

## EVALUACION DE LA ACTIVIDAD OXIDORREDUCTASA DE UNA PROTEINA DISULFURO ISOMERASA (PDI) AMIBIANA

Ramos M.A., Magaña P.D., Mares R.E., Rivas D.I., Noriega E.

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Calzada Tecnológico 14418, Mesa de Otay 22390. Tijuana, B.C. México. Tel: (664)682-1033. Fax: (664)682-2790. e-mail: mramos@uabc.mx

En células eucariotas, durante el paso de los polipéptidos nacientes por el retículo endoplásmico, la enzima proteína disulfuro isomerasa (PDI, E.C. 5.3.4.1) cataliza las reacciones de oxidación, reducción e isomerización de enlaces disulfuro. Para *Entamoeba histolytica*, el agente causal de la amibiasis en humanos, es importante la correcta formación de enlaces disulfuro de proteínas que tienen una participación clave en su estilo de vida parasitario.

Mediante un análisis post-genómico, identificamos 11 secuencias codificantes para enzimas PDI en el genoma de *E. histolytica* (Ramos M.A., Comput Biol Chem 2008;32(1):66). Adicionalmente, en un estudio de complementación funcional identificamos una enzima de la familia PDI amibiana (*EhPDI*) que exhibe actividad ditiol/disulfuro oxidasa *in vivo* (Ramos M.A., Mol Biochem Parasitol 2005;143(2):236). Sin embargo, existe poco conocimiento de la función o participación de estas enzimas en el mecanismo de oxido-reducción ditiol/disulfuro de proteínas amibianas. Con el objetivo de estudiar las actividades bioquímicas de la oxidorreductasa amibiana *EhPDI*, hemos purificado la proteína recombinante y evaluado sus actividades de oxido-reducción *in vitro*.

La proteína recombinante *EhPDI* fue expresada en *E. coli* y purificada mediante cromatografía (de afinidad a níquel y de exclusión molecular). La actividad disulfuro reductasa fue analizada mediante un ensayo de reducción de insulina (Holmgren A., J Biol Chem 1979;254:9627); en tanto que las actividades ditiol/disulfuro oxidasa o isomerasa fueron estudiadas mediante ensayos de replegamiento oxidativo de lisozima (Katiyar S., Biochim Biophys Acta 2001;1548:47). Tal como se había previsto, mediante un análisis bioinformático de la relación estructura-función, los resultados demostraron que la enzima *EhPDI* exhibe las tres actividades de oxido-reducción. Además, algo importante de remarcar, estas actividades pueden ser inhibidas; es decir, se observó pérdida de la función oxidorreductora cuando *EhPDI* fue incubada con inhibidores específicos para enzimas de la familia PDI, tales como el antibiótico bacitracina o los agentes alquilantes 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) y 4,4'-ditioldipiridina.

El conocimiento de las actividades enzimáticas de la oxidorreductasa *EhPDI* permite especular acerca de algunas posibles aplicaciones, tales como facilitadora del plegamiento correcto de proteínas purificadas en condiciones desnaturalizantes y reductoras o como molécula blanco para el diseño de nuevos inhibidores específicos dirigidos contra la enzima amibiana. Por otro lado, utilizando estos procedimientos como métodos generales de evaluación de la actividad oxidorreductasa será posible realizar estudios bioquímicos de otras enzimas de la familia PDI amibiana. Aún más, será posible identificar algunos de sus sustratos naturales, tales como quitinasa o cisteína proteinasas, y estudiar su participación en el correcto plegamiento de estos factores de virulencia.