

ANÁLISIS MUTAGÉNICO Y CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD OXIDASA DE UNA ENZIMA PROTEÍNA DISULFURO ISOMERASA (PDI) DE *Entamoeba histolytica*

Mares R.E., Licea A.F., Cornejo-Bravo J.M., Ramos M.A.

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Calzada Tecnológico 14418, Mesa de Otay 22390. Tijuana, B.C. México. Tel/Fax: (664) 682-2790. E-mail: rmares@uabc.mx.

La oxidación de los residuos de cisteína (Cys, C) es importante para el plegamiento correcto de proteínas cuya estructura nativa está estabilizada por enlaces disulfuro. En células eucariotas, la enzima proteína disulfuro isomerasa (PDI, EC 5.3.4.1) cataliza las reacciones de oxidación, reducción e isomerización de enlaces disulfuro en los polipéptidos nacientes. Las enzimas PDI se caracterizan por la presencia de dominios tiorredoxina (Trx), los cuales contienen el motivo estructural CXXC en su sitio activo. Varios estudios han demostrado que los residuos de Cys ciclan entre los estados de oxidación ditiol/disulfuro durante las actividades enzimáticas de PDI (Wilkinson B., *Biochim Biophys Acta* 2004;1699:35).

Para *Entamoeba histolytica*, el agente causal de la amibiasis en humanos, es importante la correcta formación de enlaces disulfuro en algunas de las proteínas involucradas en mecanismos de adhesión y destrucción de tejidos. Aunque existen 11 secuencias de PDI anotadas en la base de datos del genoma de *E. histolytica* (Ramos M.A., *Comput Biol Chem* 2008;32:66), hasta el momento sólo una enzima, *EhPDI*, ha sido caracterizada funcionalmente *in vivo* (Ramos M.A., *Mol Biochem Parasitol* 2005;143:236). El hecho de que *E. histolytica* exprese proteínas con actividad PDI sugiere una función importante en los mecanismos de virulencia del parásito y su potencial como molécula blanco para el diseño inhibidores específicos.

Con el objetivo de estudiar el papel funcional de los dominios Trx y la participación de los residuos de Cys en la actividad oxidorreductasa de la enzima *EhPDI*, realizamos sustituciones sitio-dirigidas (Cys → Ser) y evaluamos su actividad ditiol/disulfuro oxidasa *in vivo*. Estructuralmente, *EhPDI* contiene dos dominios Trx cuyos sitios activos poseen el motivo estructural ^NCGHC^C. Al reemplazar los átomos de azufre por oxígeno no existe un impacto significativo en la habilidad de PDI para unirse a los polipéptidos; es decir, no se alteran las funciones no enzimáticas (Laboissiere M.C., *J Biol Chem* 1995;270:28006). Los resultados muestran que la actividad ditiol/disulfuro oxidasa de la enzima *EhPDI* depende de los residuos de Cys presentes en los sitios activos. Sin embargo, la participación individual cada residuo no es equivalente, ya que la presencia o ausencia de la Cys en la posición amino (^NC) afecta significativamente la actividad enzimática. Por otro lado, existe una equivalencia funcional entre los dominios Trx, ya que cuando uno de éstos ha sido inactivado (doble mutación, SGHS) no se observa cambio en la actividad ditiol/disulfuro oxidasa, comparada con la actividad de la enzima silvestre. Aún más, la actividad ditiol/disulfuro oxidasa depende completamente de sus residuos Cys, ya que la ausencia completa de estos (mutante cuádruple) ocasiona una pérdida total de la actividad.