc ctg gcc gtg gcc gcc ctg gtg cgc gcc gac gcc ccc gag gag gag gac cac < 75
M  L  R  R  A  L  L  C  L  A  V  A  A  L  V  R  A  D  A  P  E  E  E  D  H
gtc ctg gtg ctg cgg aaa agc aac ttc gcg gag gcg ctg gcg gcc cac aag tac ctg ctg gtg gag ttc tat gcc < 150
V  L  V  L  R  K  S  N  F  A  E  A  L  A  A  H  K  Y  L  L  V  E  F  Y  A
cct tgg tgt ggc cac tgc aag gct ctg gcc cct gag tat gcc aaa gcc gct ggg aag ctg aag gca gaa ggt tcc < 225
P  W  C  G  H  C  K  A  L  A  P  E  Y  A  K  A  A  G  K  L  K  A  E  G  S
gag atc agg ttg gcc aag gtg gac gcc acg gag gag tct gac ctg gcc cag cag tac ggc gtg cgc gcc tat ccc < 300
E  I  R  L  A  K  V  D  A  T  E  E  S  D  L  A  Q  Q  Y  G  V  R  G  Y  P
acc atc aag ttc ttc agg aat gga gac acg gct tcc ccc aag gaa tat aca gct ggc aga gag gct gat gac atc < 375
T  I  K  F  F  R  N  G  D  T  A  S  P  K  E  Y  T  A  G  R  E  A  D  D  I
gtg aac tgg ctg aag aag cgc acg ggc ccg gct gcc acc acc ctg cct gac ggc gca gct gca gag tcc ttg gtg < 450
V  N  W  L  K  K  R  T  G  P  A  A  T  T  L  P  D  G  A  A  A  E  S  L  V
gag tcc agc gag gtg gct gtc atc ggc ttc ttc aag gac gtg gag tgc gac tct gcc aag cag ttt ttg cag gca < 525
E  S  S  E  V  A  V  I  G  F  F  K  D  V  E  S  D  S  A  K  Q  F  L  Q  A
gca gag gcc atc gat gac ata cca ttt ggg atc act tcc aac agt gac gtg ttc tcc aaa tac cag ctg gac aaa < 600
A  E  A  I  D  D  I  P  F  G  I  T  S  N  S  D  V  F  S  K  Y  Q  L  D  K
gat ggg gtt gtc ctc ttt aag aag ttt gat gaa ggc cgg aac aac ttt gaa ggg gag gtc acc aag gag aac ctg < 675
D  G  V  V  L  F  K  K  F  D  E  G  R  N  N  F  E  G  E  V  T  K  E  N  L
ctg gac ttt atc aaa cac aac cag ctg ccc ttt gtc atc gag ttc acc gag cag aca gcc ccg aag att ttt gga < 750
L  D  F  I  K  H  N  Q  L  P  L  V  I  E  F  T  E  Q  T  A  P  K  I  F  G
ggt gaa atc aag act cac atc ctg ctg ttc ttg ccc aag agt gtg tct gac tat gac ggc aaa ctg agc aac ttc < 825
G  E  I  K  T  H  I  L  L  F  L  P  K  S  V  S  D  Y  D  G  K  L  S  N  F
aaa act aca gcc gag agc ttc aag ggc aag atc ctg ttc atc ttc atc gac agc gac cac acc gac aac cag cgc < 900
K  T  A  A  E  S  F  K  G  K  I  L  F  I  F  I  D  S  D  H  T  D  N  Q  R
atc ctg gag ttc ttt ggc ctg aag aag gaa gag tgc ccg gcc gtg cgc ctc atc acc ctg gag gag gag atg acc < 975
I  L  E  F  F  G  L  K  K  E  E  C  P  A  V  R  L  I  T  L  E  E  E  M  T
aag tac aag ccc gaa tcg gag gag ctg acg gca gag agg atc aca gag ttc tgc cac cgc ttc ctg gag ggc aaa < 1050
K  Y  K  P  E  S  E  E  L  T  A  E  R  I  T  E  F  C  H  R  F  L  E  G  K
atc aag ccc cac ctg atg agc cag gag ctg ccg gag gac tgg gac aag cag cct gtc aag gtg ctt gtt ggg aag < 1125
I  K  P  H  L  M  S  Q  E  L  P  E  D  W  D  K  Q  P  V  K  V  L  V  G  K
aac ttt gaa gac gtg gct ttt gat gag aaa aaa aac gtc ttt gtg gag ttc tat gcc cca tgg tgt ggt cac tgc < 1200
N  F  E  D  V  A  F  D  E  K  K  N  V  F  V  E  F  Y  A  P  W  C  G  H  C
aaa cag ttg gct ccc att tgg gat aaa ctg gga gag acg tac aag gac cat gag aac atc gtc atc gcc aag atg < 1275
K  Q  L  A  P  I  W  D  K  L  G  E  T  Y  K  D  H  E  N  I  V  I  A  K  M
gac tcg act gcc aac gag gtg gag gcc gtc aaa gtg cac agc ttc ccc aca ctg aag ttc ttt cct gcc agt gcc < 1350
D  S  T  A  N  E  V  E  A  V  K  V  H  S  F  P  T  L  K  F  F  P  A  S  A
gac agg acg gtc att gat tac aac ggg gaa cgc acg ctg gat ggt ttt aag aaa ttc ctg gag agc ggt ggc cag < 1425
D  R  T  V  I  D  Y  N  G  E  R  T  L  D  G  F  K  K  F  L  E  S  G  G  Q
gat ggg gca ggg gat gat gac gat ctg gac gac ctg gaa gaa gca gag gag cca gac atg gag gaa gac gat gat < 1500
D  G  A  G  D  D  D  D  L  E  D  L  E  E  A  E  E  P  D  M  E  E  D  D  D
cag aaa gct gtg aaa gat gaa ctg taa < 1527
Q  K  A  V  K  D  E  L  *
gtc ttt cga cac ttt cta ctt gac att cgaacccg
                                     HindIII
```

Figura 8. Secuencia nucleotídica, y polipeptídica deducida, del ADN complementario codificante para la proteína PDI/P4HB de humano.

Las regiones de hibridación de los oligonucleótidos se muestran en cajas coloridas: verde, sentido; rojo, anti-sentido. Además, se muestra la secuencia de los oligonucleótidos, indicando los sitios de restricción.

Por otro lado, un plásmido comercial (que porta ADN complementario codificante para la proteína PDI/P4HB) fue utilizado como molde en una reacción de PCR. Como se observa en la Figura 9, se amplificó exitosamente un fragmento de aproximadamente 1.5 Kb, concordante con el tamaño esperado (1492 pb).

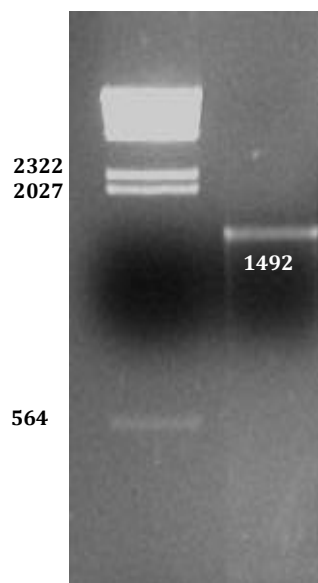


Figura 9. Separación electroforética (gel de agarosa al 1.5%) del fragmento de ADNc codificante para el polipéptido maduro de la proteína PDI de humano.

Se indican los pesos moleculares (en pb) correspondientes al marcador de peso molecular (izquierda) y el producto amplificado (derecha).

5.2. Construcción del plásmido recombinante pQHuPDI

El plásmido recombinante pQHuPDI fue obtenido mediante la inserción (ligación) del producto de PCR, el ADN codificante para el polipéptido maduro de PDI de humano, en fase con la secuencia codificante para el hexámero de histidinas del plásmido pQE30 (Qiagen). El plásmido recombinante pQHuPDI (Figura 10) fue utilizado para la expresión de la proteína recombinante PDI de humano (rHuPDI). Este vector expresa la rHuPDI con una etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal bajo el control del promotor de T5/LacO. Además, contiene como marcador de selección el gen codificante para la enzima β -lactamasa bacteriana.

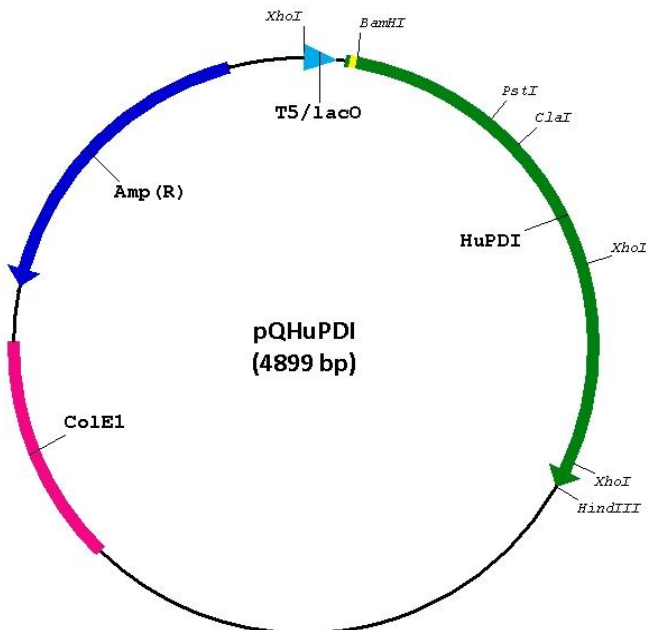


Figura 10. Representación esquemática del plásmido recombinante pQHuPDI.

Se muestran los genes de HuPDI (verde), con el hexámero de histidinas en el extremo N-terminal (amarillo), y β -lactamasa (azul); además, se identifican el origen de replicación ColE1 (rosa) y la región promotora T5/LacO (magenta). La talla molecular y algunos sitios de restricción también son señalados.

5.3 Selección de Transformantes.

El producto de la ligación fue transfectedo a células de *E. coli* XL1-Blue MRF' y seleccionado mediante resistencia a ampicilina. Seis transformantes estables fueron seleccionadas aleatoriamente; posteriormente, el plásmido fue aislado y digerido con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III para seleccionar aquellas clonas positivas, portadoras del plásmido pQHuPDI.

Como se observa en la Figura 11, sólo la clona 4 (C4) exhibe el patrón de restricción esperado para el plásmido recombinante pQHuPDI. Es decir, libera un fragmento de aprox. 1.5 Kb, correspondiente al tamaño esperado para el inserto.

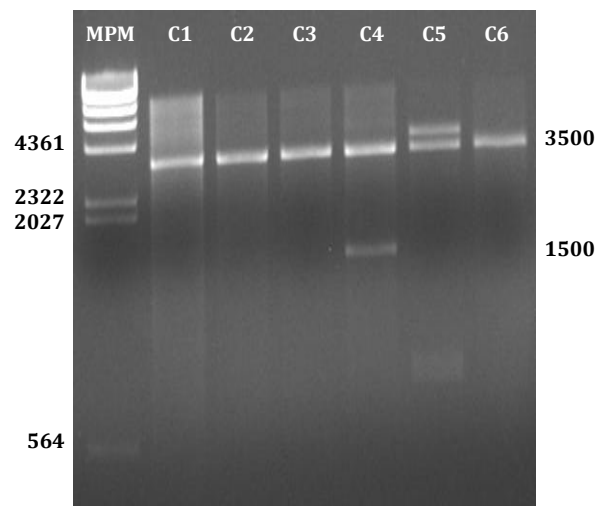


Figura 11. Separación electroforética (gel de agarosa al 1.5%) de los productos de la digestión de las clonas pQHuPDI (C1 – C6) con las endonucleasas *Bam* HI y *Hind* III.

Se indican los pesos moleculares (en pb) correspondientes al marcador de peso molecular (izquierda) y los fragmentos de digestión (derecha).

Para caracterizar molecularmente el plásmido recombinante aislado de la clona 4, se realizó un análisis endonucleolítico, basado en la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción, utilizando las endonucleasas *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I, *Cla*I y *Xho*I.

Como se observa en la Figura 12, el plásmido aislado de la clona 4 corresponde al vector de expresión pQHUPDI, ya que se observaron correctamente los diferentes patrones de restricción esperados.

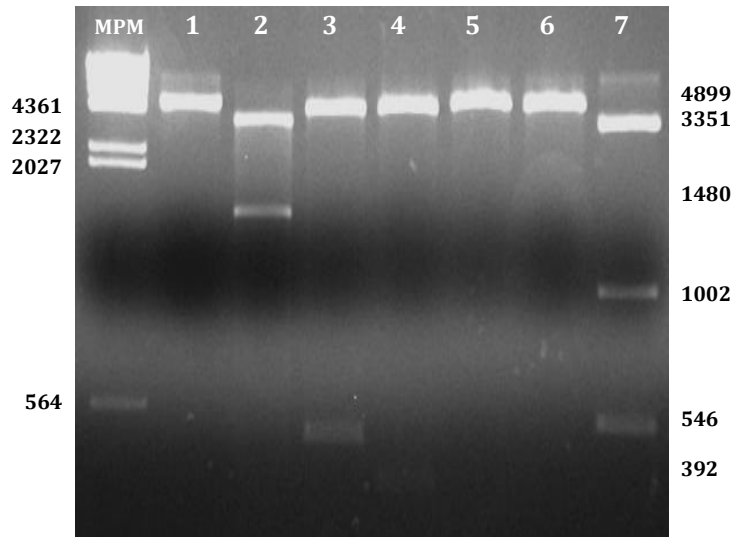


Figura 12. Separación electroforética (gel de agarosa al 2%) de los fragmentos de restricción obtenidos de la caracterización molecular del plásmido recombinante pQHUPDI (C4).

Se indican los pesos moleculares (en pb) correspondientes al marcador de peso molecular (izquierda) y los fragmentos de digestión esperados (derecha). (1) *Bam* HI, 4899 pb; (2) *Bam* HI – *Hind* III, 3419 y 1480 pb; (3) *Bam* HI – *Cla* I, 4409 y 490 pb; (4) *Bam* HI – *Pst* I, 4507 y 392 pb; (5) *Pst* I, 4899 pb (6) *Cla* I, 4899 pb; y (7) *Xho* I, 3351, 1002 y 546 pb.

5.3. Análisis de expresión de la proteína HuPDI recombinante

Inicialmente, se realizó un ensayo de expresión a mini-escala para identificar la temperatura óptima. La expresión de la proteína HuPDI recombinante fue inducida con IPTG 1mM y a las temperaturas de 30 y 37 °C.

En la Figura 13 se observa la presencia de la proteína HuPDI recombinante la cual fue inducida en presencia de IPTG; donde es evidente un banda de aproximadamente 57 KDa, concordante con el tamaño esperado (56.61 KDa). Por otro lado, se pudo observar que la temperatura de 37 °C es ideal para la expresión de la proteína HuPDI recombinante, ya que (aparentemente) se observa mayor expresión que la observada a 30 °C.

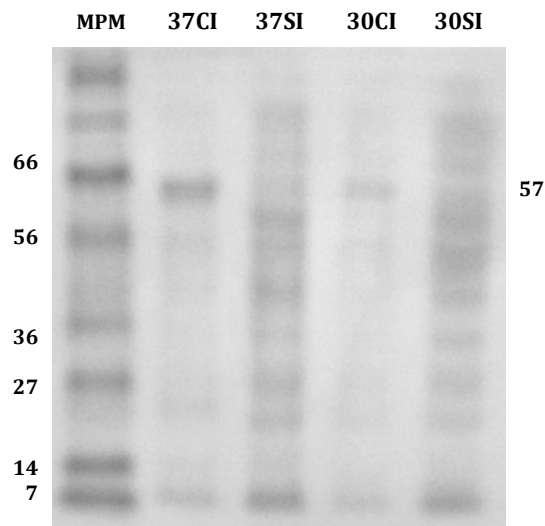


Figura 13. Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12.5%) de los lisados bacterianos totales de la clona C4, que porta el plásmido pQHUPDI, obtenidos en condiciones de inducción y temperatura diferentes.

Se indican los pesos moleculares (en KDa) correspondientes al marcador de peso molecular (izquierda) y la proteína recombinante esperada (derecha). En condiciones de inducción proteica (CI, 1 mM de IPTG) o sin inducción (SI), y a diferentes temperaturas de expresión proteica (37 o 30 °C).

Posteriormente, se realizó un análisis de solubilidad en condiciones nativas, usando las condiciones previamente establecidas (1 mM de inductor y 37 °C de temperatura). Los lisados bacterianos totales fueron obtenidos utilizando el reactivo comercial *CellLytic™* B y fracciones solubles e insolubles fueron separadas mediante centrifugación.

Como se puede observar en la Figura 14, la proteína HuPDI recombinante se expresa de manera totalmente soluble, ya que la banda de aproximadamente 57 KDa sólo se observó en las fracciones solubles (FS), sin evidencia aparente de ésta en las fracciones insolubles (FI).

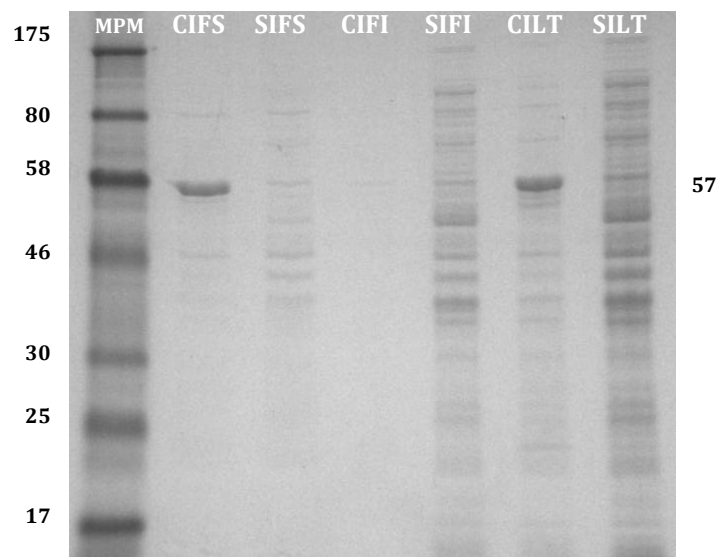


Figura 14. Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12.5%) de las fracciones bacterianas soluble, insoluble y total de la clona C4, que porta el plásmido pQHuPDI, obtenidas en ausencia y presencia de inductor.

Se indican los pesos moleculares (en KDa) correspondientes al marcador de peso molecular (izquierda) y la proteína recombinante esperada (derecha). Además, se señalan las fracciones solubles (FS), insoluble (FI) y lisado total (LT), en condiciones de inducción proteica (CI, 1 mM de IPTG) o sin inducción (SI).

5.4. Expresión a midi-escala y purificación de la proteína HuPDI recombinante

Para obtener suficiente cantidad de enzima para los análisis bioquímicos, la proteína HuPDI recombinante fue expresada en 5 lotes de 100 mL de cultivo. A partir de las pastillas celulares, se obtuvieron las fracciones solubles en condiciones nativas (usando el reactivo CellLytic™ B). Posteriormente, la proteína recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad, en niveles > 80% de pureza.

Como se observa en la Figura 15, las eluciones E1 y E2 presentaron mayor recuperación de proteína. A partir de éstas, se realizó una cromatografía de exclusión molecular, donde se logró una purificación > 95%. La concentración de proteína HuPDI recombinante calculada fue de 3.185 mg/mL (56.169 μ M), en un volumen final de 3.5 mL; dando un total de 11.148 mg de HuPDI recombinante purificada. En términos de expresión proteica, se logró obtener aproximadamente 22.3 mg de HuPDI recombinante por litro de cultivo, este resultado es comparable a los resultados obtenidos por otros investigadores, como Tojo *et al* quienes han expresado la PDI recombinante de humano en *Bacillus brevis*, donde obtienen 5 mg de HuPDI recombinante por litro de cultivo, la proteína fue secretada al medio de cultivo. Gilbert *et al* expreso la PDI recombinante de rata en citosol y obtuvo 20 mg de PDI por litro de cultivo, resultado muy similar al obtenido en este trabajo.

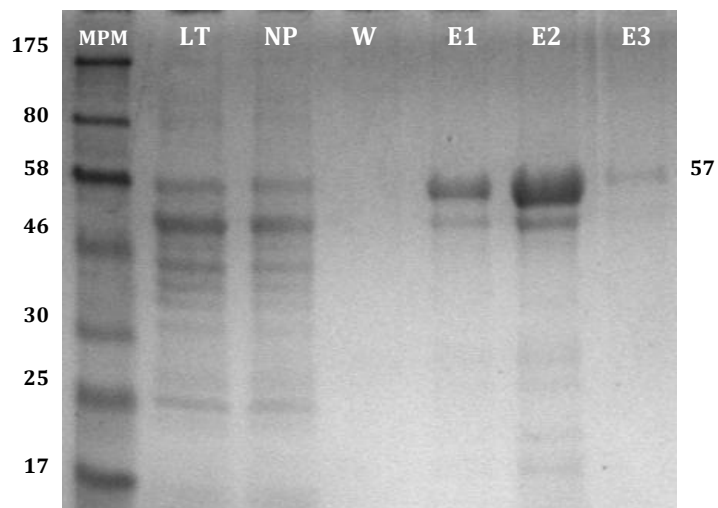


Figura 15. Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12.5%) de las fracciones colectadas durante la cromatografía de afinidad a níquel para purificar la proteína HuPDI recombinante.

Se indican los pesos moleculares (en KDa) correspondientes al marcador de peso molecular (izquierda) y la proteína recombinante esperada (derecha). Además, se señalan las fracciones lisado total (LT), no pegada (NP), lavado (W), y eluciones 1 – 3 (E1 – E3).

5.5. La proteína HuPDI recombinante exhibe actividad reductasa

La caracterización inicial de la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante se realizó mediante un micro-ensayo turbidimétrico donde se realizaron cinéticas de reducción insulina y de la actividad enzimática específica comparadas con la proteína EhPDI recombinante. .

La Tabla 3 y la Figura 16 muestra el análisis estadístico de los registros obtenidos y la representación gráfica del análisis comparativo, mediante un ajuste no lineal de pendiente variable, de la actividad reductasa de las proteínas recombinantes HuPDI y EhPDI. Como se

puede observar, la enzima HuPDI recombinante exhibe actividad reductasa; la cual es evidente a partir de los 10 min de reacción., La enzima EhPDI también exhibe actividad reductasa; y además se aprecia que , la ausencia de enzima reductiva ocasiona que la reducción química, asistida por DTT, sea más lenta.

Además se puede observar que el valor máximo de precipitación es menor para HuPDI, comparada con EhPDI. Esto puede ser atribuido a la función chaperona de HuPDI, la cual se puede presentar a altas

Tabla 3. Análisis de la actividad reductasa de la enzima HuPDI recombinante, comparada con la enzima EhPDI y la reducción no catalítica.

Tiempo (min)	A_{650}		
	Blanco	2.5 μ M EhPDI	4.0 μ M HuPDI
0	0.000 $\pm$ 0.000	0.002 $\pm$ 0.001	0.000 $\pm$ 0.000
10	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.002
20	0.000 $\pm$ 0.000	0.030 $\pm$ 0.003	0.039 $\pm$ 0.002
30	0.000 $\pm$ 0.000	0.068 $\pm$ 0.003	0.055 $\pm$ 0.002
40	0.000 $\pm$ 0.000	0.093 $\pm$ 0.002	0.059 $\pm$ 0.004
50	0.000 $\pm$ 0.000	0.099 $\pm$ 0.003	0.063 $\pm$ 0.001
60	0.000 $\pm$ 0.000	0.106 $\pm$ 0.002	0.064 $\pm$ 0.001
70	0.003 $\pm$ 0.000	0.107 $\pm$ 0.005	0.064 $\pm$ 0.002
80	0.010 $\pm$ 0.000	0.107 $\pm$ 0.004	0.064 $\pm$ 0.002
90	0.021 $\pm$ 0.000	0.110 $\pm$ 0.004	0.064 $\pm$ 0.002

Media y desviación estándar de los registros de dos experimentos independientes.

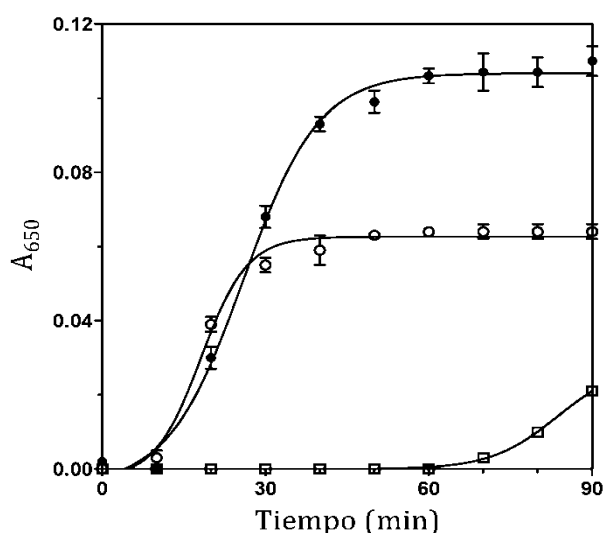


Figura 16. Actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante.

Cinética de reducción de 100 μ M de insulina catalizada por 4 μ M de HuPDI recombinante (○), comparada con 2.5 μ M de EhPDI recombinante (●), y carente de enzima (□) como controles.

concentraciones enzimáticas, evitando la formación de agregados de la insulina reducida. A pesar de esto, los resultados muestran que ambas enzimas, HuPDI y EhPDI, exhiben actividades específicas (AE) muy similares: 0.9 y 1.2 U A₆₅₀ min⁻¹ mM⁻¹, respectivamente.

5.6. La actividad reductasa es dependiente de la concentración de enzima

El primer parámetro que se determinó fue la concentración efectiva media (CE₅₀). Utilizando una concentración de insulina (sustrato) de 100 µM y un intervalo de concentración de 0 a 0.6 µM de la proteína HuPDI recombinante, se realizaron cinéticas de reducción y se determinó la velocidad inicial (V_o).

Tabla 4. Resultados de la cinética de reducción a diferentes concentraciones de enzima.

Tiempo (min)	HuPDI [µM]													
	0		0.1		0.2		0.3		0.4		0.5		0.6	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.001	0.002	0.001	0.003	0.001	0.003	0.003	0.001	0.006
20	-0.001	0.003	-0.002	0.001	0.002	0.002	-0.001	0.001	-0.002	0.001	0.002	0.004	-0.002	0.007
30	0.000	0.003	-0.002	0.001	0.004	0.004	0.003	0.001	0.004	0.001	0.013	0.002	0.016	0.013
40	0.001	0.004	-0.001	0.002	0.009	0.004	0.015	0.004	0.022	0.000	0.036	0.001	0.041	0.015
50	0.001	0.003	0.001	0.001	0.021	0.005	0.033	0.006	0.045	0.003	0.059	0.000	0.064	0.016
60	0.000	0.004	0.009	0.001	0.036	0.007	0.053	0.005	0.062	0.002	0.076	0.003	0.081	0.016
70	0.001	0.003	0.021	0.002	0.053	0.010	0.069	0.008	0.078	0.001	0.092	0.001	0.095	0.018
80	0.002	0.002	0.034	0.002	0.068	0.013	0.081	0.007	0.089	0.001	0.101	0.003	0.108	0.012
90	0.006	0.001	0.048	0.001	0.080	0.013	0.091	0.011	0.098	0.001	0.108	0.002	0.112	0.012

Media de la A₆₅₀ y desviación estándar (D.E.) de los registros de al menos cuatro experimentos independientes.

Las Tablas 4 y 5 muestran los resultados del análisis estadístico de los registros y las velocidades iniciales obtenidas, respectivamente. Por otro lado, la Figura 17 muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos del análisis estadístico comparativo, mediante un ajuste no lineal de pendiente variable, de la actividad reductasa obtenida a diferentes concentraciones de la proteína HuPDI recombinante.

Tabla 5. Resultados de la dependencia de la actividad reductasa a la concentración enzima.

HuPDI [μM]	$V_o \pm \text{D.E.}$ ($\Delta A_{650} \text{ min}^{-1}$)
0	0.0000 ± 0.0000
0.1	0.0007 ± 0.0001
0.2	0.0015 ± 0.0002
0.3	0.0018 ± 0.0001
0.4	0.0018 ± 0.0001
0.5	0.0019 ± 0.0001
0.6	0.0018 ± 0.0003

Media de la V_o y desviación estándar (D.E.) de al menos 4 experimentos independientes.

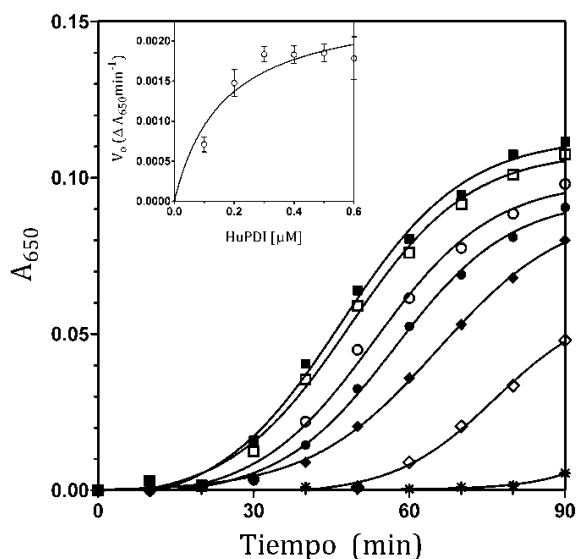


Figura 17. Dependencia de la actividad reductasa a la concentración de enzima.

Cinética de reducción de 100 μM de insulina catalizada por diferentes concentraciones (μM) de enzima HuPDI recombinante: 0 (*), 0.1 (◇), 0.2 (◆), 0.3 (●), 0.4 (○), 0.5 (□), y 0.6 (■). En el panel interno se muestra la curva dosis-respuesta de la actividad reductasa con respecto a la concentración de enzima.

Este análisis demuestra que, la actividad reductasa depende de la concentración de la enzima HuPDI recombinante.

Cabe mencionar que a concentraciones de la enzima de 0.8 μM o mayores, las actividades reductasa y chaperona se traslapan; por tal motivo, los parámetros de actividad reductasa se acotaron a concentraciones menores a 0.6 μM de HuPDI recombinante. Considerando lo anterior, se obtuvo el valor de CE_{50} de $0.164 \pm 0.067 \mu\text{M}$.

5.7. La actividad reductasa depende de la concentración del sustrato

Posteriormente, a partir de un análisis de la dependencia de la actividad reductasa con la concentración de sustrato, se determinaron los parámetros cinéticos enzimáticos: constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidad máxima (V_{max}) y constante catalítica (K_{cat}). Utilizando una concentración de la proteína HuPDI recombinante (enzima) de 0.3 μM y un intervalo de concentración de 0 a 200 μM de insulina, se realizaron cinéticas de reducción y se determinó la velocidad inicial (V_o).

La Tabla 6 y la Figura 18 muestran el análisis estadístico de los registros de A_{650} obtenidos y la representación gráfica del análisis comparativo (ajuste no lineal de pendiente variable), respectivamente, de la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante a diferentes concentraciones de sustrato.

Tabla 6. Resultados de la cinética de reducción a diferentes concentraciones de sustrato.

Tiempo (min)	Insulina [μM]											
	0		75		100		125		150		200	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.001	0.004	0.003	0.003	0.002	0.002	0.000	0.000	-0.002	0.006	0.003	0.006
20	0.003	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.000	0.000	0.001	0.006	0.003	0.005
30	0.005	0.004	0.006	0.004	0.005	0.004	0.002	0.002	0.002	0.007	0.004	0.006
40	0.003	0.006	0.013	0.007	0.012	0.010	0.017	0.006	0.012	0.015	0.019	0.011
50	0.000	0.004	0.024	0.002	0.024	0.012	0.038	0.007	0.034	0.012	0.039	0.011
60	0.001	0.004	0.038	0.003	0.041	0.021	0.061	0.008	0.061	0.017	0.072	0.017
70	0.001	0.004	0.050	0.006	0.056	0.028	0.078	0.005	0.087	0.017	0.104	0.017
80	0.001	0.004	0.060	0.010	0.071	0.035	0.094	0.006	0.113	0.022	0.131	0.026
90	0.002	0.005	0.069	0.014	0.085	0.044	0.105	0.005	0.141	0.037	0.161	0.036

Media de A_{650} y desviación estándar (D.E.) de los registros de al menos cuatro experimentos independientes.

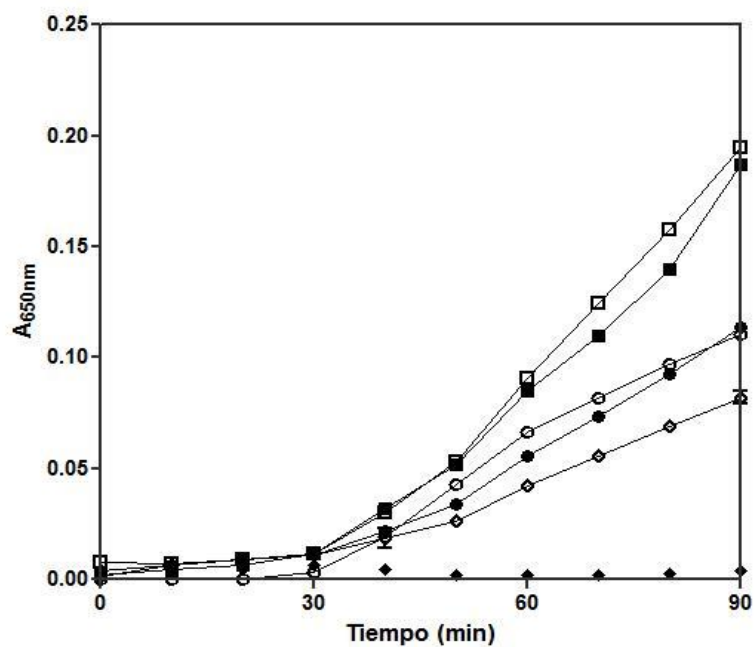


Figura 18. Dependencia de la actividad reductasa a la concentración de sustrato.

Cinética de reducción de de diferentes concentraciones de insulina (μM) catalizada por $0.3 \mu\text{M}$ enzima HuPDI recombinante: 0 (◆), 75 (◇), 100 (●), 125 (○), 150 (■), y 200 (□).

Como se puede observar, existe una clara dependencia de la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante con la concentración de insulina; es decir, la velocidad enzimática, en estado estacionario, es menor a bajas concentraciones de sustrato y aumenta conforme la concentración de éste aumenta; aunque, no se logro una completa saturación de la enzima, es de esperarse que la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante muestre un comportamiento enzimático tipo Michaelis-Menten (MM) (Figura 19, panel interno). Debido a la ausencia de saturación, los parámetros enzimáticos fueron determinados a partir de la ecuación de Lineweaver-Burk (doble recíproca).

La Tabla 7 muestra los valores obtenidos de velocidad inicial de la actividad reductasa a diferentes concentraciones de sustrato, y los valores recíprocos correspondientes.

Por otro lado, la Figura 19 muestra las representaciones gráficas de los valores ajustados, mediante mínimos cuadrados, a las ecuaciones de MM y Lineweaver-Burk. A partir de los datos obtenidos del ajuste Lineweaver-Burk, se determinó una K_m de 37.71 mM y una V_{max} de 0.65 UA₆₅₀ min⁻¹; además, se calculó un valor de K_{cat} aparente de 2,166.66 UA₆₅₀min⁻¹ mM⁻¹.

Tabla 7. Resultados de la dependencia de la actividad reductasa a la concentración sustrato.

Insulina [μM]	Vo (ΔA ₆₅₀ min ⁻¹)		1/[S]	1/Vo
	media	DE		
0	-0.00007	0.00004	-	-
75	0.00126	0.00012	0.01333	793.65080
100	0.00177	0.00013	0.01000	565.93100
125	0.00211	0.00014	0.00800	473.93370
150	0.00268	0.00018	0.00667	373.83180
200	0.00321	0.00022	0.00500	311.81790

Media y desviación estándar (D.E.) de al menos dos experimentos independientes. Además se muestran los valores recíprocos de la concentración de S y Vo.

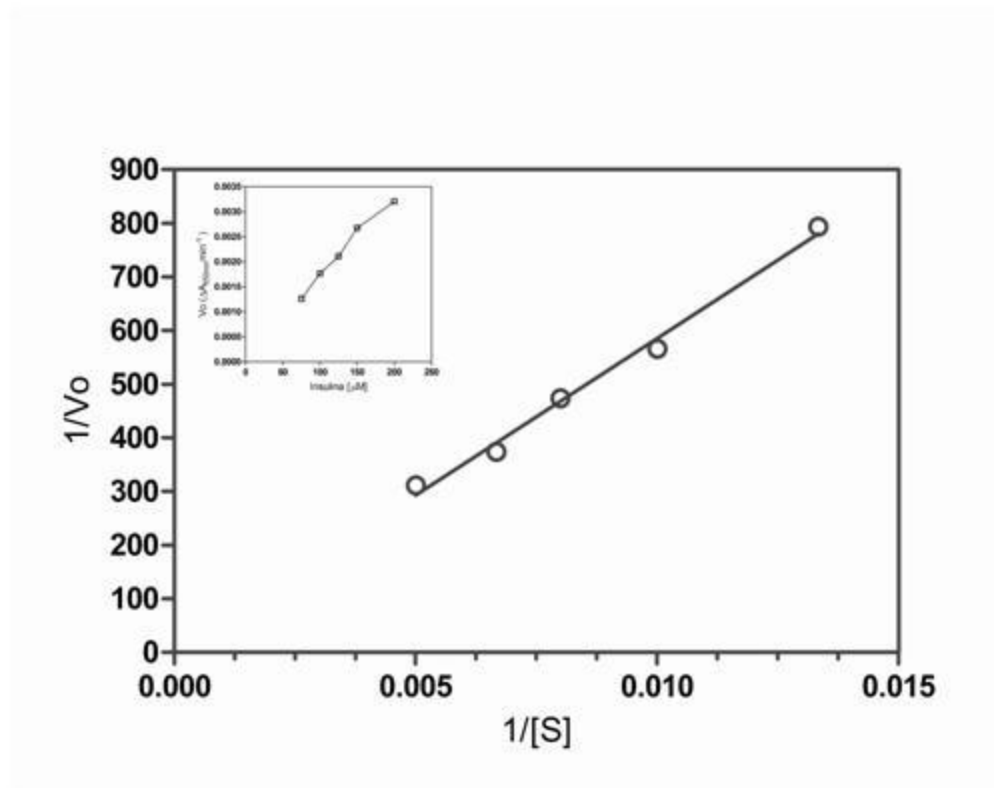


Figura 19. Ajuste Lineweaver-Burk y MM de la dependencia de la actividad reductasa a la concentración de sustrato.

Representación gráfica de Lineweaver-Burk (doble recíproco) de los valores de la actividad reductasa con respecto a la concentración de sustrato. El panel interno muestra la representación gráfica de Michaelis-Menten de los valores de actividad reductasa con respecto a la concentración de sustrato.

5.8. La actividad reductasa de HuPDI es dependiente del pH

El efecto del pH sobre la actividad reductasa de la enzima HuPDI recombinante se determinó mediante cinéticas de reducción de insulina a diferentes valores de pH (intervalo de 4 a 9), utilizando una solución amortiguadora universal.

La Tabla 8 y Figura 20 muestran los valores de V_o observados a diferentes valores de pH y su representación gráfica,. Este análisis demostró que la actividad reductasa de la enzima HuPDI es favorecida por valores de pH ligeramente ácidos (5.5 a 6.5) y se observa un máximo a pH 7.0, disminuyendo de manera drástica en valores superiores a pH 7.5. Aún más, se aprecia un valor relativo de actividad enzimática mayor al 70% en los valores de pH de 6.0 y 6.5. Cabe mencionar que la actividad enzimática es inhibida por valores de pH 5 o menores, ya que nunca se observó precipitación (en las condiciones experimentales) durante la cinética; por otro lado, los valores de pH 8.0 o mayores ocasionan precipitación inmediata de la insulina, impidiendo la valoración de la actividad enzimática.

Tabla 8. Resultados del efecto del pH sobre la actividad reductasa.

pH	$V_o (\Delta A_{650} \text{ min}^{-1})$
5.5	0.002015
6.0	0.002450
6.5	0.002970
7.0	0.003505
7.5	0.002225

Media de la V_o de al menos 4 experimentos independientes.

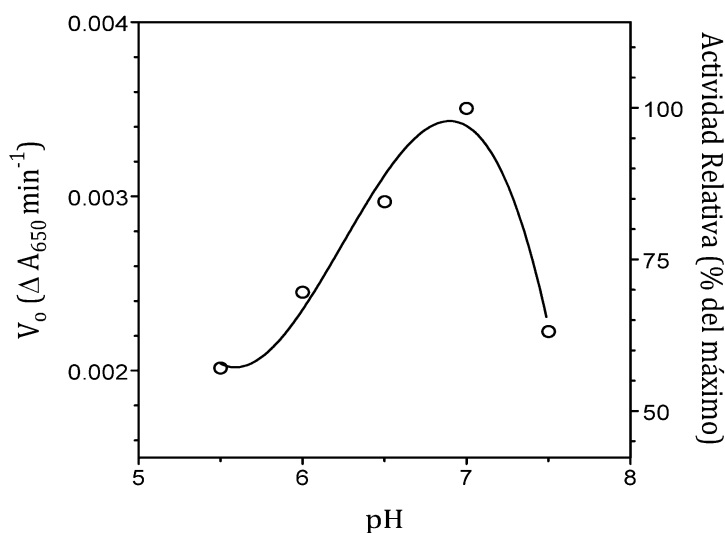


Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad reductasa. Representación gráfica de la actividad reductasa con respecto al valor de pH.

La actividad relativa representa el valor de actividad calculado con respecto al máximo observado.

5.9. La Bacitracina inhibe la actividad reductasa de HuPDI recombinante

El antibiótico bacitracina, obtenido de *Bacillus licheniformis*, es un polipéptido cíclico que inhibe la síntesis de peptidoglicano bacteriano, la actividad de la transglutaminasa de mamífero, y varias enzimas proteolíticas. Algunos estudios han demostrado que la bacitracina es un inhibidor efectivo de la reducción de insulina por enzimas PDI (Roth, 1981).

Inicialmente, se evaluó el efecto inhibidor de bacitracina sobre la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante. En la Tabla 9 y la Figura 21 muestran los resultados y la representación gráfica, respectivamente, del ensayo de inhibición con bacitracina. Como se puede observar, la presencia del inhibidor a una concentración de 500 μM ocasiona una disminución de aproximadamente 25% de la actividad reductasa de la proteína HuPDI, comparado con la observada en la ausencia del inhibidor, ya que se observó un desplazamiento en el tiempo que tomo para la reducción de la insulina, es decir en el aumento de la turbidez, estos resultados confirman lo consultado en la literatura, la bacitracina si inhibe la actividad de la PDI recombinante humana aunque no al 100%.

Tabla 9. Resultados del efecto de bacitracina sobre la actividad reductasa.

Tiempo (min)	Bacitracina (μM)	
	0	500
	$V_o \pm \text{D.E.}$	$V_o \pm \text{D.E.}$
0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
10	0.002 ± 0.004	-0.002 ± 0.002
20	0.001 ± 0.001	-0.002 ± 0.001
30	0.009 ± 0.003	0.000 ± 0.001
40	0.036 ± 0.003	0.005 ± 0.001
50	0.075 ± 0.005	0.024 ± 0.002
60	0.104 ± 0.003	0.050 ± 0.002
70	0.118 ± 0.001	0.076 ± 0.003
80	0.126 ± 0.006	0.101 ± 0.003
90	0.126 ± 0.005	0.116 ± 0.006

Media de la V_o ($\Delta A_{650} \text{ min}^{-1}$) y desviación estándar (D.E.) de 3 experimentos independientes.

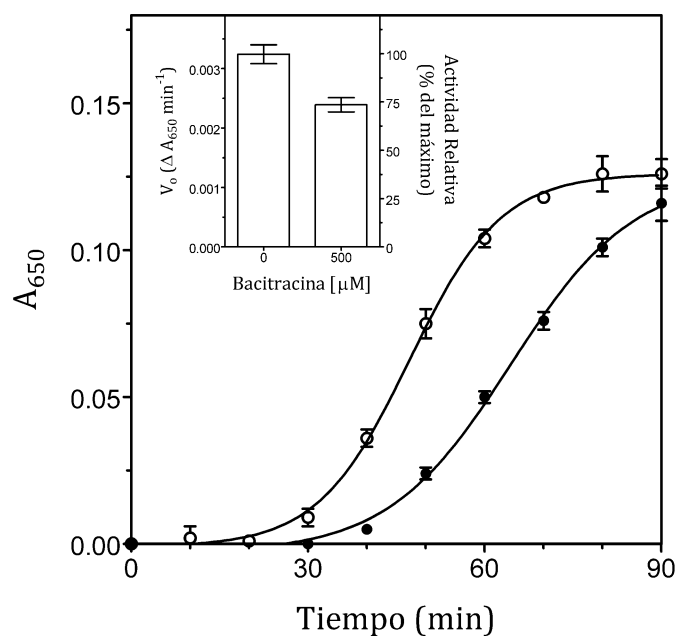


Figura 21. Efecto inhibitor de bacitracina sobre la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante.

Cinética de reducción de insulina catalizada por HuPDI recombinante en ausencia (○), o presencia de 500 μM bacitracina (●). El panel interno muestra la representación gráfica de la disminución de la velocidad enzimática en presencia de 500 μM de bacitracina.

A partir de este dato, se procedió a realizar ensayos de inhibición de la actividad reductasa de HuPDI a diferentes concentraciones de bacitracina y determinar algunas constantes de inhibición.

5.10. La actividad reductasa depende de la concentración del inhibidor

Posteriormente, a partir de un análisis del efecto de diferentes concentraciones de bacitracina sobre la actividad reductasa, se determinaron algunos parámetros de inhibición: concentración inhibitoria media (CI50) y constante de inhibición (K_i).

Utilizando una concentración de la proteína HuPDI recombinante (enzima) de 0.3 μM , una concentración de insulina (sustrato) de 0.1 mM y un rango de concentración de 0 a 2.501 mM de bacitracina (inhibidor), se realizaron cinéticas de reducción y se determinó la velocidad inicial (V_o).

La Tabla 10 y la Figura 22 muestran el análisis estadístico de los registros obtenidos y la representación gráfica del análisis comparativo, respectivamente, de la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante obtenida a diferentes concentraciones de bacitracina.

Como se puede observar, existe un claro efecto de la concentración de bacitracina sobre la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante; es decir, la velocidad enzimática, en estado estacionario, disminuye conforme aumenta la concentración del inhibidor.

Tabla 10. Efecto de la concentración del inhibidor bacitracina sobre la velocidad de reacción.

Bacitracina [mM]	V_o ($\Delta A_{650} \text{ min}^{-1}$)
0.000	0.0023
0.270	0.0025
0.609	0.0019
1.014	0.0013
1.487	0.0002
2.501	0.0001

Media de la V_o ($\Delta A_{650} \text{ min}^{-1}$) de 3 experimentos independientes.

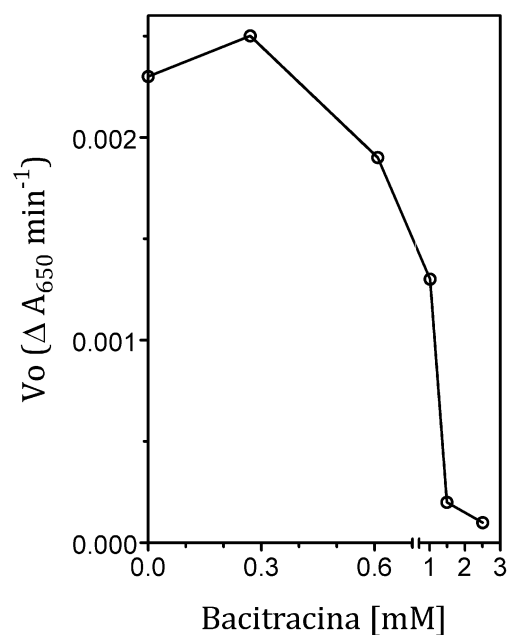


Figura 22. Efecto de la concentración de bacitracina sobre la actividad reductasa de la proteína HuPDI recombinante.

Representación gráfica del efecto de la concentración de inhibidor sobre la actividad enzimática (dosis-dependiente).

Finalmente, a partir de los datos obtenidos del ajuste no lineal de pendiente variable, se determinó una IC_{50} de 1.002 mM y una K_i de 0.941 mM (0.99 mM). Este resultado es comparable al obtenido por Mouray *et al* quienes obtuvieron una IC_{50} de 1mM con la PDI de *Plasmodium falciparum*.

6. CONCLUSIONES

Mediante el plásmido de expresión citosólica bacteriano pQHuPDI, el cual contiene la secuencia codificante para el péptido maduro de la PDI de humano, se logró expresar y purificar la proteína recombinante activa en niveles de pureza > 95%.

La enzima HuPDI recombinante purificada exhibe actividad reductasa *in vitro*; el comportamiento *in vitro* de la HuPDI recombinante en los ensayos de reducción de insulina confirman que ésta es catalíticamente activa ya que aumentó la velocidad de reducción del sustrato. Se determinó una K_m de 37.71 mM y una V_{max} de 0.65 U A₆₅₀ min⁻¹; así como un valor de K_{cat} aparente de 2,166.66 U A₆₅₀min⁻¹ mM⁻¹. Además el pH óptimo para la actividad reductasa de la HuPDI recombinante es de 7, no obstante, muestra actividad reductasa en un intervalo de pH que va de 5.5 hasta 7.5.

La actividad reductasa de HuPDI recombinante puede ser inhibida por el antibiótico bacitracina, aunque no al 100%. Las concentraciones inhibitoras se encuentran en el orden milimolar (mM). Se determinó una CI_{50} de 1.002 mM y una K_i de 0.99 mM.

7. REFERENCIAS

- Abell BA, Brown DT. Sindbis virus membrane fusion is mediated by reduction of glycoprotein disulfide bridges of the cell surface. *J Virol.* 1993; 67(9): 5496-501.
- Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 5th edition. Garland Science. 2008.
- Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 1973; 181: 223-30.
- Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L. The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1783(4): 535-48.
- Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep.* 2006; 7(3): 271-5.
- Christis C, Lubsen NH, Braakman I. Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *FEBS J.* 2008; 275(19): 4700-27.
- Dinner AR, Sali A, Smith LJ, Dobson CM, Karplus M. Understanding protein folding via free energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25: 331-9.
- Dobson CM. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001; 356(1406): 133-45.
- Esposito D, Chatterjee DK. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr Opin Biotechnol.* 2006; 17: 353-358.
- Ellis DA. A New Universal Buffer System. *Nature.* 1961; 191: 1099-100.

- Harper JD, Lansbury PT Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem.* 1997; 66:385-407.
- Hatahet F, Ruddock LW. Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. *FEBS J.* 2007; 274(20): 5223-34.
- Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem.* 1979; 254: 9627-32.
- Karplus M. The Levinthal paradox: yesterday and today. *Fold Des.* 1997; 2: S69-75.
- Kersteen EA, Barrows SR, Raines RT. Catalysis of protein disulfide bond isomerization in a homogeneous substrate. *Biochemistry.* 2005; 44(36): 1268-78.
- Kim PS, Kwon OY, Arvan P. An endoplasmic reticulum storage disease causing congenital goiter with hypothyroidism. *J Cell Biol.* 1996; 133: 517-27.
- Kostova Z, Wolf DH. For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin proteasome connection. *The EMBO Journal.* 2003; 22(10): 2309-17.
- Lahav J, Jurk K, Hess O, Barnes MJ, Farndale RW, Luboshitz J, Kehrel BE. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood.* 2002; 100(7): 2472-8.
- Mandel R, Ryser HJ, Ghani F, Wu M, Peak D. Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(9): 4112-6.

- Marquardt T, Herbert DN, Helenius A. Post-translational folding of influenza hemagglutinin in isolated endoplasmic reticulum derived microsomes. *J Biol Chem.* 1993; 268(26): 19618-25.
- Mezghrani A, Courageot J, Mani JC, Pugniere M, Bastiani P, Miquelis R. Protein-disulfide Isomerase (PDI) in FRTL5 Cells. *J Biol Chem* 2000; 275(3): 1920-9.
- Mouray E, Moutiez M, Girault S, Sergheeraert C, Florent I, Grellier P. Biochemical properties and cellular localization of *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase. *Biochimie.* 2007; 89(3):337-346.
- Nørgaard P, Westphal V, Tachibana C, Alsøe L, Holst B, Winther JR. Functional differences in yeast protein disulfide isomerases. *J Cell Biol.* 2001; 152(3): 553-62.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Farmacología*, 6ta edición. Elsevier. 2008.
- Roth RA. Bacitracin: an inhibitor of the insulin degrading activity of glutathione-insulin transhydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;98(2): 431-8.
- Ryser HJ, Levy EM, Mandel R, DiSciullo GJ. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(10): 4559-63.
- Sambrook J, Fritsch EF, Manniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1999.
- Schwaller M, Wilkinson B, Gilbert HF. Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerization by protein-disulfide isomerase. *J Biol Chem* 2003; 278(9):7154-9.
- Tojo H, Asano T, Kato K, Udaka S, Horiuchi R, Kakinuma A. Production of human protein disulfide isomerase by *Bacillus brevis*. *J Biotechnol.* 1994; 15; 33(1):55-62.

- Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol.* 2002; 193(2): 154-63.
- Vuori K, Pihlajaniemi T, Marttila M, Kivirikko KI. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylase tetramer and its multifunctional protein disulfide isomerase subunit synthesized in a baculovirus expression system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:7467-7470.
- Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1699(1-2): 35-44.
- Zapun A, Jakob CA, Thomas DY, Bergeron JJ. Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure.* 1999; 7(8): R173-82.
- Zheng J, Gilbert HF. Discrimination between native and non-native disulfides by protein-disulfide isomerase. *J Biol Chem.* 2001; 276(19): 15747-52.