



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

**Aislamiento e identificación de heptapéptidos que
reconocen a la proteína PDIA1/P4HB de humano**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A

Ramón Castellanos Martínez

Tijuana, B. C.

Noviembre de 2014.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 232

Tijuana, B. C., a 1 de octubre de 2014.

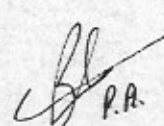
C. Ramón Castellanos Martínez
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

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 es responsables de la calidad del trabajo que usted presenta, referido al tema: **"Aislamiento e identificación de heptapéptidos que reconocen a la proteína PDIA1/P4HB de humano"**, el cual deberá desarrollar de acuerdo con el siguiente orden:

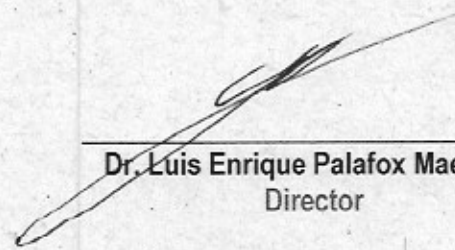
- I. Introducción
- II. Objetivos y Meta
- III. Materiales y Métodos
- IV. Resultados y Discusión
- V. Conclusiones
- VI. Bibliografía



Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Director de Tesis



Q. Noemí Hernández Hernández
Subdirectora



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA

Agradecimientos

*A **Dios**, por la vida, la salud, por todas las bendiciones con las que siempre me llena y por poner en mí una mente y un corazón apasionados por el conocimiento.*

*A mis Padres, **Ramón y Olivia** por todo su amor y apoyo incondicional, por ayudarme a convertirme en quien soy ahora, y por siempre motivarme a seguir mis sueños y nunca darme por vencido. Los amo.*

*A mi familia **Castellanos** y a mi familia **Martínez**, por todo el amor que me han dado y por siempre creer en mí.*

*A mis amigos, **David, Perla, Marilyn, Verónica A, Miguel, Fernando, Iván, Pedro, Verónica S, Iliana, Jesús, Alejandra, Francisco**, por su amistad sincera, por estar ahí siempre para mí, y hacer mi vida más feliz con su presencia y alentarme en mis proyectos y por todo su apoyo y amor.*

*A mis amigas, **Tania, Mayra, Brenda, Rubí, Kary, Karla**, por todos los momentos inolvidables que pasamos, y sé, pasaremos, por su amistad, confianza y por incluirme en sus vidas.*

*A mi director de tesis, **Dr. Marco Ramos**, por su entrega, por aceptarme como parte del equipo del laboratorio de Biotecnología, por todas sus enseñanzas, por ayudarme a ser un mejor estudiante y un mejor ser humano, y por siempre alentarme a aprender.*

*A mis amigos y colegas de la **Generación XVII de Químicos Farmacobiólogos de la UABC**, por los buenos momentos que pasamos, y porque sin duda, me hicieron ser una mejor persona y un mejor químico.*

*A mis maestros **José Núñez, Guillermina González, Julia Kondratiev, Luis Alcántara, Carmen Jáuregui, Evangelina Herrán, Lilia Hurtado**, por todos sus consejos, por darme las herramientas necesarias para enfrentarme a los retos que la vida me pone y por contribuir en el desarrollo de mi formación profesional.*

*A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología, **Laura, Izamar, Miguel, Pablo, Karla, Susana, Sealtiel, David**, por todos los momentos compartidos y por todo lo que aprendí de ustedes.*

*A mis sinodales, **Dr. Samuel Meléndez, Dra. Rosa Mares, M.C. Lilian Muñoz, QFB. Alexis Minchaca**, por su dedicación al impulsar mi formación profesional, y por formar parte de este trabajo, enriqueciéndolo con sus acertadas sugerencias.*

A todos los que me acompañaron durante esta etapa y de alguna u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo, mil gracias, no terminaría de nombrarlos.

*A **UABC**, mi alma mater, por cada experiencia vivida. Cimarrón mi corazón.*

El presente trabajo de investigación fue realizado en el
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
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 del
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
Proyecto 155714, Fondo Sectorial SEP-CONACYT 2010 para Ciencia Básica
Proyecto 161544, Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT para Salud

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Plegamiento de proteínas en eucariota	11
1.1.1. Termodinámica del plegamiento.....	11
1.1.2. Compartimentalización del plegamiento.....	12
1.1.3. Chaperonas y chaperoninas.....	13
1.1.4. Enzimas del plegamiento	15
1.1.5. Modificaciones post-traduccionales.....	16
1.1.6. Mecanismo de respuesta a proteínas no plegadas (UPR).....	18
1.1.7. Mecanismo de degradación asociado al retículo endoplásmico (ERAD)	19
1.2. PDI como modelo de proteína del plegamiento.....	20
1.2.1. Familia de proteínas PDI de humano	20
1.2.2. Proteína PDIA1/P4HB	20
1.2.3. Funciones como oxidorreductasa.....	22
1.2.4. Funciones como chaperona molecular	22
1.2.5. Otras funciones	22
1.3. PDI/P4HB como blanco terapéutico	23
1.3.1. Asociación de PDI con patologías en humanos	23
1.3.1.1. Infecciones virales, bacterianas y parasitarias	23
1.3.1.2. Cáncer y otras enfermedades proliferativas	24
1.3.1.3. Enfermedades neurodegenerativas.....	25
1.3.1.4. Enfermedades metabólicas.....	25
1.3.1.5. Enfermedades cardiovasculares	26
1.3.2. PDI/P4HB como blanco farmacológico.....	26
1.3.3. Moduladores e inhibidores de la función de la PDIA1/P4HB de humano.....	26
1.4. Identificación de moduladores e inhibidores de PDIA1/P4HB.....	27
1.5. Despliegue de péptidos en bacteriófagos como estrategia para identificar moduladores o inhibidores de la PDIA1/P4HB de humano.....	27
2. OBJETIVOS Y META.....	29
2.1. Objetivo General.....	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29
2.3. Meta	29

3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. Reactivos químicos y biológicos.....	30
3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos	30
3.1.2. Células y medios de cultivo	31
3.1.3. Biblioteca de heptapéptidos desplegados en la superficie de bacteriófagos	31
3.1.4. Estuches comerciales	31
3.1.5. Equipos y software.....	31
3.2. Protocolos generales	32
3.2.1. Cuantificación de proteínas por el método Bradford	32
3.2.2. Preparación de cultivo joven de la cepa ER2738 de E. coli.....	32
3.2.3. Infección y titulación de bacteriófagos	32
3.2.4. Purificación de ADNcs	33
3.2.5. Electroforesis en gel de agarosa.....	34
3.3. Tamizado de la biblioteca <i>Ph.D.</i>TM-7.....	34
3.3.1. Reconocimiento inicial mediante biopanning.....	34
3.3.2. Amplificación y concentración	35
3.3.3. Rondas de selección mediante biopanning	36
3.4. Aislamiento, selección, y amplificación de UFP independientes	36
3.5. Secuenciación de ADN y ensayos de <i>ELISA</i>	37
3.5.1. Secuenciación de ADN	37
3.5.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA) semi-cuantitativo indirecto.....	37
3.5.3. Inmunoensayo enzimático (ELISA) cuantitativo indirecto.....	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	40
4.1. Selección de bacteriófagos que despliegan un heptapéptido que se une a HuPDI.....	40
4.2. Secuencia de los heptapéptidos que se unen a HuPDI.....	41
4.3. Análisis preliminar de los heptapéptidos con potencial de unión a HuPDI	41
4.4. Análisis cuantitativo de los heptapéptidos con potencial de unión a HuPDI	43
4.5. HuPDI73, HuPDI04, HuPDI51, y HuPDI44 despliegan heptapéptidos con potencial de unión a HuPDI.....	45
5. CONCLUSIONES.....	47
6. REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plegamiento de proteínas [Berg, 2002].	11
Figura 2. Efecto hidrofóbico [Berg, 2002].	12
Figura 3. Plegamiento de proteínas asistido por chaperonas [Lodish, 2000].	14
Figura 4. Representación gráfica de algunas de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas [Sadava, 2009].	16
Figura 5. Mecanismo UPR en levaduras [Alberts, 2012].	18
Figura 6. Mecanismo ERAD.	19
Figura 7. Representación esquemática de la organización de dominios de las 21 proteínas de la familia PDI de humano [Gilligan, 2012].	21
Figura 8. Organización de los dominios de PDI [Wilkinson, 2004].	22
Figura 9. Análisis preliminar de los heptapéptidos con potencial de unión a HuPDI.	43
Figura 10. Representación gráfica de la unión de los bacteriófagos a HuPDI (representada por A_{450}) con respecto a su título (UFP/mL).	44
Figura 11. Análisis de la <i>Razón de Reconocimiento</i> de los bacteriófagos que despliegan heptapéptidos de unión a HuPDI.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Lista de reactivos químicos y bioquímicos utilizados.	30
Tabla II. Características de las rondas de <i>biopanning</i> y selección de UFP que se unen a HuPDI.	37
Tabla III. Rondas de aislamiento y selección de bacteriófagos que despliegan heptapéptidos que reconocen a HuPDI.	41
Tabla IV. Secuencias polipeptídicas deducidas de las UFP seleccionadas.	42
Tabla V. Parámetros del reconocimiento de las UFP seleccionadas contra HuPDI.	45
Tabla VI. Secuencias con potencial de unión a HuPDI.	46

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNcs	ADN de cadena sencilla
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin-trifosfato
BSA	Del inglés <i>Bovine serum albumin</i>
C-terminal	Carbono terminal
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ERAD	Del inglés <i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
ERSE	Del inglés <i>ER response stress elements</i>
HCl	Ácido clorhídrico
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HRP	Peroxidasa de rábano picante
Hsp70	Del inglés <i>Heat Shock Protein 70</i>
HuPDI	Proteína disulfuro isomerasa de humano
IC ₅₀	Concentración media inhibitoria
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
k	Constante de afinidad
K _D	Constante de disociación
K _i	Constante de inhibición
kDa	Kilodalton(s)
LB	Luria-bertani
μL, mL	Microlitro, mililitro
μM, mM, M	Micromolar, milimolar, Molar
N-terminal	Amino terminal
NaCl	Cloruro de sodio
ng, μg, mg	Nanogramos, microgramos, miligramos
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxígeno molecular
p. ej.	Por ejemplo
PACMA	Del inglés <i>propyonic acid carbamoyl methyl amide</i>

PBS	Buffer salino-fosfato
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PEG-8000	Polietilenglicol 8000
pH	Potencial de hidrógeno
PPIasa	Prolil peptidil <i>cis-trans</i> isomerasas
PTM	Del inglés <i>post-translational modifications</i>
P4HB	Subunidad beta de la prolil-4-hidroxilasa
RE	Retículo endoplásmico
RNS	Del inglés <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	Del inglés <i>reactive oxygen species</i>
RPM	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
SNO-PDI	PDI S-nitrosilada
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBS	Buffer tris-salino
TBST	Buffer tris-salino con Tween 20
TRX	Tiorredoxina
UFP	Unidad formadora de placa
UPR	Del inglés <i>Unfolded protein response</i>
V	Volts
°C	Grados centígrados

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Plegamiento de proteínas en eucariota

1.1.1. Termodinámica del plegamiento

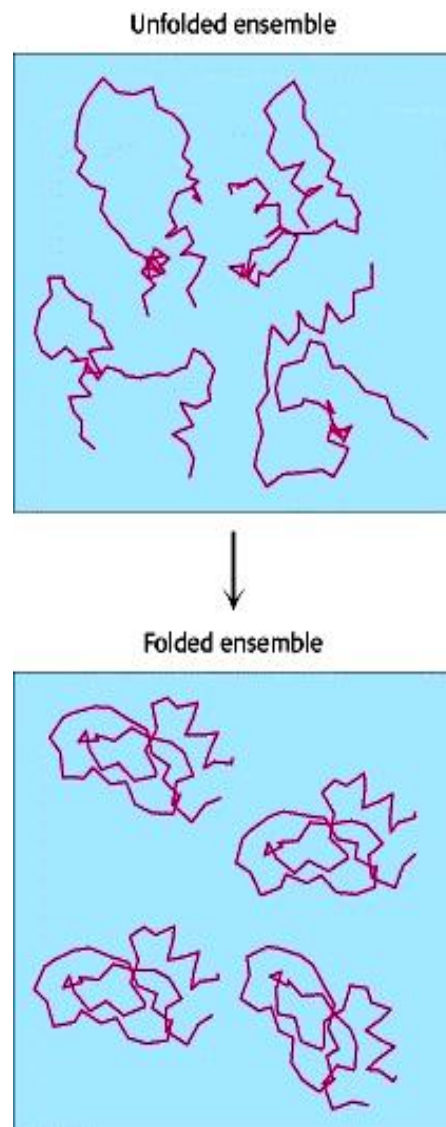
El problema del plegamiento de proteínas ilustra la utilidad del concepto de energía libre. Considere este sistema (Figura 1): las moléculas de una proteína no plegada en una solución acuosa pueden adoptar una conformación única diferente, favoreciendo un sistema bastante desordenado y una entropía relativamente alta. A pesar de esto, el plegamiento correcto de las proteínas ocurre de manera espontánea bajo condiciones apropiadas [Berg, 2002].

Las moléculas de proteínas en solución acuosa interactúan con las moléculas de agua a través de interacciones iónicas y puentes de hidrógeno. Sin embargo, algunas moléculas con características *no polares* no pueden participar en esas interacciones [Berg, 2002].

Las moléculas de agua que están en contacto con las superficies de las moléculas *no polares* forman “capsulas” alrededor de ellas, volviéndose más ordenadas. Cuando dos moléculas *no polares* se acercan, algunas moléculas de agua son liberadas; por lo tanto, las moléculas *no polares* tienden a agregarse, debido a la entropía del agua. Este fenómeno, es conocido como *efecto hidrofóbico* (Figura 2) [Berg, 2002].

Figura 1. Plegamiento de proteínas [Berg, 2002].

Este proceso conlleva la transición de una mezcla desordenada de proteínas no plegadas a una solución relativamente uniforme de proteínas plegadas. *Unfolded ensemble*: conformación no plegada. *Folded ensemble*: conformación plegada.



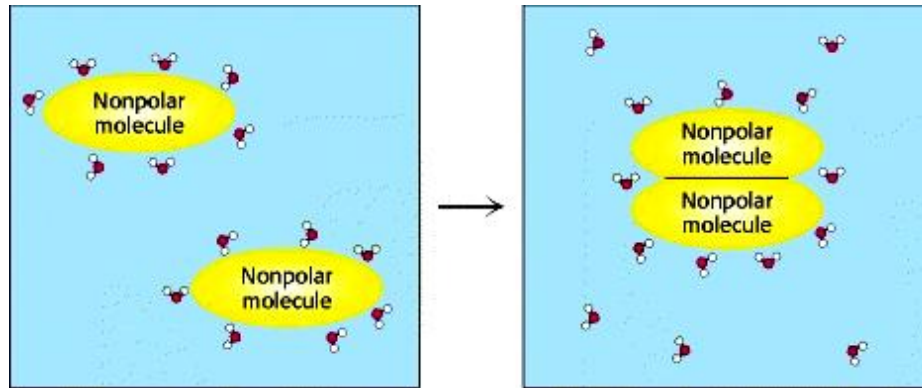


Figura 2. Efecto hidrofóbico [Berg, 2002].

La agregación de grupos no polares en el agua lleva a un incremento en la entropía debido a la liberación de moléculas de agua en el medio. *Nonpolar molecule*: molécula no polar.

Algunos aminoácidos que componen a las proteínas contienen grupos no polares (*hidrofóbicos*), los cuales tienen una fuerte tendencia a asociarse con otros no polares (en el interior de la proteína plegada). La elevada entropía resultante de la interacción de estos aminoácidos hidrofóbicos ayuda a compensar la pérdida de entropía inherente al proceso de plegamiento. Además, las *interacciones hidrofóbicas* no son la única manera de estabilizar la estructura de una proteína [Berg, 2002].

Muchos enlaces débiles, incluidos los puentes de hidrógeno y las interacciones de *Van der Waals*, se forman durante el proceso de plegamiento y, en consecuencia, se libera energía calorífica. De esta manera, el plegamiento puede ocurrir cuando la diferencia entre los cambios de entropía (asociada al *efecto hidrofóbico*) y entalpía (asociada a puentes de hidrógeno y fuerzas de *Van der Waals*) hacen negativa la energía libre de todo el proceso [Berg, 2002].

1.1.2. Compartimentalización del plegamiento

El interior celular es altamente anisotrópico, con arquitecturas elaboradas y fisiológicamente críticas. Esta organización subcelular juega un papel importante en el plegamiento en varios niveles; *p. ej.*, las estructuras nativas de las proteínas de membrana están sintonizadas con los diversos microambientes y el carácter bidimensional de las membranas [Gershenson, 2010].

Para proteínas secretoras, por otro lado, el paso a través de compartimientos está altamente coordinado con la acción de enzimas modificadoras, chaperonas, y otros mecanismos de transporte. Además, la compartimentalización abre la posibilidad de gradientes químicos; *p. ej.*, pH o redox. En conjunto, la compartimentalización y la organización espacial del ambiente celular permiten que el plegamiento ocurra en pasos optimizados temporalmente [Gershenson, 2010].

Una de las funciones principales del retículo endoplásmico (RE) es la síntesis de proteínas dirigidas a la vía de secreción. En el RE, las proteínas sintetizadas adquieren su conformación nativa seguida de modificaciones post-traduccionales, tales como la N-glicosilación y la formación de puentes disulfuro. Con el fin de exportar sólo proteínas correctamente plegadas, el RE alberga una variedad de chaperonas que facilitan el plegamiento. Además, posee un sistema de control de calidad, el cual asegura que las proteínas no plegadas sean retenidas o dirigidas a la degradación (en caso de no lograr su plegamiento correcto) [Bravo, 2013]. Adicionalmente, las mitocondrias constituyen un importante compartimiento intracelular independiente, separado con una doble membrana, y se caracterizan por contener su propio sistema de control de calidad de proteínas [Bender, 2011].

1.1.3. Chaperonas y chaperoninas

El plegamiento correcto de proteínas *in vivo* debe ocurrir rápidamente; de otra manera, las células gastarían mucha energía en la síntesis de proteínas no funcionales y en la degradación de proteínas mal plegadas o no plegadas. Más del 95% de las proteínas presentes dentro de las células se encuentran en su forma nativa, a pesar de la alta concentración de proteínas (± 100 mg/mL), que usualmente causa la precipitación de proteínas *in vitro* [Lodish, 2000].

La explicación para la alta eficiencia del plegamiento de proteínas *in vivo* recae en función de las chaperonas (familia de proteínas altamente conservadas en la escala evolutiva). Las chaperonas están localizadas en cada compartimento celular, unidas a una gran variedad de proteínas. Existen dos sub-familias generales de chaperonas: *chaperonas moleculares*, las cuales se unen y estabilizan a proteínas no plegadas o

parcialmente plegadas, previniendo su degradación temprana; y *chaperoninas*, las cuales facilitan directamente su plegamiento. Las chaperonas tienen actividad ATPasa, y su habilidad para unirse y estabilizar proteínas es específica y dependiente de la hidrólisis de ATP. La unión de chaperonas a proteínas parcialmente plegadas sugiere que el proceso del plegamiento puede ser regulado por pasos intermedios [Lodish, 2000].

Uno de los sub-grupos de chaperonas moleculares más estudiado son las proteínas *Hsp70*, el cual incluye a las *Hsp70* citosólica y mitocondrial, a la *Bip* del RE, y a la *DnaK* bacteriana. La *Hsp70* citosólica, identificada por su rápida aparición después de que la célula ha sido sometida a un estrés calórico, es la chaperona con mayor actividad en todos los organismos [Lodish, 2000]. Cuando se une a ATP, la *Hsp70* asume una conformación abierta en la cual expone una región hidrofóbica transitoria que se une a regiones hidrofóbicas expuestas de proteínas no plegadas (Figura 3). La hidrólisis de ATP ocasiona que la *Hsp70* adquiera su conformación cerrada, liberando la proteína plegada [Lodish, 2000]. Se piensa que las chaperonas moleculares se unen a todas las cadenas polipeptídicas nacientes mientras están siendo sintetizadas por los ribosomas. En

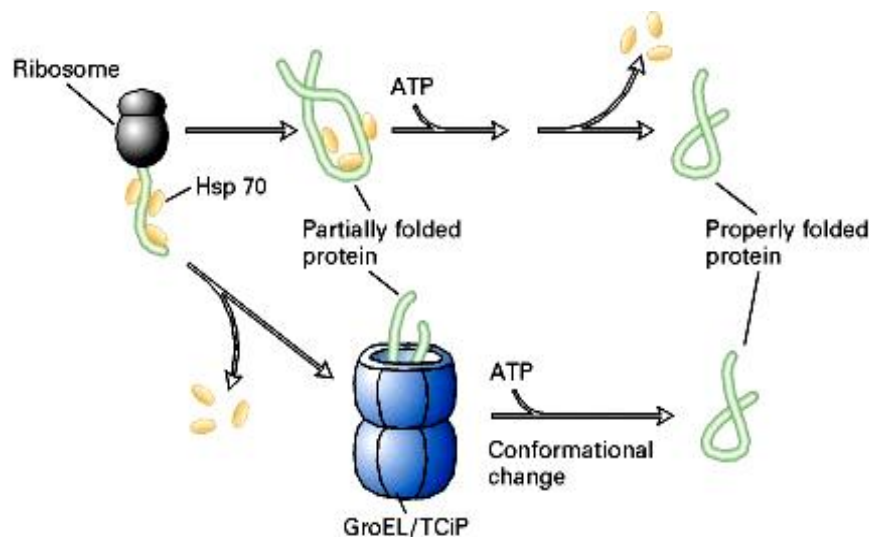


Figura 3. Plegamiento de proteínas asistido por chaperonas [Lodish, 2000].

Partially folded protein: proteína parcialmente plegada. *Properly folded protein*: proteína correctamente plegada. *Conformational change*: cambio conformacional.

bacterias, el 85% de las proteínas son liberadas de su chaperona plegadas correctamente; incluso, un porcentaje superior de proteínas eucarióticas sigue esta vía [Lodish, 2000].

Las chaperoninas eucarióticas, llamadas *TCiP*, son grandes complejos multiméricos, en forma de barril, compuestos por 8 unidades de *Hsp60*. Las homólogas bacterianas, conocidas como *GroEL*, contienen 14 subunidades idénticas. El mecanismo de plegamiento asistido por *GroEL* ha sido utilizado como un modelo general (Figura 2). En bacterias, un polipéptido mal plegado o parcialmente plegado es insertado en la cavidad de *GroEL*, donde se une a la pared interior y adquiere su conformación nativa. En un paso dependiente de ATP, *GroEL* se expande y la proteína correctamente plegada sale de *GroEL*, un proceso asistido por una co-chaperonina, *GroES*, la cual tapa los extremos de *GroEL*. Debido a que la chaperonina eucariótica *TCiP* no requiere de una co-chaperonina, el último paso difiere en las eucariotas. Además, el tamaño de la cavidad en *TCiP* limita el plegamiento a polipéptidos menores a 55 kDa [Lodish, 2000].

1.1.4. Enzimas del plegamiento

En el RE, existen varias chaperonas y enzimas del plegamiento que se asocian con los polipéptidos recién sintetizados para asistir al correcto plegamiento y ensamblaje. La *calnexina*, una proteína integral del RE, se une transitoriamente a proteínas monoglicosiladas recién sintetizadas y a glicoproteínas mal plegadas, promoviendo su plegamiento y oligomerización [Coe, 2008]. La proteína es parte del sistema de control de calidad del RE, conocido como ciclo de la calnexina [Powers-Fletcher, 2001].

La *calreticulina*, una proteína conservada a través de la escala evolutiva, realiza una variedad de funciones dentro de la célula. Aunque se localiza principalmente en el RE, también puede ubicarse en la superficie celular. En el lumen del RE, la *calreticulina* funciona como una chaperona molecular para asegurar el correcto plegamiento de glicoproteínas [Alur, 2009].

A menudo ignorada, pero crucial para el plegamiento de proteínas, es la actividad de las prolil peptidil *cis-trans* isomerasas (PPIasa). Durante la biosíntesis de proteínas, los residuos de prolina son incorporados por el ribosoma en la conformación *trans*. Por lo

tanto, todas las proteínas con las prolinas *cis* en estado nativo, experimentan una isomerización *trans* $\rightarrow$ *cis* por acción de una PPIasa [Braakman, 2013].

La isomerización opuesta (*cis* $\rightarrow$ *trans*) de prolinas es una reacción intrínsecamente lenta que depende de la naturaleza del aminoácido, esto determina la velocidad de muchas reacciones de plegamiento. La mayoría de las PPIasas que asisten el plegamiento de proteínas contienen dominios catalíticos que son homólogos a la *FKBP12* humana y dominios de chaperona, los cuales interactúan transitoriamente con las proteínas no plegadas [Jakob, 2009].

1.1.5. Modificaciones post-traduccionales

Las modificaciones *post*-traduccionales, o *PTM* (por sus siglas en inglés, *post-translational modifications*), son consideradas factores determinantes con respecto a la complejidad de los organismos [Venter, 2001]. A la fecha, se han identificado más de 200 *PTM*, de las cuales sólo unas cuantas son reversibles e importantes para la regulación de procesos biológicos (Figura 4) [Delom, 2006].

Una de las *PTM* más estudiadas es la *fosforilación* de proteínas, debido a que es vital para un gran número de funciones y procesos celulares, tales como la transducción de señales, la diferenciación celular, y el control del ciclo celular y del metabolismo. Los

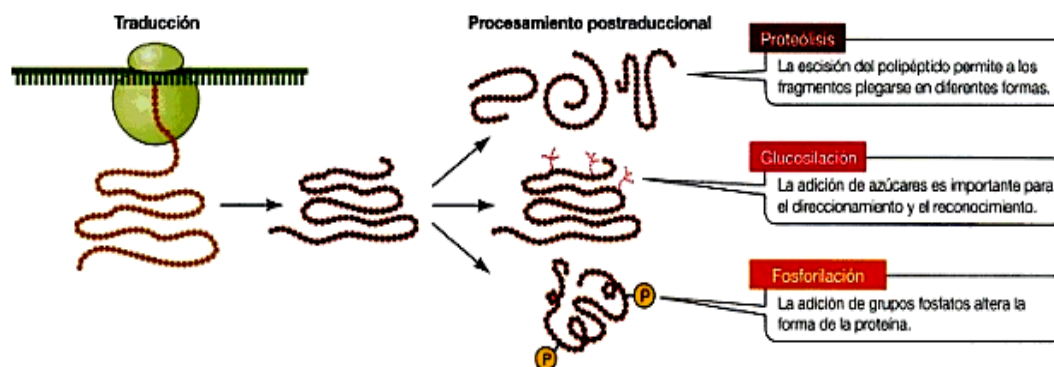


Figura 4. Representación gráfica de algunas de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas [Sadava, 2009].

mecanismos de fosforilación actúan como un interruptor de “encendido” y “apagado” de la actividad de una proteína o una vía celular. Se ha estimado que una de cada tres proteínas es fosforilada en algún punto de su ciclo de vida. Casi todos los procesos regulados por fosforilación son reversibles y controlados por la combinación de dos clases de enzimas: cinasas y fosfatasas [Delom, 2006].

La *glicosilación* es otra de las *PTM* más comunes. La gran mayoría de proteínas de superficie y proteínas secretadas en células de mamíferos contienen carbohidratos [Neelamegham, 2011]. Estas *PTM* tienen importantes funciones en la regulación del reconocimiento celular, señalización, y adhesión, las cuales condicionan tanto al desarrollo y fisiología normal del mamífero como el progreso de algunas enfermedades (*p. ej.* cáncer y trombosis) [Varki, 2009]. Además, la glicosilación regula la vida media de moléculas terapéuticas en circulación sanguínea; por lo tanto, la regulación de los patrones de glicosilación sitio-específica es de gran interés para la industria farmacéutica [Costa, 2013].

La *S-nitrosilación*, adición covalente de un grupo nitroxilo ($-N=O$) a un grupo tiol de una cisteína, es una *PTM* que constituye un mecanismo regulador involucrado en diferentes procesos biológicos; *p. ej.* control del crecimiento celular, metabolismo, diferenciación y apoptosis. La S-nitrosilación modula las propiedades funcionales de un gran número de proteínas, afectando su funcionamiento celular normal. Además, se ha observado S-nitrosilación aberrante en varias condiciones patológicas, entre las que figuran algunas enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, y cáncer [Ben-Lulu, 2014].

La *nitración de tirosina* es una *PTM* oxidativa que afecta la estructura y función de proteínas. La nitración de tirosina es mediada por la producción de especies reactivas de nitrógeno (*RNS*, por sus siglas en inglés *reactive nitrogen species*), como peroxinitrito ($ONOO^-$) y dióxido de nitrógeno (NO_2) [Campolo, 2014]. La disminución o pérdida de la función proteica por nitración puede resultar en la inhibición de la actividad catalítica o la reducción de los niveles de proteína, ya que esta *PTM* ocasiona cambios en la estructura secundaria, dificultando el acceso del sustrato al sitio activo [Pacher, 2007].

1.1.6. Mecanismo de respuesta a proteínas no plegadas (UPR)

Las células vigilan cuidadosamente la cantidad de proteínas mal plegadas que contiene en varios compartimientos. Una acumulación de proteínas mal plegadas en el citosol, por ejemplo, desencadena una respuesta similar al estrés térmico, la cual promueve la transcripción de genes que codifican para chaperonas que ayudan al replegamiento de proteínas. De la misma manera, una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE desencadena una *respuesta a proteínas no plegadas*, o *UPR* (por sus siglas en inglés *unfolded protein response*), la cual incluye un incremento en la transcripción de genes que codifican para chaperonas y de proteínas involucradas en la

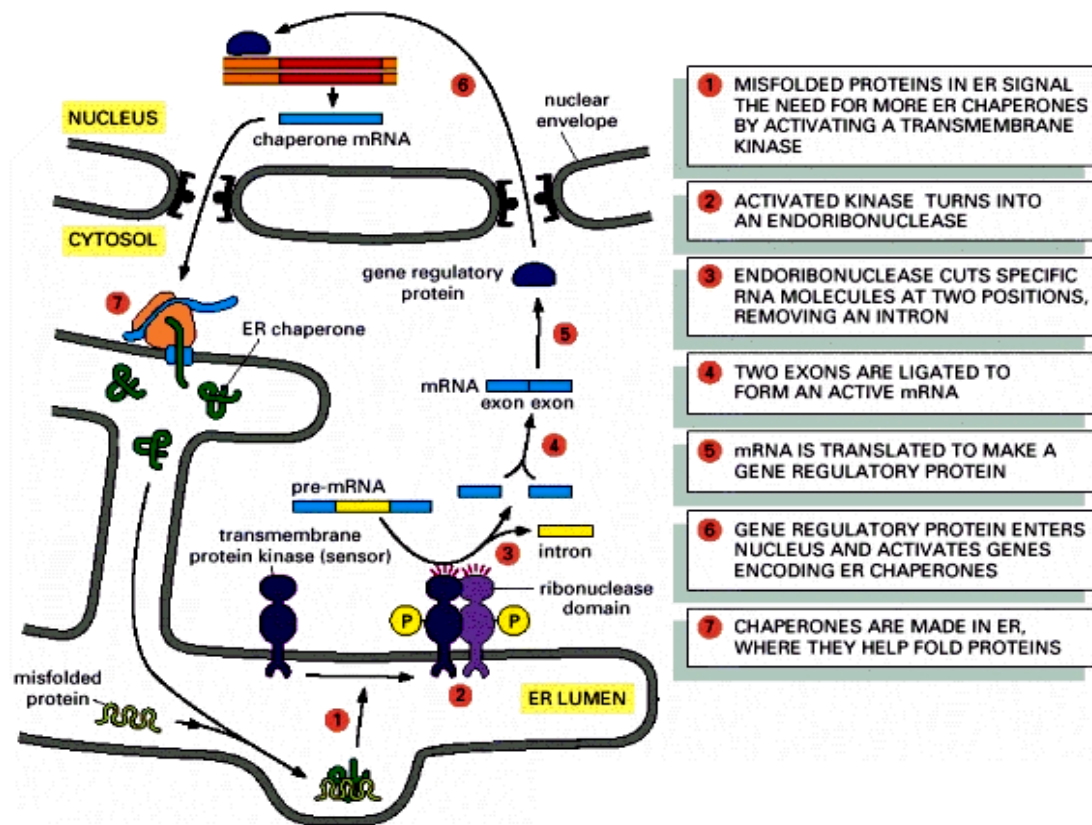


Figura 5. Mecanismo UPR en levaduras [Alberts, 2012].

A través de esta vía de señalización intracelular, la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo endoplásmico genera señales dirigidas al núcleo, las cuales activan la transcripción de genes que codifican polipéptidos que ayudan a la célula tolerar el estrés.

degradación de proteínas asociada al RE [Alberts, 2012].

La Figura 5 muestra el mecanismo de la UPR en levaduras. Una proteína cinasa transmembranal se activa por proteínas mal plegadas, lo que ocasiona su oligomerización y auto-fosforilación. La oligomerización conduce a la activación de un dominio de endorribonucleasa (presente en el dominio citosólico de la proteína cinasa). La actividad nucleasa remueve un intrón presente en una molécula específica de ARN citosólico y una ligasa de ARN une los exones. El ARN procesado es traducido, produciendo una proteína reguladora que migra al núcleo y activa la transcripción de genes que codifican para proteínas del mecanismo de la UPR [Alberts, 2012].

1.1.7. Mecanismo de degradación asociado al retículo endoplásmico (ERAD)

El plegamiento y ensamblado de proteínas en el RE se basa en mecanismos que de manera inherente deben estar libres de error. El sistema de control de calidad del RE asegura que únicamente las proteínas correctamente plegadas puedan salir del compartimiento. Las proteínas incorrecta o parcialmente plegadas son retenidas en el RE para un re-plegamiento asistido por chaperonas, en caso contrario, son degradadas por un

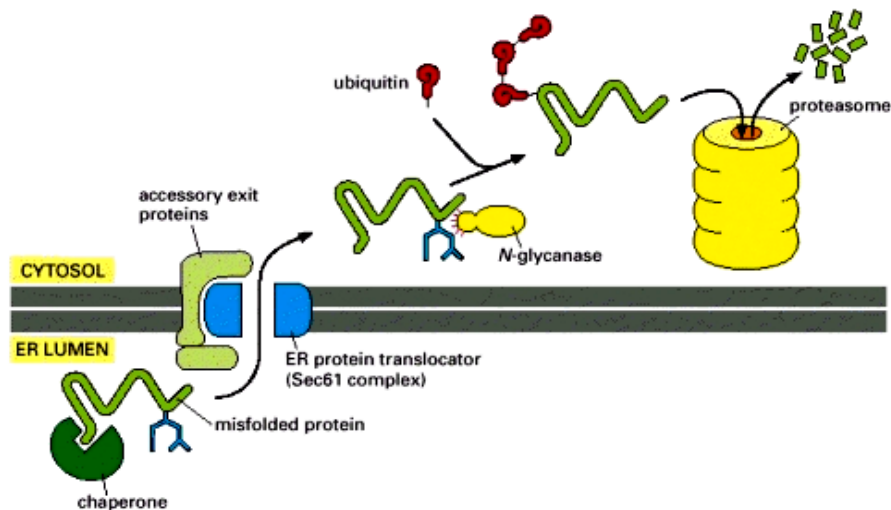


Figura 6. Mecanismo ERAD.

Las proteínas mal plegadas solubles en el lumen del RE son translocadas hacia el citosol, donde son desglucosiladas, poli-ubiquitinadas, y degradadas por el proteasoma [Alberts, 2012].

mecanismo denominado como *ERAD* (por sus siglas en inglés, *endoplasmic reticulum associated degradation*) [Sakoh-Nakatogawa, 2009].

Las proteínas mal plegadas son reconocidas inicialmente por chaperonas y lectinas residentes del RE; posteriormente, son entregadas a la ubiquitina-ligasa de membrana *HRD1* (*Hrd1p* en *S. cerevisiae*). *HRD1* interactúa directamente con *SEL1L* (*Hrd3p* en *S. cerevisiae*), una importante proteína para el mecanismo ERAD mediado por *HRD1*.

Entonces, los sustratos son retro-translocados, a través de la membrana del RE hacia el citosol, poli-ubiquitinados en ese compartimiento, extraídos de la membrana por la ATPasa *p97* (*cdc48* en *S. cerevisiae*), y degradados por el proteasoma (Figura 6) [Tang, 2014].

1.2. PDI como modelo de proteína del plegamiento

1.2.1. Familia de proteínas PDI de humano

La proteínas PDI (proteína disulfuro isomerasa) son oxidorreductasas que catalizan la oxidación, reducción e isomerización de enlaces disulfuro. En humanos, existen 21 miembros relacionados con las actividades de PDI [Vitello, 2012]. Las PDI están caracterizadas por la presencia de un motivo *CXXC* en el sitio activo en los dominios funcionales tiorredoxina (nombrados de esa manera por su parecido estructural con esta proteína bacteriana). El número y el arreglo de dominios tiorredoxina varía entre los miembros de la familia (Figura 7) [Buck, 2008].

1.2.2. Proteína PDIA1/P4HB

PDIA1/P4HB, el primer miembro descrito de la familia PDI, fue identificado originalmente como la subunidad β de la *prolil-4-hidroxilasa* humana. El gen PDIA1/P4HB está localizado en el *locus* 17q25.3, constituido por 11 exones y una longitud de 18 kb.

La región promotora contiene 11 sitios de regulación, incluido un elemento de respuesta a estrés del RE (*ERSE*). A pesar de este último, PDIA1/P4HB se induce

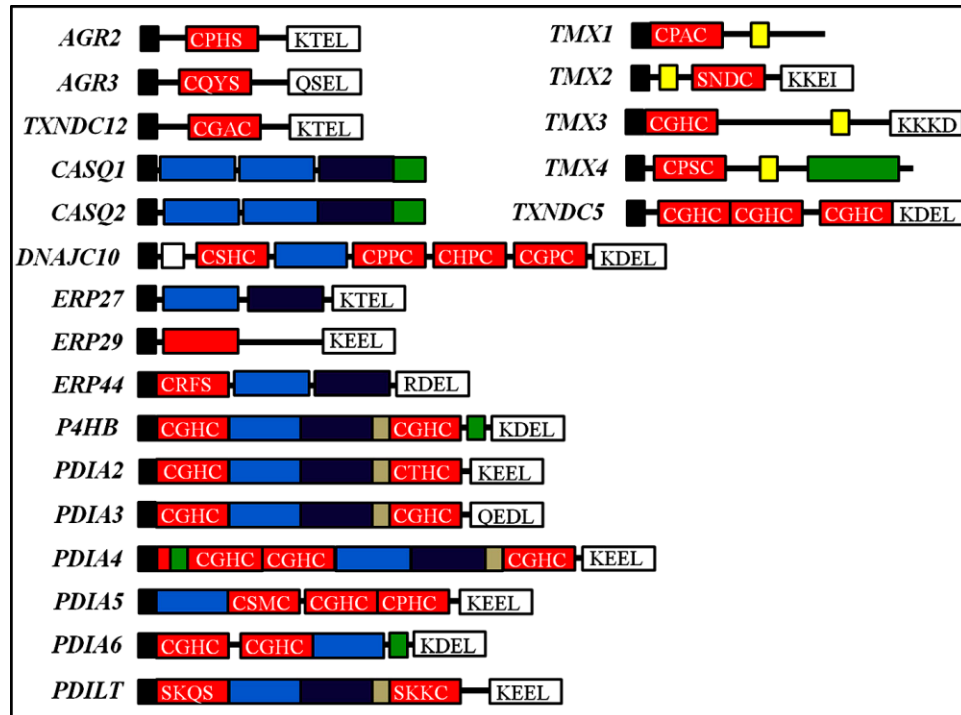


Figura 7. Representación esquemática de la organización de dominios de las 21 proteínas de la familia PDI de humano [Gilligan, 2012].

Todas las proteínas contienen una pequeña secuencia N-terminal designada en negro. Los dominios catalíticos parecidos a tiorredoxina (a o a') están representados en *rojo* con los sitios activos denotados; los dominios tiorredoxina inactivos están en *azul* (b) y *morado* (b'); el verde representa los dominios de los sitios ricos en Asp/Glu de unión a Ca^{2+} ; regiones de unión (*gris*); dominios transmembranales (*amarillo*); las secuencias C-terminal de retención en el RE están en *blanco* con la composición de residuos denotada.

débilmente por estrés del RE, probablemente debido a su gran abundancia. Además, seis elementos CCAAT, localizados en las primeras 378 pb, fueron ratificados como importantes, ya que mutaciones inducidas en este sitio reducen la fuerza de la región promotora [Gilligan, 2012].

La secuencia codificante consiste de un polipéptido de 508 aminoácidos, distribuidos en: una secuencia N-terminal hidrofóbica (péptido señal), cuatro dominios tiorredoxina (Figura 8): 2 activos (a y a'), los cuales contienen el motivo CXXC, y 2 inactivos (b y b'); además, un dominio rico en aminoácidos ácidos (c), y una secuencia C-terminal de retención del RE (KDEL) [Gilligan, 2012]. De manera general, la PDI cataliza la correcta formación de enlaces disulfuro en las proteínas sustrato [Abromaitis,

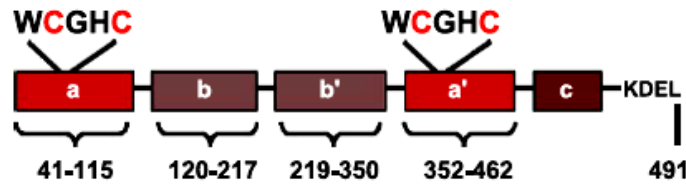


Figura 8. Organización de los dominios de PDI [Wilkinson, 2004].

2009; Muller, 2013; Furie, 2014]. Localizados en los sitios activos de los dominios a y a', los residuos de cisteína del motivo *CGHC* ciclan entre los estados oxidado (*disulfuro*) y reducido (*ditio*l) durante la catálisis enzimática [Xu, 2012].

1.2.3. Funciones como oxidoreductasa

PDI actúa como una tiol-oxidoreductasa, catalizando la formación, rompimiento y rearreglo de enlaces disulfuro, durante el plegamiento oxidativo de proteínas [Xu, 2012]. La presencia de los motivos catalíticos, CXXC, determina su potencial redox [Muller, 2013].

1.2.4. Funciones como chaperona molecular

Además de sus funciones catalíticas, PDI puede actuar como chaperona molecular, sensible a condiciones redox, previniendo un plegamiento inadecuado y la agregación de proteínas. Aunque inicialmente la propuesta de su actividad chaperona resultó controversial, se demostró recientemente que tanto la actividad chaperona como todas las conformaciones de PDI están reguladas por el estado redox, ocasionando cambios estructurales que relajan la conformación compacta de la molécula y exponen las regiones hidrofóbicas, facilitando su función como chaperona [Niforou, 2014].

1.2.5. Otras funciones

Adicional a sus funciones catalíticas y de chaperona, la PDI participa en el mecanismo *UPR*, y también en la regulación de la función de receptores, interacciones célula-célula, expresión génica, y la polimerización de filamentos de actina [Vitello,

2012]. Por otro lado, es un péptido multifuncional que forma parte de complejos enzimáticos, tales como la prolil-4-hidroxilasa y el complejo microsomal de transferencia de triglicéridos [Kivirikko, 1998].

Varios estudios han demostrado que puede funcionar como proteína intracelular de unión a moléculas pequeñas que contienen grupos fenólicos, tanto hormonas endógenas (*p. ej.* tiroideas), como químicos contaminantes del medioambiente (*p. ej.* bisfenol) [Fu, 2011]. Entre otras funciones reportadas, destacan su función como fosfoproteína del RE, como proteína de unión a calcio, y como deshidroascorbato reductasa [Kivirikko, 1998].

1.3. PDI/P4HB como blanco terapéutico

1.3.1. Asociación de PDI con patologías en humanos

Varios estudios recientes han sugerido la participación de la PDI en algunas enfermedades infecciosas y otros síndromes en humanos [Hong, 2008].

1.3.1.1. Infecciones virales, bacterianas y parasitarias

Infecciones virales. Existe un número significativo de estudios que apoyan el papel de los estados redox ditiol/disulfuro en las etapas tempranas del ciclo de infección de algunos virus: Sindbis, Baculovirus, Vaccina, Virus de la Arteritis Equina, Virus de la Leucemia Murina, Virus de la Enfermedad de Newcastle, Virus de la Hepatitis δ , y VIH [Stantchev, 2012].

Recientemente, se demostró que una proteína de la superficie de la célula hospedera (linfocitos T₄) involucrada en la adhesión y entrada del VIH, requiere de la actividad oxidorreductora de PDI para completar la etapa [Gowthaman, 2008]; aún más, se ha reportado que moléculas inhibidoras de la PDI inhiben la entrada del VIH [Xu, 2012]. Interesantemente, las proteínas de la envoltura del VIH contienen 10 enlaces disulfuro (nueve en la gp120 y uno en la gp41), lo que sugiere que el bloqueo de las etapas tempranas de la infección por VIH, mediado por inhibidores de PDI, es una estrategia farmacológica viable para detener la infección viral [Stantchev, 2012].

Infecciones bacterianas. Para algunas bacterias, como *Neisseria meningitidis*, se ha demostrado que dos proteínas PDI de membrana son esenciales para el crecimiento bacteriano y biogénesis. Por otro lado, se ha observado que la PDI se requiere para que *Chlamydia* se adhiera a la superficie celular, un patógeno intracelular obligado de eucariotas [Hong, 2008]. A pesar de estos hallazgos experimentales, el papel funcional preciso de la PDI, es aún desconocido [Abromaitis, 2009].

Infecciones parasitarias. En el caso de algunos parásitos, tales como *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*, se reportó que la PDI juega un papel importante en la interacción parásito-hospedero. Asimismo, se ha demostrado que una PDI de los taquizoitos de *N. caninum* está involucrada en la adhesión a las células del hospedero. Por otro lado, también se ha involucrado a la PDI en el desarrollo y formación de la cutícula del nemátodo *Caenorhabditis elegans* [Hong, 2008].

1.3.1.2. *Cáncer y otras enfermedades proliferativas*

Se han detectado altos niveles de PDI en diferentes tipos de procesos proliferativos malignos en humanos, como el cáncer de ovario, de próstata, y de pulmón, así como también en linfomas, gliomas, leucemias y melanomas [Xu, 2012]. Mediante análisis proteómicos, se ha determinado la sobre-expresión de PDI en cáncer de cerebro, de riñón, de ovario, de próstata, de pulmón y en linfomas [Xu, 2014].

Se ha observado, la sobre-expresión del gen *AGR2*, un miembro de la familia PDI de humano y blanco del receptor de estrógenos, en líneas celulares de cáncer de mama positivas al receptor de estrógenos. Este marcador ha sido identificado en adenocarcinomas de otros tejidos (colorrectal, esofágico, pulmonar, ovárico, pancreático, y prostático).

Desafortunadamente, la sobre-expresión de *AGR2* en cáncer de mama positivo a receptor de estrógenos está asociado con un diagnóstico pobre, especialmente en tumores que evaden la terapia anti-hormonal. *AGR2* promueve la proliferación y supervivencia celular, y los procesos metastásicos. *AGR2* se localiza en el RE, asiste en el plegamiento de proteínas y en el mecanismo *ERAD* [Salmans, 2013].

1.3.1.3. *Enfermedades neurodegenerativas*

La PDI protege contra la agregación de proteínas en varias enfermedades neurodegenerativas, además disminuye la agregación de la proteína sinfilina-1, asociada a la enfermedad de Parkinson, una actividad que depende de la presencia del motivo CGHC en el sitio activo [Walker, 2011].

La PDI es un blanco del estrés nitrosativo, el cual resulta en la S-nitrosilación de la PDI nativa. Se ha encontrado PDI-nitrosilada en el cerebro de pacientes con enfermedad de Parkinson y Alzheimer. Bajo condiciones severas de estrés nitrosativo, la PDI-nitrosilada puede prolongar el mecanismo *UPR*, contribuyendo así a la acumulación de proteínas mal plegadas y al daño celular. En el modelo de la enfermedad de Huntington, la PDI ha sido identificada como un regulador de la vía de muerte celular [Wang, 2012]. Las evidencias más recientes han identificado al estrés del RE, y en particular a la PDI, como de vital importancia en el proceso y desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica o *ALS* (por sus siglas en inglés, *amyotrophic lateral sclerosis*) [Walker, 2011].

1.3.1.4. *Enfermedades metabólicas*

La enfermedad metabólica *diabetes mellitus* se caracteriza por presentar altos niveles de glucosa sanguínea y por una absoluta o una relativa deficiencia en la producción de insulina. La patogénesis de esta enfermedad involucra la disfunción de las células β del páncreas. Recientemente, se ha postulado que una señalización deficiente del estrés del RE contribuye a la disfunción de las células β y eventualmente a su muerte [Fonseca, 2009]. Cada vez existe más evidencia que sugiere que la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE genera especies reactivas de oxígeno, o *ROS* (de sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*). La formación incorrecta de enlaces disulfuro merma la acción del glutatión, ya que éste se requiere para la reducción de los primeros. La formación de enlaces disulfuro en el RE es conducida a través del plegamiento oxidativo, catalizada por la PDI y ERO1, lo cual produce *ROS*. Esto es, la sobre-expresión de una proteína mal plegada activa el UPR, causa estrés oxidativo, e induce la apoptosis [Back, 2012].

1.3.1.5. *Enfermedades cardiovasculares*

La PDI tiene funciones biológicas en la superficie celular de linfocitos, hepatocitos, plaquetas y células endoteliales. Las plaquetas son una rica fuente de PDI extracelular, ya que la expresan en su superficie celular y la secretan en respuesta a la estimulación por trombina. Las células endoteliales también expresan PDI mediante una estimulación agonista o cuando se confrontan al daño vascular. Durante la formación de trombos *in vivo*, la PDI es rápidamente secretada tanto por plaquetas como por células endoteliales [Jasuja, 2012]. Tres miembros de la familia PDI de humano han sido identificados durante la formación del trombo: PDIA1, ERp57, y ERp5. Aunque su participación aún no es clara, la actividad funcional tiene lugar en el espacio extracelular, después de la secreción [Furie, 2014].

La formación de enlaces disulfuro es uno de los etapas limitantes en el plegamiento de proteínas en el RE; además, es dependiente de O₂. Por lo tanto, la activación de la respuesta al estrés del RE mediada por hipoxia, durante una isquemia miocárdica, puede regular positivamente genes, como PDIA6, que promueven el plegamiento en el RE y la formación de enlaces disulfuro. Este aumento en la capacidad de plegamiento del RE puede ayudar a la supervivencia de los miocitos y limitar el daño isquémico [Vekich, 2012].

1.3.2. *PDI/P4HB como blanco farmacológico*

Recientemente, se ha vinculado la química del disulfuro y la patogénesis ocasionada por proteínas mal plegadas; específicamente, la enzima PDI como blanco para controlar varios síndromes neurodegenerativos, incluida la enfermedad de Alzheimer [Kosuri, 2012]. Por otro lado, la inhibición de la actividad de la PDI lleva a la apoptosis a células cancerosas, sugiriendo que la PDI es un blanco farmacológico prometedor [Xu, 2012].

1.3.3. *Moduladores e inhibidores de la función de la PDIA1/P4HB de humano*

A lo largo de varias décadas, se han establecido una serie de ensayos para medir las actividades enzimáticas de PDI. Por tal motivo, es importante entender las ventajas y

limitaciones de cada uno cuando son utilizados para identificar moléculas moduladoras o inhibidoras específicas de cada una de las funciones de la enzima PDIA1/P4HB [Xu, 2014].

1.4. Identificación de moduladores e inhibidores de PDIA1/P4HB

A la fecha no se han descrito moléculas con el potencial de modular la actividad de PDI. Sin embargo, la noción de irrumpir en la estructura de PDI con el objetivo de controlar las funciones y, por ende, el mecanismo de plegamiento oxidativo es factible [Svedruzic, 2013].

Aunque la PDI ha sido estudiada durante las últimas décadas, no se han identificado ni obtenido inhibidores para el uso clínico. Sólo existe un número limitado de inhibidores de la PDI, y la mayoría no son potentes ni selectivos y, además, muestran una significativa toxicidad. Sin embargo, el conocimiento más detallado de la estructura y funciones de la familia de las PDI llevará al descubrimiento de inhibidores potentes y selectivos. El reciente descubrimiento de pequeñas moléculas sintéticas inhibidoras, como PACMA 31 y 16F16, han aportado datos importantes para comprender mejor el papel de la PDI en las enfermedades humanas [Xu, 2014].

Actualmente, no existen estrategias que permitan la identificación de moduladores de actividades proteicas (p. ej. enzimáticas); sin embargo, se espera que en un futuro próximo se desarrollen estrategias experimentales con potencial de descubrir candidatos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades [Xu, 2014].

1.5. Despliegue de péptidos en bacteriófagos como estrategia para identificar moduladores o inhibidores de la PDIA1/P4HB de humano

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias. Se pueden encontrar en cualquier ambiente donde esté presente su bacteria hospedera. El número de bacteriófagos en sistemas acuáticos fue establecido en el rango de 10^4 a 10^8 viriones por mililitro, y en tierra o partículas de sedimento $\pm 10^9$ viriones por gramo [Drulis-Kawa,

2012]. El despliegue de péptidos en bacteriófagos es un poderoso método de selección de ligandos que se ha aplicado tanto *in vivo* como *in vitro*. Las bibliotecas de péptidos desplegados en bacteriófagos pueden ser tamizadas y seleccionadas mediante rondas repetidas de enriquecimiento, para identificar a los bacteriófagos que se unen a la molécula diana [Bignone, 2013].

Las evidencias experimentales han demostrado que PDI juega un papel importante en varios padecimientos humanos, como el cáncer y algunas infecciones. Por lo tanto, la búsqueda de inhibidores de PDI es de gran interés, siendo el despliegue en fagos una importante herramienta en la selección e identificación de moléculas con potencial terapéutico. Por otro lado, los péptidos, que generalmente tienen mayor afinidad hacia receptores proteicos, han sido motivo de estudio para desarrollar inhibidores de uso clínico [Ruzza, 2012].

2. OBJETIVOS Y META

2.1. Objetivo General

Obtener secuencias de heptapéptidos capaces de unirse a PDIA1/P4HB, con potencial de modular sus actividades, a partir del tamizado de una biblioteca de péptidos desplegados en bacteriófagos filamentosos (M13KE).

2.2. Objetivos Específicos

1. Seleccionar bacteriófagos que despliegan un heptapéptido de unión a HuPDI mediante tamizados seriados a concentraciones crecientes de un agente tensoactivo.
2. Seleccionar aleatoriamente UFP individuales para amplificación independiente, con el fin de obtener suficiente título para secuenciación de ADN y ensayos de ELISA.
3. Obtener ADN de cadena sencilla de cada UFP mediante la extracción y purificación del material genético utilizando un estuche comercial.
4. Identificar los bacteriófagos con alto potencial de unión a HuPDI mediante un ensayo de ELISA semi-cuantitativo.
5. Determinar de manera indirecta la K_D de los heptapéptidos desplegados en bacteriófagos mediante un ensayo de ELISA cuantitativo.

2.3. Meta

Obtener al menos una secuencia heptapeptídica con capacidad de unión a HuPDI y con potencial de inhibir su actividad oxidorreductora o chaperona.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos químicos y biológicos

3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Los reactivos grado analítico o biología molecular fueron adquiridos de diversas compañías y proveedores (Tabla I). La proteína disulfuro isomerasa recombinante de humano (HuPDI) fue obtenida de la reserva de material biológico del Laboratorio de Biotecnología (FCQI, UABC). Brevemente, la secuencia codificante para el péptido maduro PDIA1/P4HB (NM_000918) fue amplificada y subclonada en el plásmido pQE30 (Qiagen). La proteína HuPDI recombinante fue expresada en *E. coli* y purificada a partir de extractos bacterianos siguiendo los protocolos estándar de laboratorio y las recomendaciones del proveedor.

Tabla I. Lista de reactivos químicos y bioquímicos utilizados.

Compañía/Proveedor	Reactivo
BASF	Polietilenglicol 8000
Becton-Dickinson	Agar bacteriológico; Extracto de levadura
Fermont	Ácido clorhídrico
G-Biosciences	Albúmina sérica de bovino (BSA)
GE Health Care	Anticuerpo anti-M13-HRP acoplado a peroxidasa (HRP)
HyClone	Amortiguador salino de fosfatos (PBS)
IBI scientific	Agarosa; Glicerol; Tris-hidroxietil-aminometano (Tris)
Invitrogen	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (Xgal)
JT Baker	Ácido sulfúrico; Bicarbonato de sodio; Cloruro de sodio; Etanol
MP Biomedicals	Glicina
Sigma	Ampicilina; Azul de bromofenol; Azul de xilencianol; Bromuro de etidio; Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG); Reactivo de Bradford; Tetraciclina; Triptona; Tween [®] 20
Spectrum	Gelatina
Thermo Scientific	Amortiguador 1-Step [™] Ultra TMB-ELISA

3.1.2. Células y medios de cultivo

La cepa ER2738 de *Escherichia coli* [*F'* *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q Δ (*lacZ*)*M15* *zzf::Tn10* (*Tet*^R)/*fhuA2 glnV thi* Δ (*lac-proAB*) Δ (*hsdMS-mcrB*)5 (*rk⁻mk⁻McrBC⁻*)] fue obtenida como componente del estuche comercial *Ph.D.*TM-7 *Phage Display Peptide Library Kit* (ver 3.1.3.).

El medio de cultivo *Luria-Bertani* (LB: 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, y 1% de cloruro de sodio) y sus variantes: *LB-Top* agar (LB suplementado con 0.7% de agar bacteriológico), y *LB-IPTG/Xgal* agar (LB suplementado con 40 µg/mL de *Xgal*, 0.5 mM de *IPTG*, y 1.7% de agar bacteriológico) fueron utilizados para la infección, amplificación y titulación de bacteriófagos.

3.1.3. Biblioteca de heptapéptidos desplegados en la superficie de bacteriófagos

El estuche comercial *Ph.D.*TM-7 *Phage Display Peptide Library Kit* (*New England Biolabs*) contiene una librería combinatoria de heptapéptidos aleatorios fusionados a la proteína menor (*pIII*) del bacteriófago M13KE, el heptapéptido se expresa en el extremo N-terminal de *pIII*; esto es, el primer residuo del péptido maduro es el primero de la posición aleatoria. El heptapéptido está separado del resto de la proteína por una pequeña secuencia espaciadora (GGGS). La librería consiste de $\pm 10^9$ secuencias independientes, de tal manera que un título de 1×10^{13} UFP/mL garantiza una redundancia de 10 secuencias por cada microlitro.

3.1.4. Estuches comerciales

El estuche comercial *QIAprep® Spin M13 Kit* (*Qiagen*) fue utilizado para la purificación de ADN de cadena sencilla (ADNcs).

3.1.5. Equipos y software

Los cultivos líquidos para la amplificación de bacterias y bacteriófagos se realizaron en condiciones controladas en la incubadora *Incubator Shaker Series 25* (*New Brunswick Scientific Co.*). Para la infección y titulación de fagos en placa se utilizó la incubadora *Boekel model 132000* (*Boekel Industries Inc.*). Para la purificación de ADNcs

se utilizó la microcentrífuga *MiniSpin® Plus* (Eppendorf) y para la precipitación de bacteriófagos con temperatura controlada se utilizó la microcentrífuga *Biofuge Fresco* (Heraeus) y *Allegra™ X-22R Centrifuge* (Beckman Coulter). Para la lectura de microplacas de 96 pocillos se utilizó el *Microplate Reader Model 680* (Bio-Rad). Los resultados fueron analizados usando el paquete computacional *GraphPad Prism®* v4.03 (GraphPad Software Inc).

3.2. Protocolos generales

3.2.1. Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Inicialmente, se preparó una solución 50 µg/mL de BSA (New England BioLabs). Posteriormente, en una microplaca de 96 pocillos, se prepararon mezclas patrón (50 µL) conteniendo 0, 10, 20, 30, 40, y 50 µg/mL de BSA (curva patrón), y la dilución de la proteína de interés 1:50 (50 µL) por duplicado. Enseguida, a cada pocillo, se adicionaron 100 µL del reactivo de Bradford y se mezcló por pipeteo. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, los valores de absorbancia a 595 y 450 nm (A_{595} y A_{450}) fueron obtenidos. La concentración de la proteína de interés fue obtenida a partir de la curva patrón, A_{595}/A_{450} vs concentración de BSA, extrapolar los valores de absorbancia obtenida.

3.2.2. Preparación de cultivo joven de la cepa ER2738 de *E. coli*

El cultivo joven fue preparado a partir de una suspensión de la cepa ER2738 de *E. coli*, criopreservada a -20 °C en presencia de glicerol al 15%, mediante la inoculación de 2 mL de medio LB/Tc (LB suplementado con tetraciclina a 12.5 µg/mL) con 20 µL de la suspensión bacteriana. El cultivo fue incubado durante la noche (12-14 horas) a 37 °C con agitación constante (300 rpm).

3.2.3. Infección y titulación de bacteriófagos

Inicialmente, un cultivo fresco de la cepa ER2738 de *E. coli*, fue preparado a partir de un cultivo joven realizando una dilución 1:100 en medio LB líquido. El cultivo

fue incubado durante 2 horas ($DO_{600} = 0.4$) a 37 °C con agitación constante (300 rpm). Paralelamente, el medio *LB-Top* agar fue fundido (en horno de microondas) y transferido (2 mL) a tubos estériles, uno para cada infección, manteniéndose atemperado en baño maría (55-60 °C).

Para la infección, en microtubos de 1.5 mL, se prepararon mezclas con 250 µL del cultivo fresco de la cepa ER2738 y 10 ó 100 µL de la suspensión de bacteriófagos. La mezcla fue agitada brevemente (3-5 segundos) e incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Inmediatamente, la mezcla fue transferida a los tubos con medio *LB-Top* agar, agitada rápidamente (3-5 segundos), y vertida sobre la superficie de cajas petri con medio *LB-IPTG/Xgal* agar. Se espera de 5-10 minutos a fin de que el *LB-Top* agar solidifique, y el cultivo infectado se incubó durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se contaron las unidades formadoras de placas azules. El bacteriófago M13KE contiene una inserción de la unidad transcripcional *Plac-lacZ*, lo que permite la identificación (azules y blancas) de las UFP recombinantes.

Para la titulación, se prepararon diluciones seriadas base 100 (10 y 990) hasta 10^{-10} , en medio *LB* líquido, de cada suspensión de bacteriófagos. Para valorar el título, se tomaron 100 µL de la dilución 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , ó 10^{-10} para conocer los títulos 10^3 , 10^5 , 10^7 , 10^9 , o 10^{11} ; también, se tomaron 10 µL de la dilución 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , o 10^{-10} para conocer los títulos 10^4 , 10^6 , 10^8 , 10^{10} , o 10^{12} . Los volúmenes utilizados para realizar las infecciones dependieron del título esperado.

3.2.4. Purificación de ADNcs

Para obtener la secuencia de ADN codificante del heptapéptido desplegado por los bacteriófagos seleccionados, los *ADNcs* se purificaron mediante un estuche comercial, siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. A partir de las suspensiones de UFP seleccionadas y amplificadas, se transfirieron 0.5 mL a microtubos de 1.5 mL y se mezclaron con 5 µL de amortiguador *MP*. Después de 2 minutos de incubación a temperatura ambiente, la mezcla fue transferida a una columna *QIAprep Spin* que fue centrifugada durante 15 segundos a 8,000 rpm. Posteriormente, se adicionaron 0.7 mL de amortiguador *MBL* y se centrifugó durante 15 segundos a 8,000

rpm. Enseguida, se adicionaron otros 0.7 mL de amortiguador *MBL*, incubada durante 1 minuto a temperatura ambiente, y centrifugada durante 15 segundos a 8,000 rpm. Inmediatamente, se adicionaron 0.7 mL de amortiguador *PE*, y de nuevo se centrifugó durante 15 segundos a 8,000 rpm. Para remover por completo el amortiguador, se realizó una centrifugación adicional (15 segundos a 8,000 rpm). El *ADNcs* fue eluído con 50 μ L de amortiguador *EB*. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, el *ADNcs* fue recuperado mediante centrifugación a 8,000 rpm durante 30 segundos. La calidad fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.2.5. Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa (1%) con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) en amortiguador TAE 1X de acuerdo a los procedimientos estándar del laboratorio. La muestra de *ADNcs* fue mezclada con 5 μ L de agua desionizada y 1 μ L de amortiguador de carga 10X. La totalidad de la mezcla y 10 μ L de marcador de peso molecular (λ -*HindIII*) fueron cargados en pocillos independientes del gel de agarosa. Los fragmentos de ADN fueron separados por acción de un campo eléctrico (100 V) aplicado durante 20-30 minutos.

3.3. Tamizado de la biblioteca *Ph.D.*TM-7

3.3.1. Reconocimiento inicial mediante biopanning

En una microplaca, se recubrieron 8 pocillos con 200 μ L de una solución con 25 μ g/mL de HuPDI en NaHCO₃ 0.1 M (pH 8.5). La sensibilización fue favorecida durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la solución de HuPDI se descartó y los pocillos se bloquearon con 250 μ L de solución de BSA al 1% (en PBS). Después de 2 horas a temperatura ambiente, se descartó la solución de BSA y los pocillos se lavaron (6 veces) con TBST 0.1% (TBS: 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; suplementado con 0.1% de Tween[®] 20). Posteriormente, 125 μ L de suspensión de bacteriófagos de la biblioteca *Ph.D.*TM-7, con un título de 2.7×10^{10} UFP/mL (dilución 1:1000 en 1 mL de TBST 0.1%) se añadió a cada uno de los pocillos. Se permitió el

reconocimiento durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación moderada. Después, los bacteriófagos no pegados se removieron mediante lavados (10 veces) con *TBST* 0.1%. Los bacteriófagos que reconocen a HuPDI se eluyeron (separaron) de los pocillos con la adición de 125 μ L de solución ácida de glicina (BSA 1 mg/mL, 20 mM de Glicina-HCl, pH 2.5) a cada pocillo. Después 10 minutos de incubación y con agitación leve a temperatura ambiente, el volumen de cada pocillo se recolectó en un microtubo de 1.5 mL, y se neutralizó rápidamente con 0.25 mL de una solución 1 M de Tris-HCl (pH 8). De cada elución se tomó una alícuota de 10 μ L, la cual se diluyó con 990 μ L de LB (dilución 10^{-2}), y de cada una de estas diluciones, se utilizaron 100 μ L para realizar la titulación (ver 3.2.3.); el resto, se amplificó y se concentró (ver 3.3.2.), para continuar con las rondas de selección mediante *biopanning* (ver 3.3.3.).

3.3.2. Amplificación y concentración

Inicialmente, se prepararon 20 mL de un cultivo fresco con la cepa ER2738 de *E. coli*, a partir de un cultivo joven, partiendo de una dilución 1:100 en medio *LB* líquido. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante (300 rpm). Una vez que se alcanzó una $DO_{600} = 0.2$, el cultivo se inoculó con el volumen restante (± 1.24 mL) de los bacteriófagos eluidos en el *biopanning*. Se realizó la amplificación viral incubando a 37 °C durante 4.5 horas con agitación constante (300 rpm). Posteriormente, el cultivo infectado se transfirió a un tubo cónico estéril de 50 mL y la suspensión de bacteriófagos se clarificó mediante centrifugación a 9,500 rpm durante 15 minutos (4°C). A continuación el sobrenadante (sobrenadante, ± 20 mL) de la centrifugación anterior, se transfirió a un tubo cónico nuevo, y se clarificó por segunda ocasión mediante centrifugación (9,500 rpm durante 15 minutos, a 4°C). Enseguida, 15 mL del sobrenadante se transfirieron a un tubo cónico estéril de 15 mL y se mezclaron con 3 mL de solución de precipitación de bacteriófagos (polietilenglicol 8000 al 20%, NaCl 2.5 M). La precipitación se completó durante toda la noche a 4°C (Refrigeración).

Al día siguiente, los bacteriófagos precipitados se recolectaron mediante centrifugación a 9,500 rpm durante 15 minutos (4 °C). El sobrenadante se descartó, y la pastilla se recentrifugó durante 1 minuto a 9,500 rpm (4 °C). Se removió el exceso de

sobrenadante, y la pastilla se resuspendió en 1 mL de TBS y se transfirió a un microtubo de 1.5 mL. Enseguida, esta suspensión de bacteriófagos se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos (4 °C). El sobrenadante (± 1 mL), se transfirió a otro microtubo de 1.5 mL y se mezcló con 200 μ L de solución de precipitación de bacteriófagos. La precipitación se favoreció mediante la incubación en hielo durante 1 hora. Posteriormente, los bacteriófagos precipitados se separaron mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 10 minutos (4 °C). Se descartó el sobrenadante y la pastilla se recentrifugó durante 1 minuto a 13,000 rpm (4 °C). Por último, se removió el exceso de sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 μ L de TBS.

3.3.3. Rondas de selección mediante *biopanning*

Después del reconocimiento inicial (1ra ronda), los bacteriófagos que reconocieron a HuPDI se sometieron a una serie de rondas de selección mediante *biopanning*. Se realizaron 5 rondas (denominadas 2da, 3ra, 4ta, 5ta y 6ta) siguiendo los protocolos anteriores, teniendo como única modificación la concentración de *Tween*[®] 20 en la solución de TBST (Tabla II).

3.4. Aislamiento, selección, y amplificación de UFP independientes

Inicialmente, se prepararon 25 mL de un cultivo fresco con la cepa ER2738 de *E. coli*, a partir de un cultivo joven, partiendo de una dilución 1:100 en medio *LB* líquido. Posteriormente, 1 mL de la suspensión bacteriana se transfirió a 20 tubos de cultivo estériles. Cada tubo fue rotulado de acuerdo a su número correspondiente (el de cada ronda de selección, Tabla II).

Posteriormente, se seleccionaron aleatoriamente 20 UFP (independientes y azules) a partir de una caja petri (*LB-IPTG/Xgal* agar) obtenida durante la titulación de bacteriófagos concentrados de cada ronda (3ra – 6ta). Cada UFP se inoculó en 1 mL de cultivo fresco y la amplificación viral se realizó incubando a 37 °C durante 4.5 horas con agitación constante (300 rpm). A continuación, el cultivo infectado se transfirió a un microtubo de 1.5 mL, y esta suspensión de bacteriófagos mediante centrifugación a

Tabla II. Características de las rondas de <i>biopanning</i> y selección de UFP que se unen a HuPDI.			
Ronda	Fuente	Tween™ 20 (%)	UFP seleccionadas
1ra	<i>Ph.D.</i> ™-7	0.1	-
2da	1ra	0.3	-
3ra	2da	0.5	HuPDI01 - HuPDI20
4ta	3ra	0.5	HuPDI21 - HuPDI40
5ta	3ra	0.6	HuPDI41 - HuPDI60
6ta	3ra	0.7	HuPDI61 - HuPDI80

13,000 rpm durante 5 minutos (4 °C). El sobrenadante ($\pm$ 1 mL) fue transferido a otro microtubo de 1.5 mL, y de nuevo la suspensión de bacteriófagos se clarificó mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto (4 °C). Ochocientos microlitros (800 μ L) del sobrenadante se transfirieron a otro microtubo de 1.5 mL y se conservó en refrigeración hasta la extracción de ADNcs o hasta su valoración de su especificidad mediante inmunoensayos enzimáticos (*ELISA*).

3.5. Secuenciación de ADN y ensayos de *ELISA*

3.5.1. Secuenciación de ADN

Se purificó el ADNcs de 80 UFP independientes, usando un estuche comercial, y siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor (ver 3.2.4.). La integridad del material genético viral se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (ver 3.2.5.). La secuencia nucleotídica se obtuvo usando el oligonucleótido gIII-96 (5'- ccc tca tag tta gcg taa cg -3') como iniciador y el servicio de secuenciación automática ofrecido por el Instituto de Biotecnología de la UNAM (www.ibt.unam.mx).

3.5.2. Inmunoensayo enzimático (*ELISA*) semi-cuantitativo indirecto

En una microplaca para *ELISA*, se recubrieron los pocillos correspondientes a las filas A, C, E, y F con 100 μ L de una solución con 50 μ g/mL de HuPDI en NaHCO₃ 0.1 M (pH 8.5). La sensibilización de la placa se realizó durante toda la noche a temperatura

ambiente. Al día siguiente, se descartó la solución de HuPDI y todos los pocillos se bloquearon con 250 μ L de solución de BSA al 1% (en PBS). Después de 2 horas a temperatura ambiente, se descartó la solución de BSA y los pocillos se lavaron (6 veces) con TBST 0.3%. Posteriormente, se añadió 100 μ L de cada suspensión de bacteriófagos independientes (título mayor a 10^{11} UFP/mL) a seis pocillos: 3 sensibilizados con HuPDI-BSA y 3 con BSA. El reconocimiento primario procedió durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación moderada. Después, los bacteriófagos en exceso se removieron mediante lavados (6 veces) con TBST 0.3%. Inmediatamente, la interacción HuPDI-(heptapéptido) M13KE se detectó mediante la adición de 100 μ L de una dilución 1:5000 del anticuerpo anti-M13-HRP en solución de BSA al 1% (en PBS). El reconocimiento secundario se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación moderada. Enseguida, la solución de anticuerpo fue descartada y los pocillos se lavaron (6 veces) con TBST 0.3%. Finalmente, los complejos inmunes se revelaron con la adición de 100 μ L de solución 1-Step™ Ultra TMB. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo con 100 μ L de una solución de H₂SO₄ 2M. Se midió la A₄₅₀ en un lector de microplacas de ELISA.

3.5.3. Inmunoensayo enzimático (ELISA) cuantitativo indirecto

En dos microplacas para ELISA (N1 y N2), se recubrieron los pocillos de las columnas 1 – 10 con 100 μ L de una solución de 50 μ g/mL de HuPDI en NaHCO₃ 0.1 M (pH 8.5). La sensibilización, se llevó a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se descartó la solución de HuPDI y todos los pocillos se bloquearon con 250 μ L de una solución de BSA al 1% (en PBS); adicionalmente, se bloqueó una tercer microplaca (N3). Después de 2 horas a temperatura ambiente, se descartó la solución de BSA y los pocillos se lavaron (6 veces) con TBST 0.3%. Previo al reconocimiento de HuPDI, se realizaron las diluciones de las suspensiones de bacteriófagos de interés (HuPDI04, HuPDI51, HuPDI73, HuPDI44, M13KE, HuPDI59, y HuPDI24) en la microplaca N3: añadió 150 μ L de TBST 0.3% a los pocillos de las columnas 1–10; posteriormente, 75 μ L de cada suspensión de bacteriófagos se mezclaron con la solución de los pocillos A1, B1, C1, D1, E1, F1, y G1, respectivamente; después, a

partir de esta primera columna de pocillos se realizaron diluciones seriadas 1:3 hasta la columna 10. Enseguida, 70 μ L de cada dilución, fue transferida a un par de filas (duplicado) de una de las microplacas N1 o N2 (identificadas correctamente). El reconocimiento primario se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación moderada. A partir de este punto, el protocolo se realizó de manera similar al ensayo de *ELISA* semi-cuantitativo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Selección de bacteriófagos que despliegan un heptapéptido que se une a HuPDI

El despliegue en superficie de bacteriófagos es una técnica que permite la selección de una molécula (ligando), capaz de reconocer a otra (receptor), a partir de una biblioteca de variantes de péptidos o proteínas expresada en la superficie de bacteriófagos filamentosos. Interesantemente, el material genético que codifica para la variante se encuentra en el interior de la partícula viral, creando un vínculo entre la secuencia polipeptídica desplegada y la secuencia nucleotídica que la codifica. Esta estrategia permite una rápida selección de péptidos o proteínas basada en la afinidad de unión a una molécula blanco específica (enzimas, anticuerpos, receptores de superficie, etc.).

Los bacteriófagos que despliegan un heptapéptido con capacidad de unirse a la proteína HuPDI se obtuvieron a partir de 6 rondas de selección (*biopanning*), aumentando en cada ronda, la astringencia del reconocimiento mediante el incremento de la concentración del tensoactivo *Tween*[®] 20. Describimos brevemente como se realizó el *biopanning*: 8 pocillos de una microplaca se recubrieron con 5 µg de HuPDI. Se redujo el pegado inespecífico, mediante bloqueo con *BSA* (como proteína inerte). Enseguida, se realizó el reconocimiento de bacteriófagos (mayor a 1×10^{11} UFP/mL) a diferentes concentraciones de *Tween*[®] 20 (0 – 0.7%). Finalmente, aquellos bacteriófagos que se unieron específicamente a HuPDI se separaron por acción de un medio ambiente ácido (pH 2.5).

A partir de la tercera (3ra) ronda, se seleccionaron aleatoriamente 20 UFP con el fin de identificar posibles secuencias de unión específica a HuPDI (Tabla III). Cada UFP seleccionada fue amplificada con el propósito de obtener suficientes partículas virales (mayor a 10^{11} UFP/mL) para purificar *ADNcs* y poder realizar los ensayos de reconocimiento indirecto mediante *ELISA*.

Tabla III. Rondas de aislamiento y selección de bacteriófagos que despliegan heptapéptidos que reconocen a HuPDI.

Ronda	Origen	Tween® 20 (%)	Título (UFP/mL)		UFP seleccionadas
			inicial	final	
1ra	<i>Ph.D.</i> ™-7	0.1	2.7×10^{13}	3.0×10^4	--
2da	1ra	0.3	1.6×10^{13}	2.7×10^5	--
3ra	2da	0.5	3.2×10^{12}	2.9×10^6	HuPDI01 a HuPDI20
4ta	3ra	0.5	ND	ND	HuPDI21 a HuPDI40
5ta	3ra	0.6	5.5×10^{12}	2.8×10^6	HuPDI41 a HuPDI60
6ta	3ra	0.7	3.8×10^{12}	3.2×10^6	HuPDI61 a HuPDI80
ND: no determinado					

4.2. Secuencia de los heptapéptidos que se unen a HuPDI

Se purificó el *ADNcs* de las 80 UFP seleccionadas siguiendo el protocolo y las recomendaciones del estuche comercial *QIAprep Spin M13*. Una vez purificado y verificada su integridad, se envió el *ADNcs* al servicio de secuenciación automática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. De las 80 UFP seleccionadas sólo 32 (40%) generaron una secuencia nucleotídica y polipeptídica deducida, con potencial de reconocimiento para la proteína HuPDI (Tabla IV). Las secuencias obtenidas se clasificaron en 7 grupos (A – G), donde los grupos D, F, y E son los de mayor representación. Cabe destacar que el subgrupo D1 exhibe una secuencia adicional de 18 residuos de aminoácidos (identificada en color gris y entre paréntesis, Tabla IV), para la cual se predice su remoción, ya que aparentemente forma parte del péptido señal, que se requiere para la translocación del polipéptido naciente hacia el periplasma bacteriano.

4.3. Análisis preliminar de los heptapéptidos con potencial de unión a HuPDI

El potencial de unión de las UFP seleccionadas se valoró inicialmente mediante un ensayo de *ELISA* semi-cuantitativo indirecto. Al igual que en las rondas de tamizado,

los pocillos de la microplaca fueron recubiertos con 5 µg de HuPDI y bloqueados con *BSA*. El reconocimiento de HuPDI por cada una de las UFP seleccionadas fue realizado por triplicado.

Paralelamente, un triplicado para reconocimiento de *BSA* fue realizado para cada UFP. El reconocimiento secundario fue realizado usando un anticuerpo anti-M13 acoplado a HRP. De las 32 UFP seleccionadas (Tabla IV), solo aquellas denotadas como HuPDI01, HuPDI04, HuPDI08, HuPDI32, HuPDI41, HuPDI44, HuPDI51, HuPDI52, HuPDI57, HuPDI73, y HuPDI77 mostraron reconocimiento significativo (Figura 9). Interesantemente, todos los bacteriófagos que despliegan los heptapéptidos del grupo D fueron identificados, mostrando su potencial de unión a HuPDI.

Tabla IV. Secuencias polipeptídicas deducidas de las UFP seleccionadas.

Secuencia del heptapéptido	UFP seleccionada	Grupo
NH ₂ -STASYTR	12, 40	A
NH ₂ -DGTIGLR	18, 61	B
NH ₂ -SAPSSKN	24, 26	C
NH ₂ -(GLPQHFGWRFGLPFYSHS)HHPIITYV	1, 4, 8, 32, 41, 52, 57, 77	D1
NH ₂ -HHPIRYV	44	D2
NH ₂ -HAIYPRH	11, 13, 15, 33, 73, 75	E
NH ₂ -GETRAPL	27, 30, 51, 58, 59, 60, 70	F1
NH ₂ -SQTQVPL	48	F2
NH ₂ -TTYSRFP	21, 35	G
La secuencia adicional presente en el subgrupo D1 se denota entre paréntesis.		

Por otro lado, HuPDI51 (grupo F) y HuPDI73 (grupo E) fueron las únicas en sus respectivos grupos que mostraron potencial de unión a HuPDI, lo que sugiere que la conformación estructural del péptido desplegado también juega un papel importante en el reconocimiento molecular.

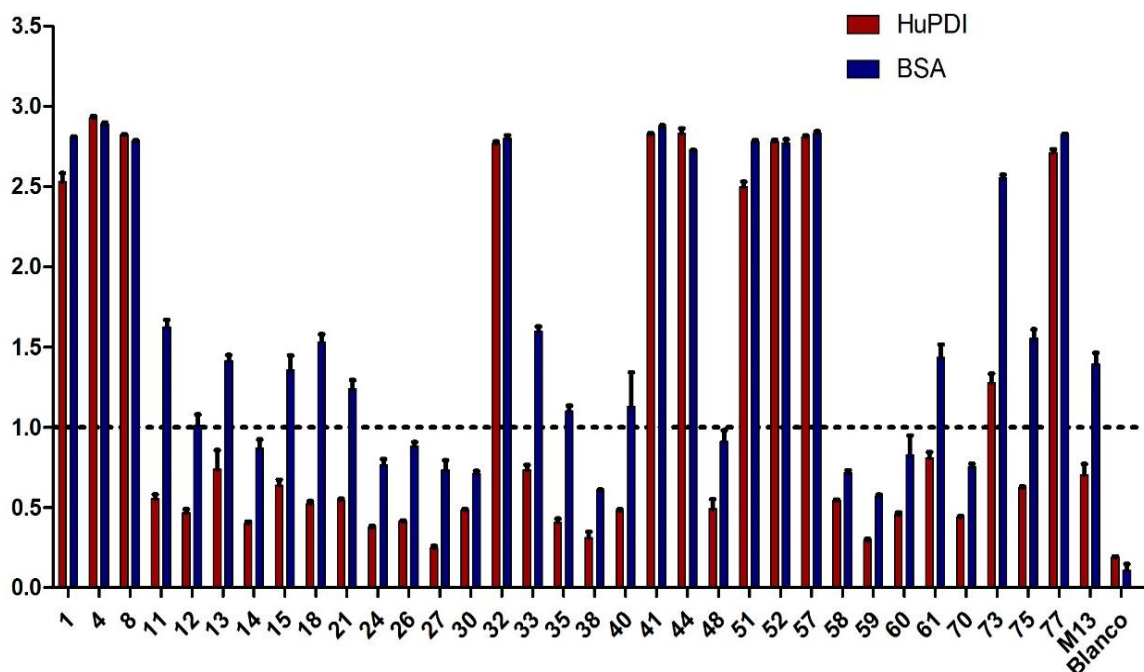


Figura 9. Análisis preliminar de los heptapéptidos con potencial de unión a HuPDI.

El eje X indica el número de la UFP seleccionada (HuPDI_{XX}), en tanto el eje Y muestra el valor de A_{450} obtenido en el ensayo de *ELISA* semi-cuantitativo indirecto. La UFP HuPDI₁₄ (NH₂-ATANVRI) y el bacteriófago M13KE fueron utilizados como controles negativos. Las barras representan el promedio y el error estándar de tres determinaciones. Fueron considerados significativos los valores de reconocimiento a HuPDI (rojo) superior a una unidad de A_{450} (línea punteada).

4.4. Análisis cuantitativo de los heptapéptidos con potencial de unión a HuPDI

En consideración a los resultados obtenidos en el análisis semi-cuantitativo, se seleccionaron 4 UFP para valorar cuantitativamente el reconocimiento a HuPDI: HuPDI₀₄ y HuPDI₄₄ del grupo D, HuPDI₅₁ del grupo F, y HuPDI₇₃ del grupo E (Tabla IV). Además, M13KE, HuPDI₅₉ y HuPDI₂₄ fueron utilizados como controles negativos. Inicialmente, el título de bacteriófagos fue amplificado hasta obtener valores mayores a 10^{11} UFP/mL. Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas 1:3 de cada amplificado. Finalmente, el reconocimiento a HuPDI fue realizado por duplicado, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (*ELISA* semi-cuantitativo indirecto).

Interesantemente, el reconocimiento de HuPDI04, HuPDI51, y HuPDI73 mantuvo un comportamiento ascendente prometedor, con tendencia sigmoidea (Figura 10). Sin embargo, el comportamiento de HuPDI44 fue ligeramente positivo, con proyección limitada. A pesar de esto, es posible considerarla como prometedora, ya que se ha observado que algunas UFP con alta capacidad de reconocimiento presentan una limitada capacidad de amplificación, como es el caso para esta UFP [Bignone, 2013].

Desafortunadamente, no fue posible alcanzar el valor máximo de absorbancia (A_{450} máxima) en ninguna de las tendencias, por lo que no fue posible estimar la constante de disociación (K_D) para modelos dosis-respuesta convencionales. Por tal motivo, otros parámetros fueron aplicados para demostrar el potencial de reconocimiento de los bacteriófagos hacia la HuPDI.

Los datos obtenidos se graficaron considerando la A_{450} en función del $\log T$ (donde T es el título en UFP/mL); enseguida, se aplicó un modelo de ajuste de regresión lineal

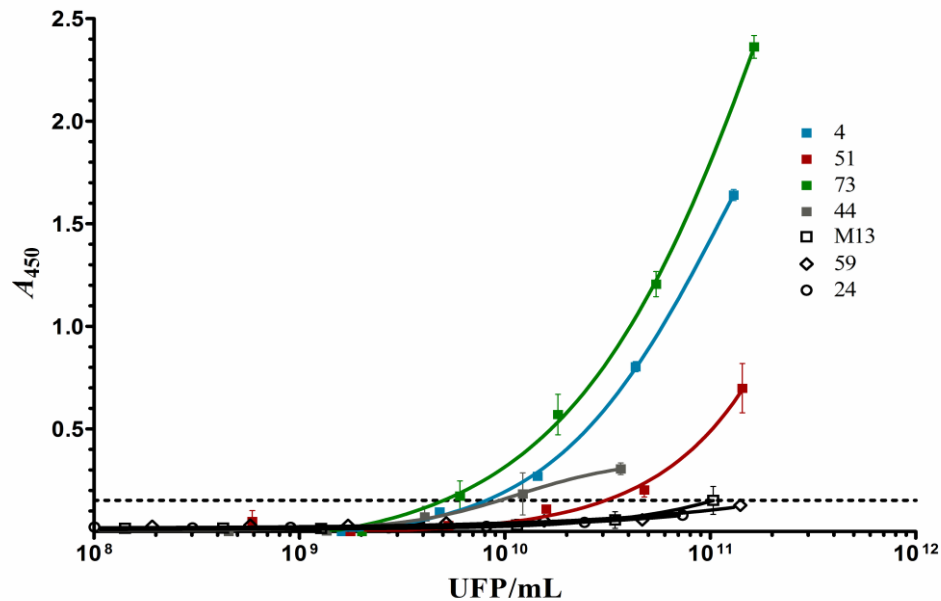


Figura 10. Representación gráfica de la unión de los bacteriófagos a HuPDI (representada por A_{450}) con respecto a su título (UFP/mL).

La línea punteada representa el valor basal, todos aquellos por debajo de ese fueron considerados no significativos.

segmentada y se obtuvieron dos parámetros, los cuales resultaron útiles para calcular la *Razón de Reconocimiento*: el umbral de reconocimiento (U), que representa el título de bacteriófagos necesario para obtener un valor de A_{450} mayor que cero; y la razón m (pendiente), que representa la relación de cambio de la A_{450} por cada unidad log del título de bacteriófagos ($\log T$).

HuPDI73 y HuPDI04 exhibieron los valores de *Razón de Reconocimiento* más altos, seguidos de HuPDI51 (Tabla V, Figura 11). Sin embargo, HuPDI44 levemente superó el valor basal. Los resultados obtenidos pueden ser interpretados de la siguiente manera: el valor de *Razón de Reconocimiento* es mayor cuando una molécula (ligando) exhibe una baja K_D ; tal como se puede inferir para HuPDI73, HuPDI04, y HuPDI51.

Tabla V. Parámetros del reconocimiento de las UFP seleccionadas contra HuPDI.

UFP seleccionada		Umbral de Reconocimiento (U)		Razón m	<i>Razón de Reconocimiento</i>
Nombre	T (UFP/mL)	$\log U$	U (UFP/mL)	$\Delta A_{450}/\log T$	$m/\log U$
HuPDI04	3.09×10^{11}	9.998	9.96×10^9	1.436	0.144
HuPDI51	4.30×10^{11}	10.490	3.09×10^{10}	1.040	0.099
HuPDI73	4.90×10^{11}	9.988	9.96×10^9	1.878	0.188
HuPDI44	1.10×10^{11}	9.357	2.28×10^9	0.246	0.026
M13KE	3.10×10^{11}	10.330	2.14×10^{10}	0.200	0.019
HuPDI59	4.20×10^{11}	9.537	3.44×10^9	0.055	0.006
HuPDI24	2.20×10^{11}	9.739	5.48×10^9	0.057	0.006

4.5. HuPDI73, HuPDI04, HuPDI51, y HuPDI44 despliegan heptapéptidos con potencial de unión a HuPDI

Las secuencias heptapeptídicas desplegadas por HuPDI73, HuPDI04, HuPDI51, y HuPDI44 comparten varios residuos de aminoácidos con propiedades polares y que pueden presentar carga eléctrica positiva (Tabla VI); *p. ej.* histidina y arginina.

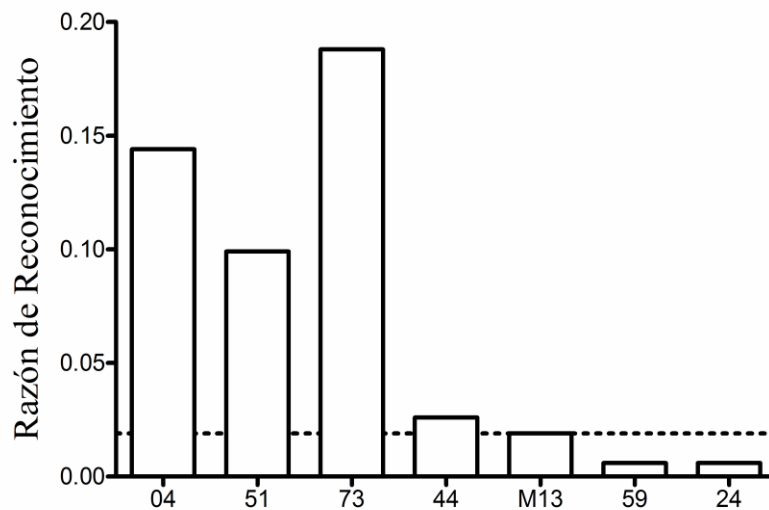


Figura 11. Análisis de la *Razón de Reconocimiento* de los bacteriófagos que despliegan heptapéptidos de unión a HuPDI.

M13KE representa el blanco (no expresa heptapéptidos) y traza la línea basal, y 59 y 24 son controles negativos.

Finalmente, cabe enfatizar que HuPDI44 mostró una baja *Razón de Reconocimiento*, lo cual puede ser el reflejo de su baja eficiencia de amplificación. Interesantemente, ésta comparte una alta identidad con HuPDI04 (sólo difieren en un aminoácido), lo que probablemente restrinja su capacidad de replicación.

Tabla VI. Secuencias con potencial de unión a HuPDI.

UFP	Secuencia
HuPDI04	NH ₂ -HHPIITYV
HuPDI44	NH ₂ -HHPIRYV
HuPDI51	NH ₂ -GETRAPL
HuPDI73	NH ₂ -HAIYPRH

5. CONCLUSIONES

Los bacteriófagos M13KE que despliegan en su superficie a los heptapéptidos NH₂-HHPITYV (clona 4), NH₂-GETRAPL (clona 51), y NH₂-HAIYPRH (clona 73) muestran un alto grado de reconocimiento a la proteína HuPDI; de igual manera, aunque en menor medida, aquel que despliega a NH₂-HHPIRYV (clona 44). HuPDI04 y HuPDI44 despliegan heptapéptidos con alta identidad (HHPIxYV; 6/7; 86%), indicativo del potencial de unión de estos residuos a una región (probablemente compartida) de la proteína HuPDI. Aún cuando falta confirmar el potencial inhibidor o modulador de las funciones de la HuPDI, los cuatro heptapéptidos identificados ofrecen una oportunidad para el diseño de fármacos basado en “péptido-mimética” o en “estructura molecular”. El aislamiento y selección de péptidos de unión a moléculas blanco de interés biomédico, mediante el tamizado de bibliotecas desplegadas en superficie de bacteriófagos, representa una estrategia metodológica viable para identificar moléculas con potencial terapéutico contra enfermedades en humanos. La inhibición de proteínas de la respuesta a estrés del retículo endoplásmico, como PDI o BiP, es de gran relevancia médica, ya que durante procesos proliferativos (*p. ej.* cáncer), éstas aumentan de concentración en respuesta a la constante demanda de producción de proteínas correctamente plegadas (mecanismo para evadir la apoptosis).

Perspectivas

El presente proyecto representa la etapa inicial para identificar secuencias peptídicas con potencial terapéutico dirigidas contra las funciones de la enzima proteína disulfuro isomerasa de humano (HuPDI). La siguiente etapa consiste en utilizar los péptidos identificados como inhibidores o moduladores de la función chaperona o las actividades catalíticas de la enzima HuPDI. Con estos estudios se obtendrán parámetros importantes para el diseño racional de fármacos, como son las constantes de disociación (K_D), de inhibición (K_i) y la concentración media inhibidora (IC_{50}).

6. REFERENCIAS

- Abromaitis S & Stephens RS. Attachment and entry of *Chlamydia* have distinct requirements for host protein disulfide isomerase. PLoS Pathogens. 2009; 5(4): e1000357.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, *et al.* Molecular Biology of the Cell, 4th Edition. New York: Garland Science; 2002.
- Alur M, Nguyen MM, Eggener SE, *et al.* Suppressive roles of calreticulin in prostate cancer growth and metastasis. The American Journal of Pathology. 2009; 175(2): 882–9.
- Back SH & Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. Annu Rev Biochem. 2012; 81: 767–93.
- Bender T, Lewrenz I, Franken S, *et al.* Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. Molecular Biology of the cell. 2011; 22: 541–54 .
- Ben-Lulu S, Ziv T, Weisman-Shomer P & Benhar M. A substrate trapping approach identifies proteins regulated by reversible S-nitrosylation. Mol Cell Proteomics. 2014, doi: 10.1074/mcp.M114.038166.
- Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L. Biochemistry, 5th Edition. New York: W. H. Freeman; 2002.
- Bignone PA, Krupa RA, Sternberg H, *et al.* Identification of human embryonic progenitor cell targeting peptides using phage display. PLoS One. 2013; 8(3): e58200.
- Braakman I & Hebert DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013; 5: a013201.
- Bravo R, Parra V, Gatica D, *et al.* Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. Int Rev Cell Mol Biol. 2013; 301: 215–90.

- Buck TM, Wright CM & Brodsky JL. The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol.* 2008. 18(6): 751-61.
- Campolo N, Bartesaghi S & Radi R. Meta-catalyzed protein tyrosine nitration in biological systems. *Redox Rep.* 2014; 19(6): 221-31
- Coe H, Bedard K, Groenendyk J, Jung & Michalak M. Endoplasmic reticulum stress in the absence of calnexin. *Cell Stress and Chaperones.* 2008; 13: 497–507.
- Costa AR, Rodrigues ME, Henriques M, *et al.* Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Crit Rev Biotechnol.* 2013, doi:10.3109/07388551.2013.79364.
- Delom F & Chevet E. Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Science.* 2006; 4: 15.
- Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, *et al.* Learning from bacteriophages – advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci.* 2012; 13(8): 699–722.
- Fonseca SG, Burcin M, Gromada J & Urano F. Endoplasmic reticulum stress in beta cells and development of diabetes. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9(6): 736–70.
- Fu XM, Wang P & Zhu BT. Characterization of the estradiol-binding site structure of human protein disulfide isomerase (PDI). *PLoS One.* 2011; 6(11): e27185.
- Furie B & Flaumenhaft R. Thiol isomerases in thrombus formation. *Circ Res.* 2014; 114: 1162–73.
- Gershenson A & Gierasch LM. Protein folding in the cell: challenges and progress. *Curr Opin Struct Biol.* 2011; 21(1): 32–41.
- Gilligan JJ & Petersen DR. The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum Genomics.* 2012; 6: 6.
- Gowthaman U, Jayakanthan M & Sundar D. Molecular docking studies of dithionitrobenzoic acid and its related compounds to protein disulfide isomerase: computacional screening of inhibitors to HIV-1 entry. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9(12): S14.

- Hong BX & Soong L. Identification and enzymatic activities of four protein disulfide isomerase (PDI) isoforms of *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res.* 2008; 102(3): 437–46.
- Jakob PR, Zoldák G, Aumüller T & Schimd FX. Chaperone domains convert prolyl isomerases into generic catalysts of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(48): 20282-7.
- Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, *et al.* Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest.* 2012; 122(6): 2104-13.
- Kivirikko KI & Pihlajaniemi T. Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1998; 72: 325-98.
- Kosuri P, Alerge-Cebollada J, Feng J, *et al.* Protein folding drives disulfide formation. *Cell.* 2012; 151(4): 794-806.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, *et al.* *Molecular Cell Biology*, 4th Edition. New York: W. H. Freeman. 2000.
- Muchowicz A, Firczuk M, Chlebowska J, *et al.* Adenanthin targets proteins involved in the regulation of disulphide bonds. *Biochem Pharmacol.* 2014; 89(2): 210-6.
- Muller C, Bandemer J, Vindis C, *et al.* Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18(7): 731-42.
- Neelamegham S & Liu G. Systems glycobiology: biochemical reaction networks regulating glycan structure and function. *Glycobiology.* 2011; 21(12): 1541-53.
- Niforou K, Cheimonidou C & Trougakos IP. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol.* 2014. 30; 2: 323-32.
- Pacher P, Beckman JS & Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1): 315-424.
- Powers-Fletcher MV, Jambunathan K, Brewer JL, *et al.* Impact of the lectin chaperone calnexin on the stress response, virulence and proteolytic secretome of the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One.* 2011; 6(12): e 28865.

- Ruzza P. Peptides and Peptidomimetics in Medicinal Chemistry. In Medicinal Chemistry and Drug Design. Deniz Ekinici (Ed.), 2012; 14: 297-314.
- Sadava D, Heller G, Orians G, Purves W, Hillis D. VIDA: la ciencia de la biología. 8va. Edición. Editorial Médica Panamericana, 2009.
- Sakoh-Nakatogawa M, Nishikawa S & Endo T. Roles of protein-disulfide isomerase-mediated disulfide bond formation of yeast Mnl1P in endoplasmic reticulum-associated degradation. J Biol Chem. 2009; 284(18): 11815-25.
- Salmans ML, Zhao F & Andersen B. The estrogen-regulated anterior gradient 2 (AGR2) protein in breast cancer: a potential drug target and biomarker. Breast Cancer Res. 2013; 15(2): 204.
- Stantchev TS, Paciga M, Lankford CR, *et al.* Cell-type specific requirements for thiol/disulfide exchange during HIV-1 entry and infection. Retrovirology. 2012; 9: 97.
- Svedruzic ZM, Popovic K & Sendula-Jengic V. Modulators of γ -secretase activity can facilitate the toxic side-effects and pathogenesis of Alzheimer's disease. PLoS One. 2013; 8(1): e50759.
- Tang HY, Huang CH, Zhuang YH, *et al.* EDEM 2 and OS-9 are required for ER-associated degradation of non-glycosylated sonic hedgehog. PLoS One. 2014; 9(6): e921.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.* Essentials of Glycobiology. 2nd Edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- Vekich JA, Belmont PJ, Thuerlauf DJ & Glembostki CC. Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death. J Mol Cell Cardiol. 2012; 53(2): 259-67.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, *et al.* The sequence of the human genome. Science. 2001; 291(5507): 1304-51.
- Vitello AM, Du Y, Buttrick PM & Walker LA. Serendipitous discovery of a novel protein signaling mechanism in heart failure. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 421(3): 431-5

- Walker AK & Atkin JD. Mechanism of neuroprotection by protein disulphide isomerase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int*. 2011;2011:317340.
- Wang SB, Shi Q, Xu Y, *et al*. Protein disulfide isomerase regulates endoplasmic reticulum stress and the apoptotic process during Prion infection and PrP mutant-induced cytotoxicity. *PLoS One*. 2012; 7(6): e38221.
- Wilkinson B & Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1699(1-2): 35-44.
- Xu S, Butkevich AN, Yamada R, *et al*. Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(40): 16348-53
- Xu S, Sankar S & Neamati N. Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discov Today*. 201; 19(3): 222-40.