

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Obtención y caracterización
bioquímica y funcional de la enzima
recombinante nicotinamida/nicotinato
mononucleótido adenilil transferasa
de *Leishmania braziliensis*
(LbNMNAT)**

Luis Ernesto Contreras Rodríguez, BSc

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2016

**Obtención y caracterización
bioquímica y funcional de la enzima
recombinante nicotinamida/nicotinato
mononucleótido adenilil transferasa
de *Leishmania braziliensis*
(LbNMNAT)**

Luis Ernesto Contreras Rodríguez, BSc

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias-Química

Directora:

Dr rer nat. Maria Helena Ramirez Hernandez

Línea de Investigación:

Bioquímica

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Investigaciones básicas en bioquímica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2016

Resumen

En términos estructurales y funcionales, las proteínas son las macromoléculas biológicas más diversas de los seres vivos. Las enzimas, una clase especial de proteínas, se caracterizan por su capacidad de disminuir la energía de activación de las reacciones bioquímicas. A pesar de su relevancia, la mayoría de enzimas no pueden ejercer su función por sí solas y requieren moléculas adicionales, denominadas cofactores, para catalizar sus reacciones. El dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD), es un cofactor orgánico (co-enzima) que junto con su derivado fosforilado (NADP), son empleados en reacciones de óxido-reducción propias del metabolismo energético y la defensa ante el estrés oxidativo. Adicionalmente, el NAD es utilizado como sustrato por proteínas que regulan funciones celulares esenciales que incluyen reparación de ADN, expresión genética y señalización, entre otras.

La importancia celular del NAD, ha impulsado numerosas investigaciones enfocadas en develar los componentes y la dinámica de su biosíntesis en diversos modelos biológicos. Los resultados obtenidos han indicado que el NAD puede ser sintetizado a partir de diferentes precursores químicos que recorren rutas bioquímicas únicas conocidas como las vías de reciclaje y *de novo* de biosíntesis del NAD. A pesar de sus diferencias, ambas vías convergen en el punto común catalizado por la enzima nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT EC: 2.7.7.1/18). Esta proteína se ha caracterizado en representantes de los tres dominios de la vida y se ha enfocado como blanco farmacológico contra el cáncer y diversos organismos patogénicos de humanos.

El presente estudio expone los resultados de la caracterización bioquímica de la proteína NMNAT de *Leishmania braziliensis*, patógeno eucariota capaz de infectar al hombre y que en Colombia representa un problema de salud pública. La investigación incluyó el análisis de aspectos estructurales y funcionales de la NMNAT del parásito. Las evidencias obtenidas indicaron diferencias notables entre la proteína analizada en

relación con los homólogos humanos, sugiriendo que el proceso de biosíntesis del NAD en *Leishmania* es un blanco farmacológico promisorio.

Palabras clave: dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD), *Leishmania braziliensis*, nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT).

Abstract

Proteins are the most diverse biological macromolecules in terms of function and structure. Among proteins, enzymes are of special interest owing to their ability to lower the activation energy of biochemical reactions. Despite of their relevance, most of enzymes require additional molecules referred to as cofactors, to act appropriately. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and its phosphorylated form (NADP) are organic cofactors or co-enzymes involved in REDOX reactions. These reactions play fundamental roles not only in energy metabolism but also in defense mechanism against oxidative stress. Moreover, NAD serves as substrate for many proteins involved in cellular functions such as DNA repair, genetic expression, and signaling.

Several studies have been devoted to discover the components and dynamics related to NAD's biosynthetic process in different biological models. To date, numerous chemical precursors have been identified. These molecules go through unique biochemical routes denoted to as salvage and *de novo* NAD biosynthetic pathways. The single common step shared by these routes is represented by the central enzyme nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT, 2.7.7.1/18). NMNATs from archaea, eubacteria and eukarya have been characterized and focused as pharmacological targets in cancer and human pathogenic organisms.

This dissertation indicates the results from the biochemical study of *Leishmania braziliensis* NMNAT. The mentioned parasite affects human beings and currently is a public health issue in Colombia. Several structural and functional aspects of the parasite's NMNAT protein were investigated. The results obtained in this work support the conclusion that *Leishmania* NAD biosynthetic process is quite different in contrast with the human counterpart. Therefore, this process is a promising pharmacological target against the pathogen.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT).

Contenido

	Pág.
Resumen	V
Abstract	VII
Lista de figuras	XII
Lista de tablas	XVI
Lista de abreviaturas	XVIII
Introducción	1
1. Marco teorico	3
1.1 Leishmaniasis: epidemiología y estrategias de control	3
1.2 Ciclo de vida de Leishmania	6
1.3 Dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD)	7
1.4 Biosíntesis del NAD	10
1.5 Nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT, EC 2.7.7.1/18)	13
1.5.1 Unión a sustratos por las NMNATs.....	15
1.5.2 Organización oligomérica de las NMNATs.....	16
1.5.3 Dominios exclusivos de las NMNATs.....	17
1.5.4 Funciones adicionales de las NMNATs.....	18
1.6 Metabolismo del NAD en <i>Leishmania</i>	19
2. Justificación	21

3. Objetivos.....	22
3.1 Objetivo general.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. Preguntas de investigación.....	24
5. Materiales y métodos.....	25
5.1 Metodología general.....	25
5.2 Metodología detallada.....	32
5.3 Otros protocolos.....	55
6. Resultados.....	58
6.1 La proteína recombinante His-LbNMNAT se obtuvo en fracciones solubles...58	
6.2 Purificación de la proteína recombinante His-LbNMNAT.....	62
6.3 Análisis de la estructura cuaternaria de la proteína recombinante His-LbNMNAT.....	69
6.4 Caracterización enzimática de la proteína recombinante His-LbNMNAT.....	80
6.5 Localización celular de la proteína LbNMNAT en <i>L. braziliensis</i>	91
6.6 Efecto deletéreo de inserciones exclusivas de la proteína LbNMNAT.....	123
6.7 Análisis de los niveles de expresión genética de la LbNMNAT.....	132
6.8 Reconstrucción del metabolismo del NAD en <i>Leishmania</i>	139
7. Discusión.....	149
7.1 Solubilización de la proteína recombinante His-LbNMNAT.....	150
7.2 Organización oligomérica de la proteína recombinante His-LbNMNAT.....	152
7.3 Propiedades enzimáticas de la proteína recombinante His-LbNMNAT.....	155
7.4 Detección de la proteína LbNMNAT.....	158
7.5 Localización intracelular de la proteína LbNMNAT.....	160
7.6 Relevancia funcional de las inserciones exclusivas de la proteína LbNMNAT.....	162
7.7 Expresión genética de la NMNAT en <i>L. braziliensis</i>	164

7.8 Reconstrucción del metabolismo del NAD en <i>Leishmania</i>	167
8. Conclusiones y recomendaciones.....	169
8.1 Conclusiones.....	169
8.2 Recomendaciones.....	171
Anexo A: Mapa, análisis y secuencia del plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT (LC 1).....	173
Anexo B: Mapa del plásmido recombinante pSP72RαLbNMNAT-GFP (LC2).....	177
Anexo C: Mapa del plásmido recombinante pET100-LbNMNATΔ1-43.....	178
Anexo D: Mapa del plásmido recombinante pQE30-LbNMNATΔ241-249.	180
Anexo E: Expresión de la proteína recombinante His-LbNMNAT en diferentes sistemas de expresión bacterianos.....	181
Anexo F: Cromatogramas de proteínas patrón, inyectadas por separado, en la columna de exclusión molecular.....	182
Anexo G: Curvas de calibración de ATP y NAD.....	183
Anexo H: Curvas de calibración para los genes <i>40s</i> y <i>lbnmnat</i>.....	184
Bibliografía.....	185

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Distribución geográfica de CL y VL reportadas en el Nuevo Mundo.....	5
Figura 1-2: Diagrama esquemático del ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	6
Figura 1-3: Estructura del NAD.....	9
Figura 1-4: Funciones del NAD.....	10
Figura 1-5: Biosíntesis del NAD.....	11
Figura 1-6: Arquitectura de las NMNATs.....	16
Figura 1-7: Estructura cuaternaria de algunas NMNATs.....	18
Figura 5-1: Metodología general para obtener la proteína recombinante His-LbNMNAT en fracciones solubles.....	26
Figura 5-2: Metodología general para caracterizar enzimáticamente la proteína recombinante His-LbNMNAT.....	28
Figura 5-3: Metodología general para determinar la localización subcelular de la proteína LbNMNAT en el parásito.....	30
Figura 5-4: Producción y evaluación de anticuerpos policlonales anti His-LbNMNAT.....	30
Figura 6-1: La proteína recombinante His-LbNMNAT expresada desde el plásmido pET100 se acumula en la fracción insoluble del sistema de expresión <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	59
Figura 6-2: Solubilización parcial de la proteína recombinante His-LbNMNAT bajo distintas condiciones experimentales.....	60
Figura 6-3: Construcción del plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT y expresión de la proteína His-LbNMNAT.....	61
Figura 6-4: Purificación parcial de la proteína recombinante His-LbNMNAT mediante IMAC.....	64

Figura 6-5:	Optimización de la purificación de la proteína recombinante His-LbNMNAT mediante IMAC.....	65
Figura 6-6:	Purificación de las proteínas recombinantes control His-HsNMNAT1 y 3 mediante IMAC.....	66
Figura 6-7:	La proteína recombinante His-LbNMNAT purificada de manera parcial es catalíticamente activa.....	67
Figura 6-8:	Confirmación de la actividad enzimática de la proteína recombinante His-LbNMNAT parcialmente purificada.....	68
Figura 6-9:	Análisis de la proteína recombinante His-LbNMNAT mediante SEC.....	71
Figura 6-10:	Análisis de la proteína recombinante His-HsNMNAT1 mediante SEC.....	71
Figura 6-11:	Análisis de proteínas patrón mediante SEC.....	73
Figura 6-12:	Análisis de la proteína recombinante His-LbNMNAT nativa mediante PAGE.....	76
Figura 6-13:	Análisis de proteínas nativas mediante PAGE.....	77
Figura 6-14:	Determinación de los coeficientes de retardo (K_r) de las proteínas patrón analizadas mediante PAGE.....	78
Figura 6-15:	Gráfico de Ferguson.....	79
Figura 6-16:	Determinación de los coeficientes de retardo (K_r) de las 4 bandas de la proteína His-LbNMNAT analizada mediante PAGE.....	79
Figura 6-17:	El sistema de expresión <i>E. coli</i> BL21 (DE3) no exhibe actividad enzimática de NMNAT.....	81
Figura 6-18:	Estudio enzimático de la proteína His-LbNMNAT.....	82
Figura 6-19:	Condiciones óptimas de actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT.....	84
Figura 6-20:	Determinación de los parámetros cinéticos de la proteína His-LbNMNAT.....	86
Figura 6-21:	La proteína recombinante His-LbNMNAT sintetiza NAAD.....	90
Figura 6-22:	Aislamiento y cuantificación del antígeno His-LbNMNAT a partir de CI.....	92
Figura 6-23:	Evaluación de los sueros anti His-LbNMNAT mediante ELISA.....	94
Figura 6-24:	Evaluación de los anticuerpos anti His-LbNMNAT mediante Western blot.....	95

Figura 6-25:	Immunodetección cruzada de diferentes NMNATs con los anticuerpos anti His-LbNMNAT.....	97
Figura 6-26:	Evaluación de diferentes extractos proteicos totales de promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	98
Figura 6-27:	Evaluación de fracciones proteicas solubles e insolubles de promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	99
Figura 6-28:	Ensayos de inmunodetección sobre promastigotes de diferentes especies del género <i>Leishmania</i>	100
Figura 6-29:	Ensayos de inmunodetección utilizando diferentes anticuerpos sobre extractos totales de promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	101
Figura 6-30:	Detección de la proteína “LbNMNAT” empleando anticuerpos anti His-TcNMNAT.....	102
Figura 6-31:	Evaluación del extracto soluble de proteínas de promastigotes de <i>L. braziliensis</i> mediante electroforesis 2D y Western blot.....	103
Figura 6-32:	Aislamiento del antígeno His-LbNMNAT a partir de CI y SDS-PAGE preparativo.....	104
Figura 6-33:	Detección de la proteína “LbNMNAT” empleando los nuevos anticuerpos anti His-LbNMNAT.....	105
Figura 6-34:	Inmuno-precipitación de la proteína “LbNMNAT” empleando los nuevos anticuerpos anti His-LbNMNAT.....	106
Figura 6-35:	Localización subcelular de la proteína LbNMNAT en promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	107
Figura 6-36:	Ensayo de inmunofluorescencia sobre promastigotes de <i>L. braziliensis</i> empleando el suero no relacionado.....	109
Figura 6-37:	Localización subcelular de la proteína LbNMNAT en promastigotes de <i>L. braziliensis</i> empleando los anticuerpos anti His-LbNMNAT nativos.....	111
Figura 6-38:	Localización subcelular de la proteína LbNMNAT en promastigotes de <i>L. braziliensis</i> empleando los anticuerpos anti His-TcNMNAT.....	112
Figura 6-39:	Localización subcelular de la proteína LbNMNAT en promastigotes de <i>Leishmania</i> del Viejo y Nuevo Mundo.....	114
Figura 6-40:	Construcción del vector recombinante pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP...	115
Figura 6-41:	Expresión de la proteína LbNMNAT-GFP en promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	117

Figura 6-42:	Localización subcelular de la proteína LbNMNAT-GFP en promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	119
Figura 6-43:	Localización subcelular de la proteína LbNMNAT-GFP en amastigotes intracelulares de <i>L. braziliensis</i>	121
Figura 6-44:	Alineamiento múltiple de proteínas de la NMNAT de diferentes especies de <i>Leishmania</i> y las iso-enzimas humanas HsNMNAT1-3.....	124
Figura 6-45:	Purificación de la proteína recombinante His-LbNMNAT Δ 1-43 mediante IMAC.....	125
Figura 6-46:	La inserción amino terminal de la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 es necesaria para su actividad enzimática <i>in vitro</i>	125
Figura 6-47:	Modelos predictivos generados mediante el método de hilvanado para las proteínas His-LbNMNAT e His-LbNMNAT Δ 1-43.....	127
Figura 6-48:	Análisis de las proteínas recombinantes His-LbNMNAT e His-LbNMNAT Δ 1-43 nativas mediante PAGE y Western blot.....	128
Figura 6-49:	Análisis de las proteínas recombinantes His-LbNMNAT e His-LbNMNAT Δ 1-43 nativas mediante PAGE.....	128
Figura 6-50:	Expresión de la proteína recombinante His-LbNMNAT Δ 241-249 bajo distintas condiciones experimentales.....	130
Figura 6-51:	Carácter hidrofóbico de los modelos LbNMNAT y LbNMNAT Δ 241-249.....	131
Figura 6-52:	Expresión relativa del gen <i>lbnmnat</i> con respecto a genes de referencia en promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	133
Figura 6-53:	Expresión del transcrito <i>nmnat</i> en <i>L. infantum</i> y <i>L. major</i> a través de sus ciclos de vida.....	134
Figura 6-54:	Los niveles de expresión de la proteína LbNMNAT no varía drásticamente entre promastigotes y amastigotes axénicos de <i>L. braziliensis</i>	135
Figura 6-55:	Determinación del IC ₅₀ para H ₂ O ₂ sobre promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	137
Figura 6-56:	El estrés oxidativo no altera los niveles transcripcionales de expresión del gen <i>lbnmnat</i> en promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	138
Figura 6-57:	El estrés oxidativo altera los niveles de expresión de la proteína LbNMNAT en promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	138
Figura 6-58:	Reconstrucción del metabolismo del NAD en <i>Leishmania</i>	145

- Figura7-1:** El modelo tridimensional de la proteína LbNMNAT contiene el elemento estructural necesario para establecer oligómeros.....154
- Figura 7-2:** El modelo tridimensional de la proteína LbNMNAT Δ 1-43 conserva el elemento estructural necesario para establecer oligómeros163

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Leishmaniasis, especies responsables y distribución geográfica.....	4
Tabla 1-2: Propiedades bioquímicas de algunas NMNATs.....	14
Tabla 5-1: Secuencia de los oligonucleótidos empleados en el presente estudio.....	34
Tabla 5-2: Esquema de inmunización utilizado para la producción de anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante His-LbNMNAT en ratones.....	43
Tabla 6-1: Rendimiento de la purificación de algunas de las proteínas empleadas en el presente estudio.....	67
Tabla 6-2: Coeficientes de partición (K_{av}) de las proteínas patrón empleadas en SEC.....	74
Tabla 6-3: Migración relativa (R_f) de las proteínas patrón analizadas mediante PAGE.....	77
Tabla 6-4: Coeficiente de retardo (K_r) de las proteínas patrón analizadas mediante PAGE.....	78
Tabla 6-5: Determinación del tipo de oligómero para la proteína His-LbNMNAT a partir del gráfico de Ferguson.....	80
Tabla 6-6: Parámetros cinéticos de la proteína His-LbNMNAT.....	85
Tabla 6-7: Constante de equilibrio (K_D) de la proteína His-LbNMNAT.....	89
Tabla 6-8: Predicción de la localización celular de la proteína LbNMNAT.....	91
Tabla 6-9: Concentración de proteínas en los sueros sanguíneos de los ratones inmunizados.....	93
Tabla 6-10: Valores promedio de OD obtenidos para los anticuerpos anti His-LbNMNAT en ELISA.....	95

Tabla 6-11:	Determinación del tipo de oligómero para la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 a partir del gráfico de Ferguson (Figura 6-15).....	129
Tabla 6-12:	Cuantificación por densitometría de los productos de PCR de diferentes genes en promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	133
Tabla 6-13:	Enzimas del metabolismo del NAD.....	140
Tabla 6-14:	Proteínas candidato del metabolismo del NAD de <i>L. braziliensis</i>	142
Tabla 6-15:	Características funcionales de las proteínas candidato del metabolismo del NAD de <i>L. braziliensis</i>	143

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
2DE	Electroforesis bi-dimensional
6xHis	Etiqueta de hexa-histidinas
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADNc	ADN complementario
ADPR	ADP ribosa
ADPRc	ADPR cíclica
AmB	Anfotericina B
AMP	Adenosina monofosfato
A.Nasa	Adenosina nucleósido hidrolasa
ARNm	ARN mensajero
ART	Mono ADP ribosil transferasa
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CI	Cuerpos de inclusión
Cit P450	Citocromo P450
CL	Leishmaniasis cutánea
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIC	Contraste de interferencia diferencial
GFP	Proteína verde fluorescente

Abreviatura	Término
GSH	Glutati3n
Hsp	Prote3nas de choque t3rmico
HST	Hom3logo de Sir 2
IC50	Concentraci3n inhibitoria 50%
IDO	Indol amina 2,3-dioxigenasa
IF	Inmunofluorescencia
IMAC	Cromatograf3a de afinidad a metales inmovilizados
IP	Inmunoprecipitaci3n
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Kav	Coficiente de partici3n
Kcat	N3mero de recambio
KD	Constante de equilibrio
kDa	Kilodalton
KEGG	Enciclopedia de Genes y Genomas Kyoto
Km	Constante de Michaelis-Menten
Kr	Coficiente de migraci3n o retardo
LbNMNAT	NMNAT de <i>L. braziliensis</i>
MCL	Leishmaniasis muco-cut3nea
MIL	Miltefosina
MS	Espectrometr3a de masas
MW	Peso molecular
NA	3cido nicot3nico
NAAD	Dinucle3tido de adenina y 3cido nicot3nico
NAADP	NAAD fosfato
NAD	Dinucle3tido de adenina y nicotinamida

Abreviatura	Término
NAD ⁺	NAD oxidado
NADH	NAD reducido
NADK	NAD quinasa
NADP	NAD fosfato
NADP ⁺	NADP oxidado
NADPH	NADP reducido
NADS	NAD sintasa
Nam	Nicotinamida
NAMN	Mononucleótido de NA
NamPRT o NAMPT	Fosforibosil transferasa de Nam
NAPRT	Fosforibosil transferasa de NA
NAR	Ribósido de NA
Ni-NTA	Níquel y ácido nitrilotriacético
NLS	Señal de localización nuclear
NMN	Mononucleótido de nicotinamida
NMNAT	Nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa
NR	Ribósido de Nam
NRK	Quinasas de NR y NAR
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORFs	Marcos de lectura abiertos
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas
PAHO	Organización Panamericana de la Salud
PARP	Poli ADP ribosil polimerasa
PDB	Banco de Datos de Proteínas

Abreviatura	Término
pl	Punto isoeléctrico
PPi	Pirofosfato inorgánico
PRPP	Fosforibosil pirofosfato
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
PMM	Paromomicina
QA	Ácido quinolínico
QAPRT	Fosforibosil transferasa de QA
Qasa	Quinureninasa
REDOX	Óxido-reducción
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa
rpm	Revoluciones/min
RT-PCR	PCR acoplado a transcripción reversa
RT-qPCR	PCR cuantitativo en tiempo real
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
SIR	Sirtuina
TCA	Ácidos tricarboxílicos
TDO	Triptófano 2,3-dioxigenasa
Trx	Tioredoxina
Ube4b	Factor de ubiquitinación E4B
VL	Leishmaniasis visceral
Vmax	Velocidad máxima

Introducción

El parásito intracelular *Leishmania braziliensis* es uno de los agentes causales de la leishmaniasis, conjunto de enfermedades que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), genera entre 20,000 y 30,000 muertes al año (Reporte: marzo del 2016). Las medidas de manejo vigentes dependen de fármacos para combatir la infección y del control del vector para reducir la transmisión [1]. Los fármacos empleados en la actualidad generan diversos efectos secundarios adversos [2] y aún no se han desarrollado vacunas efectivas para humanos [3].

La identificación de nuevos blancos farmacológicos y la implementación de estrategias terapéuticas racionales y duraderas basadas en la comprensión integral de la biología del parásito, requiere investigaciones enfocadas en la caracterización molecular y bioquímica del mismo. En este sentido, el estudio del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD) resulta adecuado dadas las funciones esenciales que desempeña: metabolismo energético, defensa ante estrés oxidativo y regulación celular [4].

En las dos primeras funciones el NAD actúa como co-enzima, mientras que en la función restante es utilizado como sustrato por diversas enzimas relacionadas con reparación del ADN y muerte celular, movilización de calcio, envejecimiento y control del ciclo circadiano, entre otros [5]. En *Leishmania*, el NAD no solo participa en el metabolismo energético y defensa ante estrés oxidativo, sino que regula procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular [6, 7]. En consecuencia, estos parásitos dependen de un suministro constante de NAD para su viabilidad.

La biosíntesis del NAD se realiza mediante la vía *de novo* y la vía de reciclaje. Aunque estas rutas emplean precursores e intermediarios químicos diferentes, ambas convergen en el paso catalizado por la enzima nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT; EC: 2.7.7.1/18) [8]. Por esta razón, se piensa que la caracterización de la enzima NMNAT de *L. braziliensis* (LbNMNAT) y la identificación de diferencias

estructurales con respecto a las proteínas humanas correspondientes, constituyen puntos clave para el desarrollo de nuevas estrategias de control.

Estudios realizados en nuestro grupo de investigación permitieron identificar, clonar y expresar la proteína recombinante His-LbNMNAT en el sistema heterólogo *Escherichia coli*, estableciendo las primeras evidencias experimentales sobre el metabolismo del NAD en el género *Leishmania* [9]. El presente trabajo constituye una profundización del estudio de la proteína His-LbNMNAT.

Inicialmente, se estandarizaron las condiciones de expresión y purificación de la proteína His-LbNMNAT, lo que permitió su caracterización enzimática y la producción de anticuerpos policlonales contra la misma. Estos anticuerpos se emplearon para determinar la localización intracelular de la proteína LbNMNAT endógena en *L. braziliensis*. De manera adicional, el patrón de localización observado se confirmó mediante la expresión de la proteína recombinante LbNMNAT-GFP en el parásito. El análisis de la estructura primaria de la proteína LbNMNAT reveló la existencia de inserciones exclusivas, cuyo efecto sobre la actividad catalítica y organización oligomérica de la enzima se estudió en proteínas recombinantes delecionadas. Por otra parte, los niveles de expresión transcripcionales y traduccionales de la proteína LbNMNAT se evaluaron en los estadios de diferenciación disponibles del parásito. Para finalizar, se construyeron de manera hipotética, las principales rutas metabólicas de síntesis, degradación, modificación y transporte del NAD y sus precursores en *Leishmania*.

En conjunto, el presente trabajo de investigación permitió obtener información estructural y funcional novedosa sobre la enzima LbNMNAT, contribuyendo al conocimiento del metabolismo del NAD en *L. braziliensis*.

1. Marco teórico

1.1 Leishmaniasis: epidemiología y estrategias de control

La leishmaniasis se refiere a un espectro diverso de enfermedades causadas por parásitos del género *Leishmania*, del cual se han descrito aproximadamente 20 especies que infectan al ser humano [10]. Estos protozoarios pertenecen a la familia *Trypanosomatidae* y exhiben características únicas. Por ejemplo, presencia de glicosomas y cinetoplasto (organización particular del ADN mitocondrial) transcripción policistronica y trans-splicing [11]. Adicionalmente, presentan una plasticidad genética activa que altera el número de copias de sus cromosomas [12]. En la actualidad se dispone de la secuencia de los genomas de cinco especies: *L. amazonensis* [13], *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major* [14] y *L. panamensis* [15]. Dicha información ha ampliado el conocimiento de la biología del género *Leishmania* y se ha constituido como una herramienta valiosa para identificar nuevos blancos terapéuticos [16]. La transmisión de estos parásitos, los cuales invaden células del sistema monocítico-fagocítico, es realizada por dípteros hembra de los géneros *Phlebotomus* spp. o *Lutzomyia* spp. en el Viejo y Nuevo Mundo, respectivamente [17].

La leishmaniasis se divide en tres categorías principales: leishmaniasis cutánea (CL), mucocutánea (MCL) y visceral (VL). Otras afecciones como la CL difusa (DCL), leishmaniasis dérmica post-VL (post-Kala-Azar), leishmaniasis recurrente y leishmaniasis diseminada también han sido descritas [10]. El desarrollo de una u otra forma de la enfermedad depende de múltiples factores como la especie del parásito, su patogenicidad y capacidad de invasión, así como la respuesta inmune del hospedero [18]. Una única especie del parásito puede generar diferentes tipos de leishmaniasis y

cada tipo de enfermedad puede ser producida por varias especies. La Tabla 1-1 presenta el tipo de leishmaniasis, algunas de las especies implicadas y su ubicación geográfica.

Los grados de severidad de la leishmaniasis varían entre lesiones cutáneas asintomáticas y lesiones desfigurativas, hasta invasiones viscerales fatales. La CL se caracteriza por lesiones localizadas en el sitio de inoculación de los parásitos. En algunos casos, los parásitos se diseminan a través de la piel generando múltiples lesiones (DCL) o se propagan mediante el sistema linfático generando destrucción de los tejidos nasobronquiales y de la mucosa bucal (MCL) [19]. La VL es una enfermedad sistémica que afecta el bazo y el hígado, genera anemia y pérdida de peso. Cuando no es tratada, esta enfermedad resulta fatal [20].

Tabla 0-1: Leishmaniasis, especies responsables y distribución geográfica. Tabla adaptada de [10].

ENFERMEDAD	ESPECIES		UBICACIÓN
CL	<i>L. aethiopica</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	Viejo Mundo
	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. colombiense</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. pifanoi</i>	Nuevo Mundo
MCL	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i>		Centroamérica y Suramérica
VL	<i>L. infantum/L. chagasi</i> <i>L. donovani</i> <i>L. tropica</i> (infrecuente)		Viejo Mundo
	<i>L. amazonensis</i> (infrecuente) <i>L. chagasi/L. infantum</i>		Nuevo Mundo
DCL	<i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i>		
Leishmaniasis dérmica post-VL	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>		Viejo Mundo
Leishmaniasis recurrente	<i>L. tropica</i>		
Leishmaniasis diseminada	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i>		Nuevo Mundo (Brasil)

En azul se muestra la especie estudiada en el presente trabajo.

De acuerdo con la OMS y desde una perspectiva global, se estiman 12 millones de personas con leishmaniasis y 350 millones en riesgo de contraer la infección. La incidencia anual oscila entre 1,5 y 2 millones de nuevos afectados de CL y 500,000 de

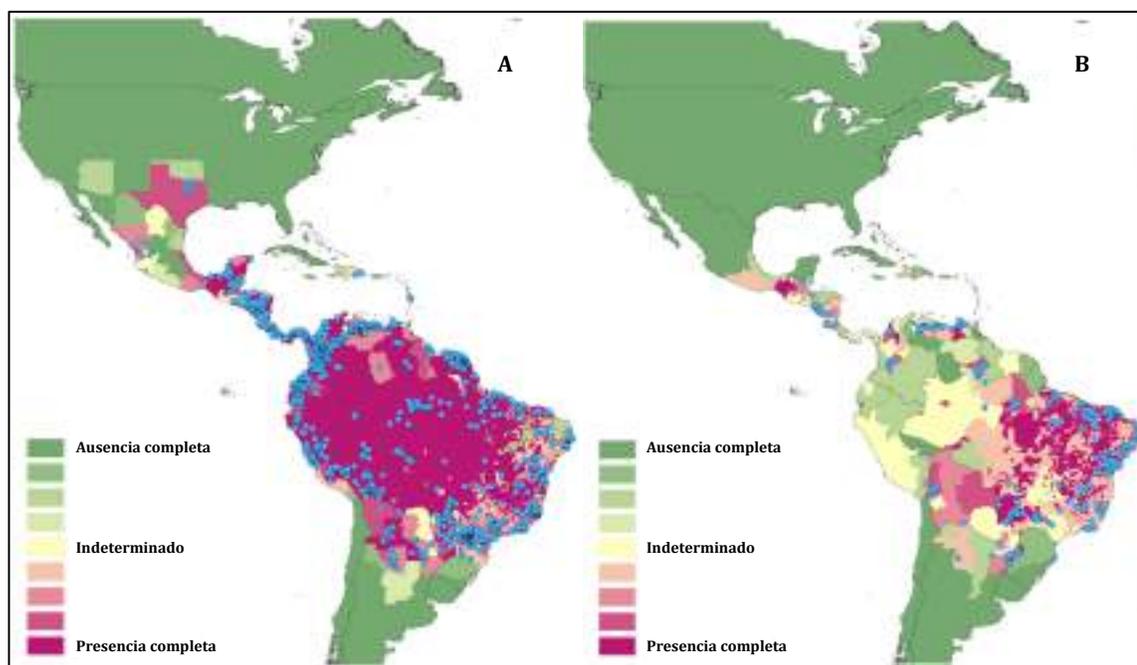
VL, registrándose entre 20,000 y 30,000 muertes al año. Para el caso de Colombia, en el 2016 se han reportado alrededor de 1572 casos de leishmaniasis de todas las formas (Reporte: abril del 2016, INS). Los parásitos que causan leishmaniasis se encuentran en 88 países alrededor del mundo, especialmente en Centroamérica y Suramérica, África, Asia y el sur de Europa. La Figura 1-1 indica la distribución geográfica de CL y VL en el Nuevo Mundo.

Figura 0-1: Distribución geográfica de CL y VL reportadas en el Nuevo Mundo. Tomado de [20].

A. Distribución de CL.

B. Distribución de VL.

La presencia de leishmaniasis varía entre ausencia completa (verde) y presencia completa (morado). Los puntos azules indican focos de ocurrencia.



Las medidas de manejo existentes de la leishmaniasis dependen del uso de fármacos para combatir la infección y del control del vector para reducir la transmisión. Los principales fármacos empleados son: antimoniatos pentavalentes (Sb^V) como el estibogluconato de sodio (Pentostam) y el antimoniatos de meglubina (Glucantime), la anfotericina B (AmB) en presentación liposomal (AmBisome), como complejo lipídico

(Abelcet) o dispersión coloidal (Amphocil), la miltefosina (MIL), la paramomicina (PMM), los azoles (ketoconazol, fluconazol, itraconazol) y la simataquina [21].

Todos estos fármacos generan efectos adversos en los pacientes (dolor, náusea, vómito, fiebre, falla hepática y disfunción renal, entre otros) y algunas especies del parásito han desarrollado diversos mecanismos de resistencia ante los mismos [2]. En la actualidad, no existen vacunas disponibles para humanos y el desarrollo de estas ha sido insuficiente debido a la diversidad antigénica del parásito [1, 3].

1.2 Ciclo de vida de *Leishmania*

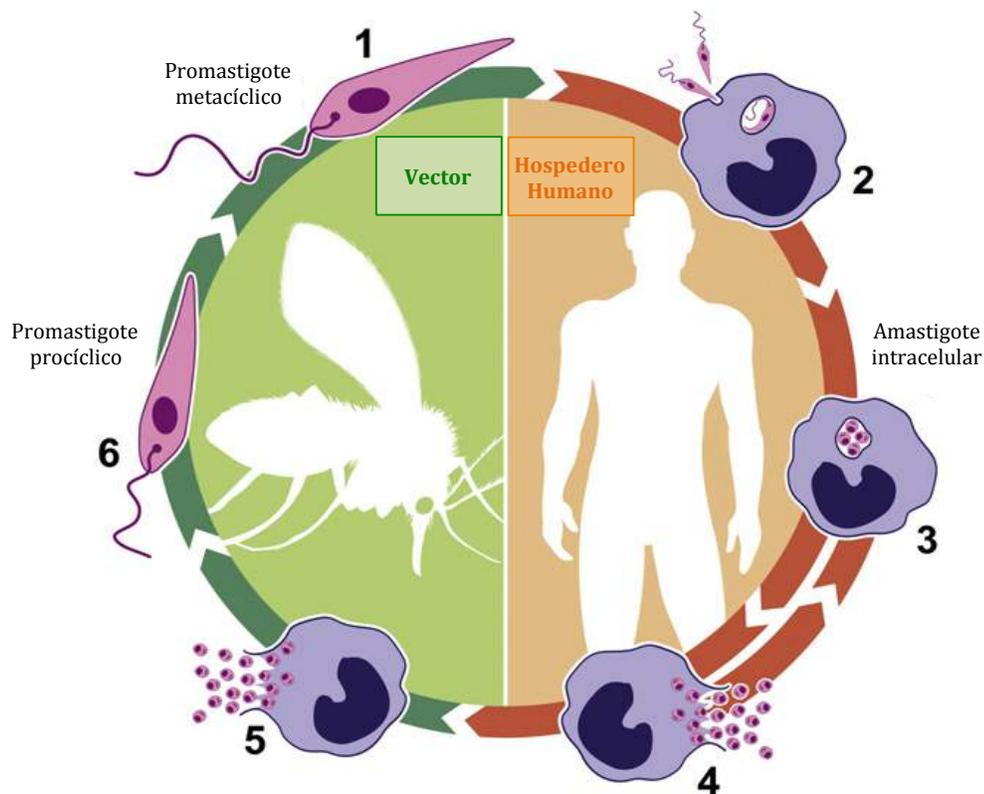
El ciclo biológico de los organismos pertenecientes al género *Leishmania* comprende dos fases morfológicas, bioquímicas y fisiológicas del parásito: amastigotes intracelulares (residen dentro del fagolisosoma de los macrófagos del hospedero mamífero) y promastigotes extracelulares (residen en el intestino del vector) [1]. Se han definido dos etapas de desarrollo para los promastigotes según la estructura molecular del lipofosfoglicano de la superficie celular: promastigotes procíclicos (no infectivos) y promastigotes metacíclicos (infectivos) [22, 23].

El ciclo de vida de *Leishmania* comienza con la trasmisión de promastigotes metacíclicos por parte del vector hacia el hospedero mamífero. Los macrófagos del hospedero reconocen y fagocitan estos promastigotes, los cuales se diferencian y multiplican como amastigotes dentro del fagolisosoma del macrófago. Los amastigotes se liberan del macrófago y establecen ciclos de re-invasión. Cuando el vector se alimenta de la sangre del hospedero infectado, adquiere el parásito que se diferencia, nuevamente, en promastigotes en el intestino del vector, completando el ciclo de vida [1] (Figura 1-2).

Figura 1-2: Diagrama esquemático del ciclo biológico de *Leishmania*. Tomado de [24].

1. Los promastigotes metacíclicos son transmitidos hacia hospederos mamíferos por dípteros de los géneros *Phlebotomus* spp. o *Lutzomyia* spp.
2. Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos del hospedero.
3. Al interior del fagolisosoma del macrófago, los promastigotes se diferencian en amastigotes.

4. Los amastigotes se multiplican por eventos de fisión binaria, se liberan del macrófago y establecen ciclos de re-invasión.
5. Cuando el vector se alimenta de la sangre del hospedero infectado, adquiere los amastigotes.
6. Finalmente, los amastigotes se diferencian en promastigotes proliferativos (procíclicos), los cuales migran hacia la probosis del vector cuando alcanzan su estado infeccioso (metacíclicos), completando el ciclo de vida.



1.3 Dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD)

Las proteínas son biomoléculas que desempeñan diversas funciones en los seres vivos. Entre estas biomoléculas, las enzimas se destacan debido a que disminuyen la energía de activación de las reacciones químicas que acontecen en los sistemas biológicos. A pesar de la importancia de las enzimas, estas no pueden catalizar sus reacciones por sí solas debido a que requieren cofactores y co-enzimas para su funcionamiento (a excepción de las isomerasas) [25]. La co-enzima denominada dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD) junto con sus formas reducidas y fosforiladas (NADH, NADP,

NADPH), desempeña funciones esenciales en el metabolismo energético y en la defensa ante estrés oxidativo dadas sus propiedades de transferencia electrónica.

Numerosas enzimas, particularmente deshidrogenasas, utilizan el NAD en reacciones catabólicas de oxido-reducción (glucólisis, oxidación de ácidos grasos y metabolismo del nitrógeno) y en procesos anabólicos como la gluconeogénesis, la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y colesterol [26].

El NAD y el NADP se componen de dos nucleótidos, la adenina monofosfato (AMP) y el mononucleótido de nicotinamida (NMN), unidos mediante sus grupos fosfato a través de un enlace fosfoanhidro. Debido a que el anillo de nicotinamida se asemeja a la piridina, el NAD y el NADP se conocen como nucleótidos de piridina. Tanto el NAD como el NADP, son moléculas hidrosolubles y experimentan reacciones reversibles de oxido-reducción de su anillo de nicotinamida. Dichas reacciones son catalizadas por enzimas deshidrogenasas, las cuales oxidan una molécula sustrato mediante la liberación de dos de sus electrones a modo de dos átomos de hidrógeno. Las formas oxidadas de los dinucleótidos (NAD^+ o NADP^+) aceptan estos electrones en forma de ión hidruro y son transformadas en sus formas reducidas (NADH o NADPH, respectivamente), las cuales transportan los electrones entre diferentes enzimas. El protón restante se libera al medio (Figura 1-3). La participación del NAD en reacciones de oxido-reducción no genera un consumo neto del mismo, razón por la cual no se alteran sus concentraciones intracelulares fisiológicas ($\sim 250\text{-}350 \mu\text{M NAD}^+$ y $10 \mu\text{M NADH}$) [27–29].

Por otra parte, el NAD participa de manera activa en procesos de regulación celular [30]. Específicamente, es utilizado como sustrato por enzimas involucradas en procesos de reparación del ADN y muerte celular [31, 32], silenciamiento genético [33, 34], movilización de calcio [35] y control del ciclo circadiano [36, 37] en diversos modelos biológicos. Por ejemplo, se han reportado y caracterizado deacetilasas pertenecientes a la familia HST (Homologous of Sir Two), proteínas comúnmente conocidas como sirtuinas. Estas enzimas, involucradas en procesos de silenciamiento genético, emplean el NAD como sustrato para deacetilar diferentes blancos moleculares [34]. En *Plasmodium falciparum*, las sirtuinas participan en procesos de variación antigénica mediante el remodelamiento de la cromatina [38, 39]. En *Leishmania*, regulan procesos de diferenciación celular [7], proliferación [6] e infección [40, 41], mientras que en *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*, las

sirtuinas se relacionan con mecanismos de invasión celular [42] y reparación del ADN [43, 44], respectivamente.

Del mismo modo, otras enzimas como NAD glicohidrolasas (CD38/CD157), mono ADP ribosil transferasas (ARTs) y poli ADP ribosa polimerasas (PARPs) emplean el NAD como sustrato [5]. Las reacciones catalizadas por estas enzimas generan un consumo neto del NAD al hidrolizar el enlace glicosídico entre la nicotinamida y su ribosa adyacente. Por esta razón, la biosíntesis permanente del NAD es necesaria para asegurar la viabilidad de los seres vivos. Las funciones del NAD y algunos de los procesos celulares en los que participa se resumen en la Figura 1-4.

Figura 1-3: Estructura del NAD. El NAD se compone de dos nucleótidos unidos mediante sus grupos fosfato. Los nucleótidos se diferencian por las bases nitrogenadas que contienen: adenina y nicotinamida. En rojo se indica el grupo fosfato presente en el NADP. El recuadro azul indica la reducción del anillo de nicotinamida.

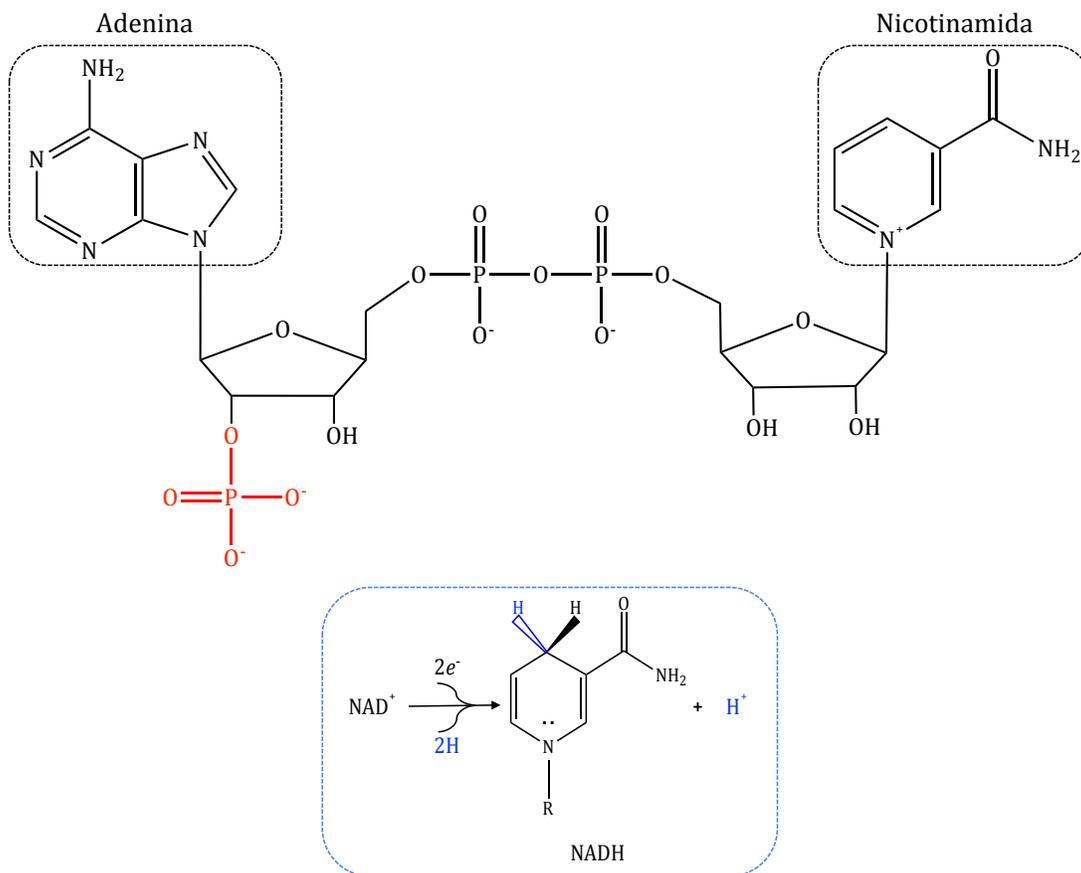
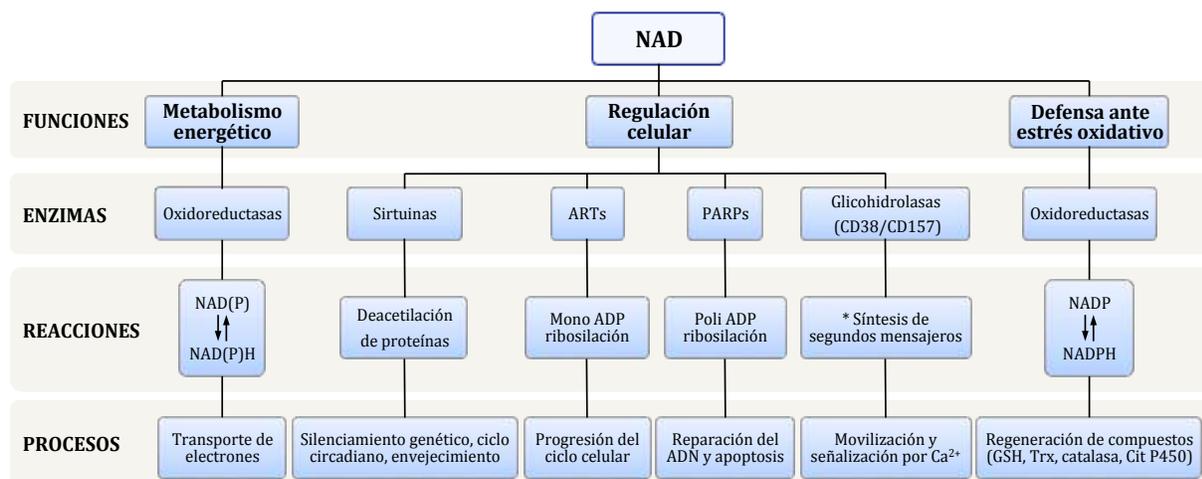


Figura 1-4: Funciones del NAD. Se han descrito tres funciones del NAD, las cuales son mediadas por diferentes enzimas que lo emplean como co-enzima (oxidoreductasas) o sustrato (Sirtuinas, ARTs, PARPs y glicohidrolasas). Dependiendo de las reacciones en las que el NAD participa, se pueden efectuar diferentes procesos celulares.



*Segundos mensajeros: ADP ribosa (ADPR), ADPR cíclica (ADPRc) y dinucleótido de adenina y ácido nicotínico fosfato (NAADP).

1.4 Biosíntesis del NAD

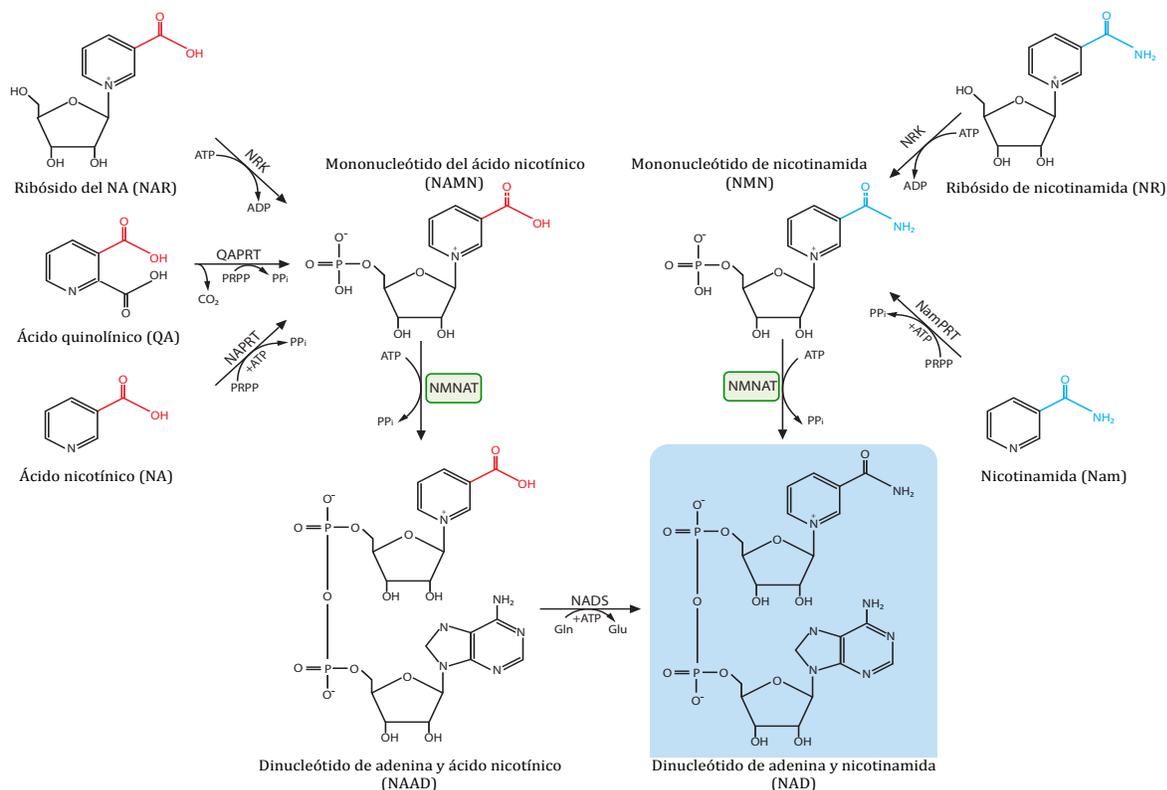
Existen dos rutas enzimáticas, conocidas como la vía *de novo* y la vía de reciclaje, que conducen a la biosíntesis del NAD. Estas vías se distinguen por los precursores que utilizan y en ambas, el primer paso es la generación de un mononucleótido [45].

La vía *de novo* comienza con la degradación de un precursor aminoácido: aspartato en bacterias y plantas o triptófano en los demás organismos. Estos precursores son catabolizados enzimáticamente para generar ácido quinolínico (QA), sustrato de la enzima fosforibosil transferasa del QA (QAPRT). La QAPRT cataliza la descarboxilación y fosforibosilación del QA, empleando fosforibosil pirofosfato (PRPP) como co-sustrato para sintetizar el mononucleótido del ácido nicotínico (NAMN). La vitamina B3, también conocida como niacina o ácido nicotínico (NA), también puede ser empleada como precursor para obtener NAMN, gracias a la acción de la enzima fosforibosil transferasa del NA (NAPRT).

La vía de reciclaje depende de la reutilización de la nicotinamida (Nam), producto de degradación proveniente de la actividad de las enzimas que emplean el NAD como sustrato. La Nam es modificada por la enzima fosforibosil transferasa de la Nam (NamPRT, también conocida como NAMPT) para generar el mononucleótido de nicotinamida (NMN) [8, 45]. El ribósido de nicotinamida (NR) y el ribósido del ácido nicotínico (NAR) son dos precursores adicionales que, al ser fosforilados por enzimas quinasas (NRK), generan NMN y NAMN, respectivamente. De modo alternativo, el NR se degrada produciendo Nam, la cual puede entrar a la vía de reciclaje [4] (Figura 1-5).

El segundo paso en la biosíntesis del NAD es la generación de un dinucleótido utilizando los mononucleótidos generados a partir de QA, Nam, NA, NR o NAR. Esta conversión es catalizada por la enzima nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT). Esta proteína transfiere la molécula de adenilato desde el ATP hacia el NMN o el NAMN para sintetizar NAD o el dinucleótido de adenina y ácido nicotínico (NAAD). El NAAD es amidado por la enzima NAD sintetasa generando NAD [8] (Figura 1-5).

Figura 1-5: Biosíntesis del NAD. El NAD puede ser sintetizado a partir de 5 precursores: NAR, QA, NA, NR y Nam. Las enzimas NamPRT y NAPRT catalizan la conversión de Nam y NA en los mononucleótidos NMN y NAMN. La transformación del QA por acción de la enzima QAPRT, también conduce a la síntesis de NAMN. Estas 3 reacciones emplean el PRPP como fuente de fosforibosa. La enzima NRK genera NMN y NAMN mediante la fosforilación de NR y NAR. El único paso común de la vía *de novo* y la vía de reciclaje (síntesis de NAD o NAAD) es catalizado por la enzima NMNAT (recuadro verde). La enzima NADS convierte el NAAD en NAD. El grupo amida en las estructuras relacionadas con la Nam se indica en azul. El grupo carboxilo en las estructuras relacionadas con el NA se indica en rojo. La síntesis de NAAD a partir de NA se conoce como ruta Preiss-Handler. La síntesis de NAD a partir de QA corresponde a la vía *de novo*. Adaptado de [8].



Como se mencionó, tanto el NMN como el NAMN pueden ser utilizados como sustratos por la NMNAT, razón por la cual esta enzima representa el paso esencial, donde convergen las rutas *de novo* y de reciclaje de la biosíntesis del NAD. En el contexto del presente trabajo de investigación, la enzima NMNAT es el objeto central de estudio.

El NAD puede ser modificado por la enzima NAD quinasa, que transfiere un grupo fosfato desde el ATP hacia el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa perteneciente a la adenina del NAD, para sintetizar NADP. En su forma reducida (NADPH), esta molécula desempeña tres funciones vitales: 1. Participa como donador electrónico universal en rutas de biosíntesis reductivas. 2. Regenera compuestos como glutatión (GSH), tioredoxina (Trx), catalasa y citocromo P450 (Cit P450), involucrados en los sistemas celulares de detoxificación y defensa ante agentes oxidantes. 3. Es precursor del NAADP, molécula liberadora de calcio [35, 46].

1.5 Nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT, EC 2.7.7.1/18)

La enzima NMNAT, clasificada como transferasa de nucleótidos (EC 2.7.7), cataliza el único paso común entre todas las rutas que conducen a la biosíntesis del NAD (Figura 1-5), resultando esencial. De acuerdo con esta afirmación, modelos animales con deleciones en los genes codificantes para la NMNAT resultan letales [47], mientras que en modelos vegetales dichas deleciones interrumpen la reproducción y el crecimiento [48].

La importancia de la NMNAT en la biosíntesis del NAD, ha constituido esta enzima como una diana terapéutica promisoría para el tratamiento de diversas patologías como las enfermedades infecciosas y el cáncer [49–51]. Por esta razón, la NMNAT ha sido sujeto de numerosos estudios enfocados en comprender sus mecanismos catalíticos y características estructurales. La existencia de la NMNAT se demostró por primera vez en levaduras [52] y se ha investigado en numerosos modelos como arqueobacterias, bacterias, parásitos, levaduras, insectos, plantas y mamíferos. En humanos se han descrito tres iso-enzimas (HsNMNAT1-3), las cuales exhiben una distribución subcelular específica. La HsNMNAT1 reside en el núcleo (al igual que las iso-enzimas 1 y 2 de levadura, ScNMNAT1-2), mientras que la HsNMNAT2 y HsNMNAT3 se localizan en el aparato de Golgi [53] y en la mitocondria [54], respectivamente.

Aunque las NMNATs presentan una actividad catalítica evolutivamente conservada, existen diferencias cinéticas y estructurales entre las enzimas de diferentes especies o entre las iso-enzimas de un mismo organismo [55]. Las NMNATs son proteínas globulares con pesos moleculares entre 20-50 kDa, puntos isoeléctricos (pI) teóricos entre pH 4 y 6.5, temperaturas óptimas de reacción entre 30 y 37°C (exceptuando las NMNATs de arqueobacterias) y un rango óptimo de pH entre 6 y 9. Todas las NMNATs requieren iones metálicos divalentes para su actividad enzimática, siendo el magnesio, el ion más utilizado [56] (Tabla 1-2).

Tabla 1-2: Propiedades bioquímicas de algunas NMNATs. Tabla adaptada de [56] con datos provenientes de las bases de datos Brenda, PDB y UniProt.

	HsNMNAT			ScNMNAT		EcNMNAT		AtNMNAT	MjNMNAT	MtNMNAT	SsNMNAT
	1	2	3	1	2	NadD	NadR				
Peso Molecular (kDa)	31,9	34,4	28,3	28,3	45,8	24,5	47,3	26,9	20	20,5	66
pI	4,7-4,8	6,6	* 9,3	4,2	5,6	* 5,5	* 5,4	* 5,8	* 8,1	* 5,8	5,4
Estructura cuaternaria	6-mer	1-mer	4-mer			1-mer	4-mer	-	6-mer		-
Localización	Núcleo	Aparato de Golgi	Mitocondria	Núcleo		-	* Citoplasma y membrana plasmática	* Núcleo	Citoplasma		-
Preferencia	NMN NaMN	NMN	NMN NaMN	NMN	NaMN		NMN	NMN NaMN	NMN		
Cofactores	Mg ²⁺ Mn ²⁺ Co ²⁺ Ni ²⁺ Zn ²⁺	Mg ²⁺		Mg ²⁺ Mn ²⁺ Co ²⁺ Ni ²⁺ Zn ²⁺		Mg ²⁺ /KCl	Co ²⁺ /Ni ²⁺ Mg ²⁺ / Zn ²⁺ Mn ²⁺ /Cd ²⁺ Cu ²⁺ /Ca ²⁺	Cationes divalentes	Zn ²⁺ /Ni ²⁺ Mn ²⁺ /Mg ²⁺ Fe ³⁺ /Cu ²⁺ Co ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺ KCl SO ₄ ²⁻
pH óptimo	6-9	5,6-8,5	7,5	7,8	7,5	8	8,6	7,6	6-8	7,5	6-8
Temperatura óptima (°C)	37						-	-	90	65	97
K_m (μM)											
ATP	40	204	29	104	1400	-	1,7	-	-	160	0,08
NMN	34	32	209	170	130	-	700	-	-	80	1,4
NaNM	67	14	111	-	-	-	-	-	-	-	17
NAD	59	70	130	73	23	-	-	-	-	-	-
PPi	937	1119	309	83	5000	-	-	-	-	-	-

* Valores teóricos calculados con la herramienta bioinformática ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Un aspecto relevante de las NMNATs se refiere a la preferencia, especie-específica, por el precursor del NAD (NMN o NaMN). Aunque la mayoría de estas enzimas pueden emplear ambos sustratos, algunas de ellas poseen una marcada selectividad. Por ejemplo, en *Escherichia coli* se han identificado dos iso-enzimas, NadD y NadR, siendo la primera de ellas 20 veces más rápida al catalizar la reacción empleando NaMN como sustrato, mientras que la NadR es 170 veces más rápida para adenilar el NMN [57].

Por su parte, las NMNATs de arqueobacterias como *Methanocaldococcus jannaschii* (MjNMNAT) [58], *Methanobacterium thermoautotrophicus* (MtNMNAT) [59] y *Sulfolobus solfataricus* (SsNMNAT) [60] prefieren el NMN como sustrato. En *Saccharomyces cerevisiae* las iso-enzimas ScNMNAT1-2 presentan selectividad diferencial, mientras que en *Arabidopsis thaliana* (AtNMNAT) [61] y humanos (HsNMNAT1 y 3) se produce NAD y NAAD con eficiencias similares [56].

En cuanto al mecanismo de reacción, la catálisis de las NMNATs procede a través de un mecanismo secuencial Bi-Bi ordenado, como ha sido descrito para las iso-enzimas HsNMNAT1-3 [62] o secuencial Bi-Bi aleatorio, como sucede con la NMNAT de *Bacillus anthracis* (BaNMNAT) [63]. Estos mecanismos se caracterizan por la unión secuencial de la enzima con dos (Bi) sustratos, antes de la liberación secuencial de dos (Bi) productos. La formación del complejo enzima-sustratos puede establecerse independiente del orden de unión de los sustratos (aleatorio) o debe formarse en un orden determinado para ser activo (ordenado) [64].

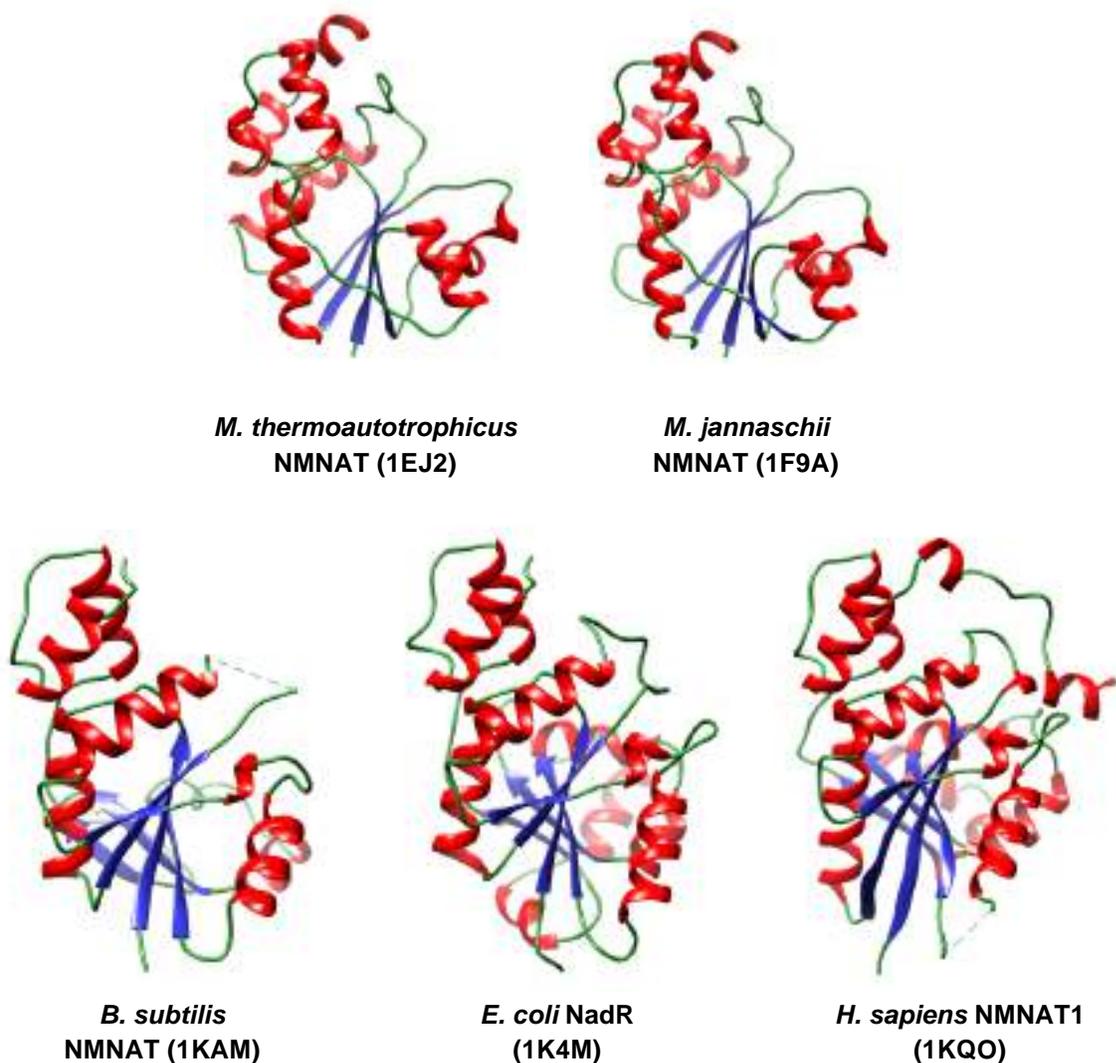
A nivel estructural, se han descrito varios aspectos para las NMNATs. Entre estos, los más relevantes hacen referencia a motivos de unión a sustratos, organización cuaternaria y presencia de dominios exclusivos, como se describe a continuación.

1.5.1 Unión a sustratos por las NMNATs

Mediante estudios de cristalografía de rayos X se ha resuelto la estructura de la NMNAT de representantes de los tres dominios de la vida: arqueobacterias [65, 66], bacterias [67–69] y humanos [67, 70–72]. Estos estudios han revelado una arquitectura conservada entre las NMNATs, caracterizada por la presencia de un dominio α/β conformado por hojas β paralelas rodeadas por hélices α y giros aleatorios. Este dominio, denominado plegamiento Rossmann, contiene los elementos estructurales relacionados con la unión a los sustratos y la catálisis [55] (Figura 1-6).

Para el ATP se han identificado dos motivos de unión altamente conservados, ubicados hacia los extremos amino ([H/T]xxH) y carboxilo terminales (SxxxxR) de las NMNATs. Los grupos fosfato del ATP interactúan con las histidinas del primer motivo mediante interacciones electrostáticas y con la serina y la arginina del segundo motivo mediante puentes de hidrógeno y puentes salinos, respectivamente. En el caso de los sustratos NMN, NAMN, NAD y NAAD, se han identificado algunos elementos conservados para todas las NMNATs: un residuo de triptófano que mediante apilamiento de anillos aromáticos interactúa con el anillo de piridina; un residuo de arginina o lisina que mediante interacciones electrostáticas estabiliza el grupo fosfato de los sustratos mencionados [55].

Figura 1-6: Arquitectura de las NMNATs. El plegamiento Rossmann es la característica principal de las NMNATs. Azul: hojas β paralelas. Rojo: hélices α . Verde: giros aleatorios. Entre paréntesis se indican los códigos del Banco de Datos de Proteínas (PDB). Todas las imágenes se generaron con el programa UCSF Chimera [73].



1.5.2 Organización oligomérica de las NMNATs

Las NMNATs de diferentes organismos exhiben estructuras cuaternarias homooligoméricas de 2 a 6 subunidades, siendo los únicos monómeros reportados la NMNAT de *E. coli* (EcNMNAT) [74], *Pseudomonas aeruginosa* (PaNMNAT) [75] y la iso-enzima HsNMNAT2 [76].

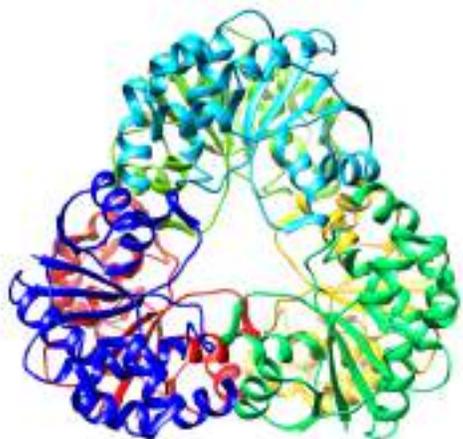
En bacterias gram positivas como *B. anthracis* y *Staphylococcus aureus*, se han observado ensamblajes diméricos (2-mer), mientras que para *B. subtilis* se ha reportado un ensamblaje tetramérico (4-mer), tal como sucede con la HsNMNAT3. En la arqueobacteria *M. jannaschii* y en la iso-enzima HsNMNAT1 se ha observado la organización oligomérica más compleja entre todas las NMNATs: hexámeros (6-mer) cuyas subunidades forman un canal con una superficie cargada positivamente. Se ha planteado que esta distribución de cargas permite atraer sustratos con carga negativa hacia los sitios activos ubicados en dicho canal [55]. La organización cuaternaria de diferentes NMNATs se muestra en la Figura 1-7.

1.5.3 Dominios exclusivos de las NMNATs

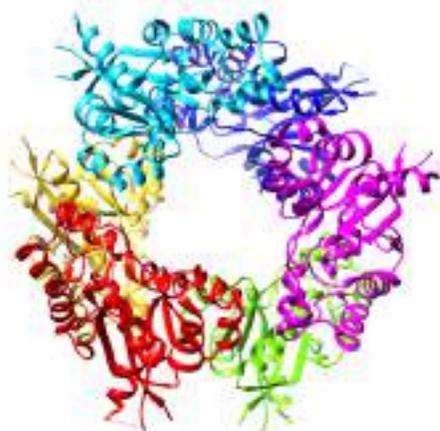
Los genes codificantes para las iso-enzimas humanas HsNMNAT1-3 presentan exones únicos que codifican dominios proteicos específicos denominados ISTIDs (Isoform Specific Targeting and Interaction Domains). Dichos dominios median diferentes funciones. Por ejemplo, los ISTIDs de las proteínas HsNMNAT1 y 2 determinan la localización subcelular de estas enzimas. En el caso de la HsNMNAT1, su ISTID contiene la señal de localización nuclear (NLS) GRKRKW, mientras que el ISTID de la HsNMNAT2 contiene dos cisteínas (Cis¹⁶⁴ y Cis¹⁶⁵) relacionados con el anclaje de dicha proteína a la membrana del aparato de Golgi mediante palmitoilación. La HsNMNAT3 también contiene un dominio exclusivo, sin embargo aún no se han establecido las funciones en las que participa [53].

Adicionalmente, el ISTID de la HsNMNAT1 contiene un residuo de serina sujeto a fosforilación (Ser¹³⁶) por proteínas quinasa C. Se ha evidenciado que la HsNMNAT1 interactúa y regula la actividad de la enzima PARP1 auto-modificada, proteína involucrada en procesos nucleares dependientes de NAD. Dicha interacción es reducida por la fosforilación del residuo Ser¹³⁶. Esta evidencia representa un tipo de regulación post-traducciona para la HsNMNAT1 [77].

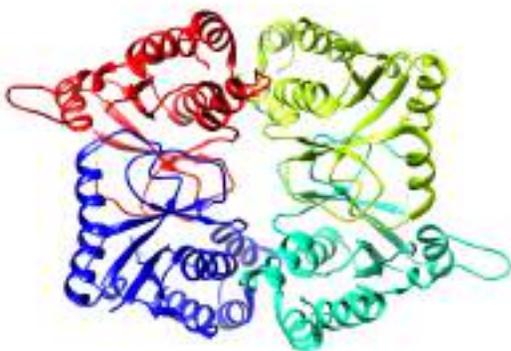
Figura 1-7: Estructura cuaternaria de algunas NMNATs. El ensamblaje homooligomérico es un rasgo distintivo de la mayoría de NMNATs. Las subunidades de cada proteína se muestran con colores diferentes. Entre paréntesis se indican los códigos del PDB. Todas las imágenes se generaron con el programa UCSF Chimera [73].



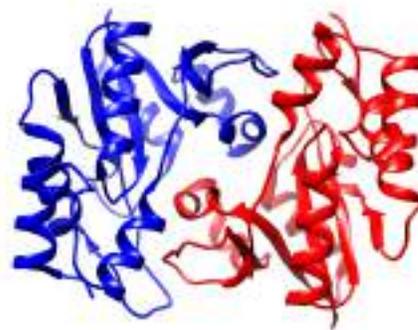
M. jannaschii
NMNAT (1F9A), 6-mer



H. sapiens
NMNAT1 (1KQO), 6-mer



B. subtilis
NMNAT (1KAM), 4-mer



B. anthracis
NMNAT (3MLA), 2-mer

1.5.4 Funciones adicionales de las NMNATs

La protección del sistema nervioso es un proceso biológico esencial en el que participan las NMNATs. En ratones se ha descrito una aberración cromosómica que genera la expresión de una proteína quimera, constituida por los primeros 70 residuos amino terminales del factor de ubiquitinación E4B (Ube4b) y la proteína NMNAT. Esta proteína quimera evita un fenotipo denominado degeneración Walleriana, caracterizado por la fragmentación y destrucción de los axones, fenotipo que se ha relacionado con la

enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple. El efecto protector ante dicha degeneración también se ha observado al sobre-expresar la NMNAT de ratón o al adicionar NAD exógeno en cultivos murinos neuronales [78], evidencia que soporta la siguiente idea: la síntesis de NAD en la región distal de los axones es necesaria para el mantenimiento de neuronas saludables [79]. Asimismo, en *Drosophila melanogaster* se ha reportado una función neuroprotectora de la NMNAT, que actúa como chaperona molecular (independiente de su actividad enzimática adenilil transferasa), evitando la agregación y precipitación de proteínas neuronales [80, 81].

1.6 Metabolismo del NAD en *Leishmania*

El NAD participa en tres funciones principales: metabolismo energético, señalización celular y defensa ante estrés oxidativo (Figura 1-4). En *Leishmania*, estas tres funciones han sido descritas. Con respecto al metabolismo energético, los Trypanosomátidos efectúan el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) [82] y la fosforilación oxidativa [83] de manera activa. Adicionalmente, estos parásitos poseen organelos especializados como los glicosomas en donde realizan glicólisis, ruta de las pentosa fosfato y oxidación de ácidos grasos [84, 85]. Todos estos procesos se caracterizan por la participación del NAD.

En términos de regulación celular, el NAD resulta indispensable para la supervivencia y proliferación de diferentes especies del género *Leishmania*. En estos procesos celulares participan las sirtuinas. Investigaciones previas han reportado la existencia de estas proteínas en *L. amazonensis* (LaSIR2) [86], *L. major* (LmSIR2) [87, 88] y *L. infantum* (LiSIR2) [41]. Dichas enzimas presentan una distribución citoplasmática durante todo el ciclo de vida del parásito [88] y su sobre-expresión promueve la supervivencia de los mismos, al prevenir procesos de muerte celular programada. La interrupción genética del fragmento codificante para LiSIR2 altera los procesos de proliferación de amastigotes *in vitro* e *in vivo*, indicando el requerimiento específico de la proteína en esta etapa del ciclo de vida (Vergnes *et al*, 2005).

Otros estudios han mostrado que la proteína LiSIR2 presenta actividad ART, capaz de modificar post-traduccionalmente diferentes blancos moleculares utilizando el NAD como sustrato. Entre estos blancos se incluyen proteínas asociadas al citoesqueleto, como la

α -tubulina, lo cual sugiere que el NAD participa en los cambios morfológicos que experimenta *Leishmania* durante su ciclo biológico [7]. En cuanto a defensa ante estrés oxidativo, los Trypanosomátidos poseen sistemas de protección contra especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) compuestos por peroxiredoxinas, tripanotióna y tripanoredoxina, siendo el común denominador de estos sistemas el NADP [89–91].

Las funciones que desempeña el NAD en *Leishmania* permiten inferir que es de gran importancia en la biología del parásito. Por esta razón, resulta interesante estudiar la biosíntesis del NAD en este modelo biológico, enfocando las enzimas involucradas en dicho proceso, como potenciales blancos terapéuticos. Aunque la NMNAT se ha caracterizado en numerosos modelos de investigación, pocos estudios se han realizado en parásitos eucariotas. Tan sólo se han reportado trabajos en *P. falciparum* [92], *T. cruzi* [93] y *Giardia lamblia* [94]. Con el secuenciamiento de los genomas de diferentes especies de *Leishmania*, se identificaron genes hipotéticos correspondientes a NMNATs. No obstante, la caracterización funcional de estas enzimas no se ha realizado aún. En el 2010, nuestro grupo de investigación demostró la existencia y expresión de la NMNAT en la fase móvil de tres especies de *Leishmania* [9]. Estos resultados constituyeron la primera evidencia experimental en aproximarse a los procesos de biosíntesis del NAD en este agente patogénico.

En el presente trabajo se profundiza el estudio de la enzima NMNAT de *L. braziliensis*. Específicamente, se indicarán los aspectos concernientes con su cinética, localización subcelular, organización cuaternaria y presencia/función de dominios exclusivos, junto con el análisis de los niveles de expresión en el parásito.

2. Justificación

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades parasitarias causadas por infecciones con protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*, el cual contiene alrededor de 20 especies capaces de infectar al ser humano [10]. De acuerdo con la PAHO, en Colombia se reportan anualmente entre 20.000 y 30.000 casos de los cuales, las formas clínicas predominantes son la leishmaniasis cutánea y mucocutánea [95]. En la actualidad, no existen vacunas efectivas para humanos [3] y las medidas de control implementadas requieren el uso de fármacos que generan efectos secundarios adversos [2]. Con el propósito de desarrollar estrategias terapéuticas racionales y duraderas a partir del conocimiento de la biología del parásito, es indispensable realizar investigaciones enfocadas en la caracterización molecular y bioquímica del mismo.

El metabolismo del NAD se relaciona con diversos procesos bioquímicos y fisiológicos esenciales, participando en mecanismos de transducción energética y de señales intracelulares, síntesis de agentes movilizadores de calcio y sistemas de oxido-reducción (REDOX) [4, 8]. En el contexto de los parásitos intracelulares, los sistemas REDOX permiten su adaptación a ambientes hostiles durante el transcurso de sus ciclos biológicos [96, 97] y son considerados como blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevas drogas [89]. Adicionalmente, diversos estudios han revelado que el NAD participa en procesos de diferenciación celular [7], proliferación [6] y muerte celular de *Leishmania* [40, 41].

Por estas razones, la caracterización funcional de las enzimas involucradas en la síntesis del NAD, constituyen un punto crucial para el eventual desarrollo de nuevas estrategias de control del patógeno. En este sentido, el estudio de la proteína recombinante His-LbNMNAT y la identificación de diferencias estructurales con respecto a los ortólogos humanos, resultan primordiales.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Aproximarse al metabolismo del NAD en parásitos intracelulares, mediante la producción, obtención y caracterización bioquímica y funcional de la enzima recombinante nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT), enzima fundamental en el metabolismo energético del parásito.

3.2 Objetivos específicos

1. Optimizar las condiciones de expresión y purificación de la proteína recombinante His-LbNMNAT en el sistema de expresión heterólogo *E. coli*.
2. Caracterizar funcionalmente la proteína recombinante His-LbNMNAT mediante el establecimiento y análisis de sus parámetros enzimáticos.
3. Determinar los patrones de localización subcelular de la proteína NMNAT en el parásito mediante ensayos de inmunolocalización *in situ*.
4. Evaluar el efecto delecional de las secuencias exclusivas de la proteína recombinante His-LbNMNAT sobre su actividad enzimática y patrones de oligomerización.

5. Establecer los niveles de expresión, transcripcionales y traduccionales, de la NMNAT a través del ciclo de vida del parásito.

6. Construir de manera hipotética, las rutas metabólicas de síntesis y degradación del NAD en *Leishmania*, mediante la búsqueda bioinformática de las enzimas correspondientes.

4. Preguntas de investigación

Mediante herramientas bioinformáticas y metodologías experimentales, se pretende realizar un acercamiento funcional a la proteína LbNMNAT, dando respuesta a las siguientes inquietudes:

¿Cómo se comporta cinéticamente la enzima recombinante His-LbNMNAT y qué diferencias presenta con respecto a las proteínas recombinantes humanas correspondientes?

¿Qué efectos genera la alteración estructural de la proteína recombinante His-LbNMNAT sobre su actividad enzimática y organización oligomérica?

¿Dónde se localiza la proteína LbNMNAT en el parásito?

¿Cómo varían los niveles de expresión de la enzima LbNMNAT a través del ciclo biológico del parásito?

¿Cómo es la red metabólica del NAD en *L. braziliensis*?

5. Materiales y métodos

En el presente trabajo se estudiaron diferentes aspectos bioquímicos de la enzima recombinante His-LbNMNAT y la proteína LbNMNAT endógena de *L. braziliensis*. Respecto a la proteína recombinante His-LbNMNAT, se emprendió la caracterización enzimática y el estudio de sus secuencias exclusivas sobre la actividad catalítica y los patrones de oligomerización. En cuanto a la proteína endógena LbNMNAT, se determinó su localización intracelular y los niveles de expresión a través del ciclo de vida del parásito. De manera adicional, se construyeron, hipotéticamente, las rutas metabólicas de síntesis, modificación, degradación y transporte del NAD y sus precursores en *L. braziliensis*.

Para abordar las actividades mencionadas, se diseñaron y aplicaron diversas estrategias metodológicas. Estas estrategias se presentarán del siguiente modo: inicialmente, se describirá la metodología general de cada una de las actividades experimentales y bioinformáticas. Luego, se describirá en detalle cada uno de los protocolos relacionados con las mismas.

5.1. METODOLOGÍA GENERAL

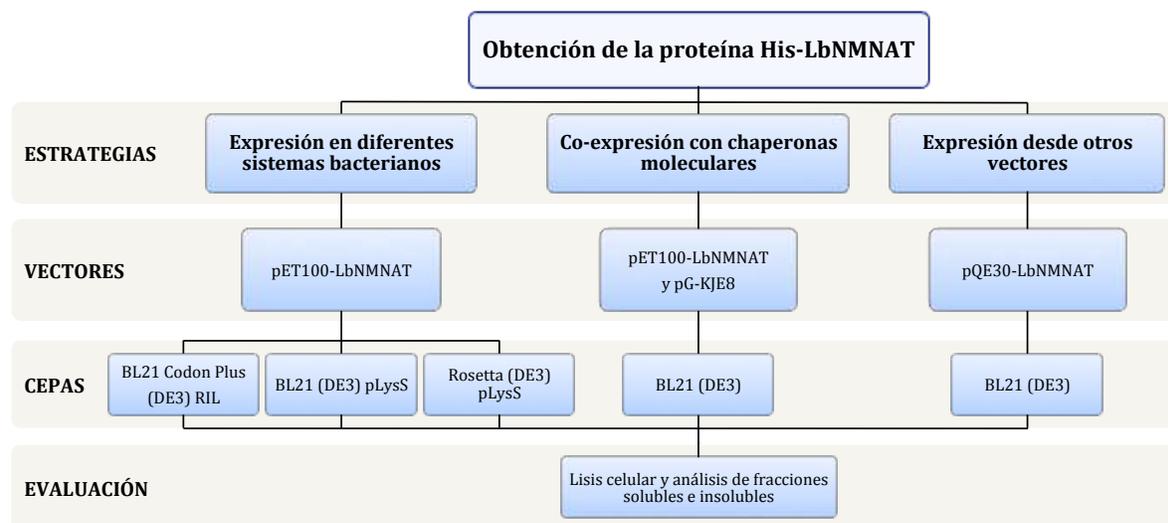
5.1.1. Obtención de la proteína recombinante His-LbNMNAT

En estudios previos, se construyó el plásmido recombinante pET100-LbNMNAT, el cual permite la expresión de la proteína LbNMNAT fusionada a la etiqueta de hexa-histidinas (6xHis) en su extremo amino terminal, bajo el control del promotor T7. Este plásmido ha permitido obtener cantidades abundantes de la proteína recombinante en la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) del sistema de expresión heterólogo *E. coli* BL21 (DE3)

[9]. Sin embargo, para caracterizar enzimáticamente una proteína, es necesario obtenerla soluble y nativa.

Por esta razón, se implementaron diferentes estrategias experimentales para expresar la proteína His-LbNMNAT en fracciones solubles. Estas estrategias se eligieron teniendo en cuenta las recomendaciones de diversos centros de investigación alrededor del mundo [98] y de acuerdo con la disponibilidad de los materiales necesarios para su ejecución. La Figura 5-1 presenta las estrategias experimentales elegidas.

Figura 5-1: Metodología general para obtener la proteína recombinante His-LbNMNAT en fracciones solubles.



Estrategia 1: Expresión de la proteína recombinante His-LbNMNAT en distintos sistemas de expresión.

El plásmido recombinante pET100-LbNMNAT se empleó para transformar mediante choque térmico [99] células *E. coli* de las cepas BL21 Codon Plus (DE3) RIL, BL21 (DE3) pLysS y Rosetta (DE3) pLysS. Los clones resultantes se utilizaron para sobre-expresar la proteína His-LbNMNAT, bajo las condiciones de temperatura, tiempo y concentración del agente inductor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) estandarizadas previamente [9]. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) [100].

Estrategia 2: Co-expresión de la proteína recombinante His-LbNMNAT junto con chaperonas moleculares en el sistema de expresión BL21 (DE3).

El plásmido pG-KJE8 que codifica un conjunto de cinco chaperonas moleculares (DnaK, DnaE, GrpE, GroES, GroEL) (Takara), se empleó para transformar mediante choque térmico células *E. coli* BL21 (DE3). Los clones obtenidos se utilizaron para preparar células químicamente competentes mediante métodos con CaCl_2 [99]. Estas células se transformaron con el plásmido recombinante pET100-LbNMNAT y los clones resultantes se emplearon para sobre-expresar la proteína His-LbNMNAT con IPTG. Las muestras inducidas se analizaron mediante SDS-PAGE.

Estrategia 3: Expresión de la proteína recombinante His-LbNMNAT desde el plásmido de expresión pQE30.

El plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT se construyó utilizando herramientas de biología molecular y estrategias de sub-clonación desde el plásmido pGEMT-Easy (Promega). El plásmido pQE30-LbNMNAT resultante permite la expresión de la proteína LbNMNAT fusionada a la etiqueta 6xHis en el extremo amino terminal, bajo el control del promotor T5. Este plásmido se empleó para estandarizar ensayos de inducción en el sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3) utilizando IPTG. Las muestras inducidas se analizaron mediante SDS-PAGE. La identidad del plásmido pQE30-LbNMNAT se confirmó mediante análisis de restricción y secuenciamiento.

La solubilidad de la proteína His-LbNMNAT proveniente de las tres estrategias descritas, se evaluó de la siguiente manera: las células inducidas se lisaron mediante métodos químicos (lisozima) y físicos (ultrasonido), verificando la presencia de la proteína recombinante en las fracciones solubles e insolubles resultantes. Dicha verificación se realizó mediante SDS-PAGE y ensayos de inmunodetección (Western blot) utilizando anticuerpos comerciales contra la etiqueta 6xHis. La purificación de la proteína His-LbNMNAT se realizó a partir de la fracción soluble proveniente de la estrategia 2 y 3, las cuales generaron la mayor cantidad de proteína soluble.

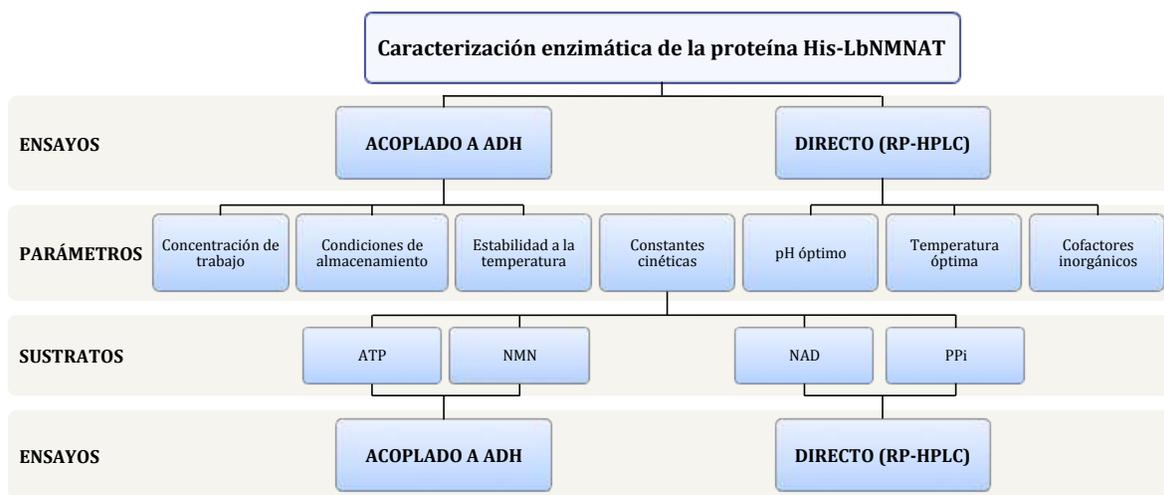
5.1.2. Purificación de la proteína recombinante His-LbNMNAT

La proteína His-LbNMNAT se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando metales inmovilizados (IMAC) capaces de unirse a la etiqueta 6xHis a la cual se encuentra fusionada, específicamente, se empleó la resina de níquel y ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (Quiagen). La purificación se evaluó mediante SDS-PAGE y la cuantificación de las muestras se efectuó con el método de Bradford usando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón [101].

5.1.3. Caracterización enzimática de la proteína recombinante His-LbNMNAT

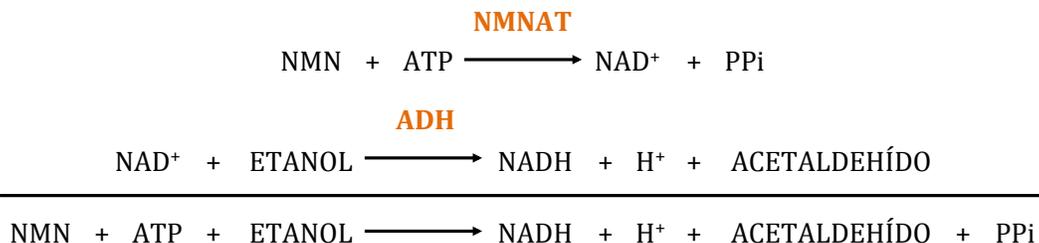
La identidad funcional de la proteína His-LbNMNAT y su participación en las rutas de biosíntesis del NAD, se confirmó ejecutando ensayos enzimáticos acoplados y directos. Estos ensayos, cuyo fundamento se describe a continuación, se aplicaron para estudiar diferentes parámetros de la proteína de interés (Figura 5-2).

Figura 5-2: Metodología general para caracterizar enzimáticamente la proteína recombinante His-LbNMNAT.



Ensayos enzimáticos acoplados:

La actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT (síntesis de NAD) se determinó mediante ensayos enzimáticos acoplados con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH EC: 1.1.1.1), monitoreando el incremento en la absorbancia a 340 nm, debido a la reducción del NAD⁺ a NADH, como ha sido descrito previamente [102, 103]. El sistema enzimático acoplado puede describirse mediante las siguientes ecuaciones químicas:



Ensayos enzimáticos directos:

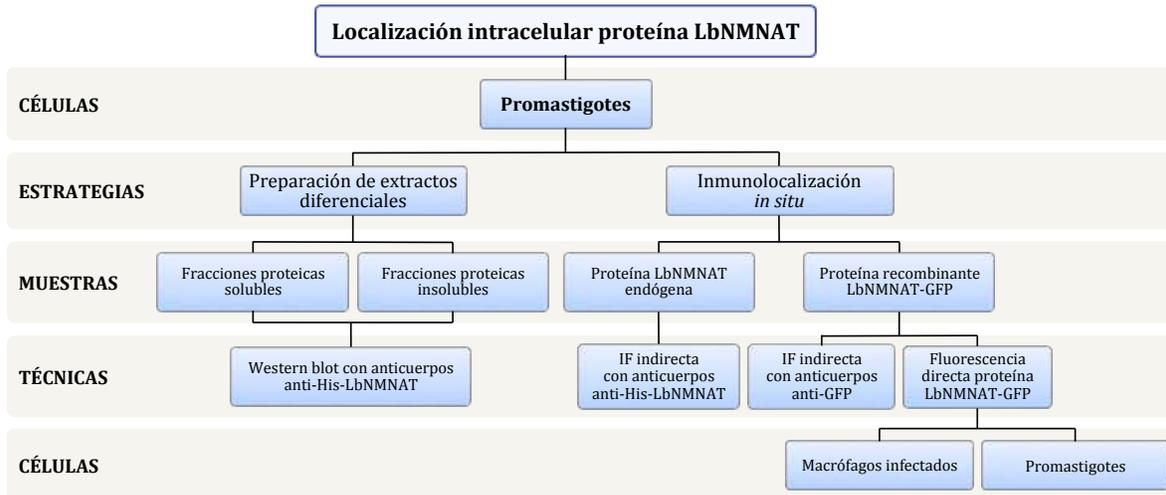
La síntesis de NAD por parte de la proteína His-LbNMNAT también se verificó con ensayos enzimáticos directos, los cuales se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC). El ensayo enzimático se describe del siguiente modo:



5.1.4. Localización subcelular de la proteína LbNMNAT en el parásito

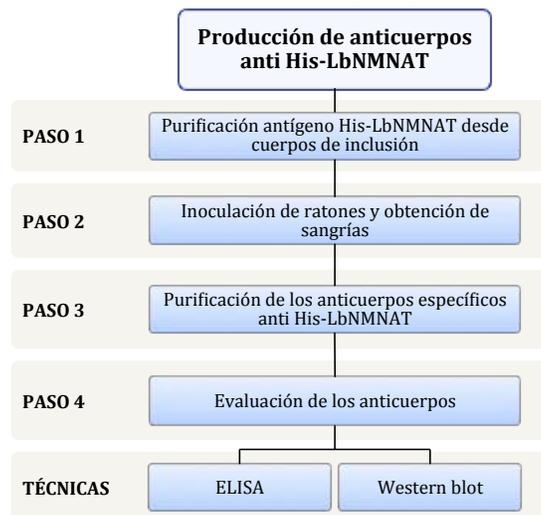
Con el propósito de distinguir los compartimentos intracelulares donde ocurre la síntesis de NAD en *L. braziliensis*, se implementaron dos estrategias experimentales para determinar la localización de la proteína LbNMNAT: preparación de extractos diferenciales y ensayos de inmunolocalización *in situ*. A su vez, esta última estrategia se compone de dos metodologías: inmunodetección de la proteína endógena LbNMNAT y sobre-expresión del transgen *lbnmnat-gfp* en el parásito. La proteína recombinante LbNMNAT-GFP se observó directamente en el parásito gracias a la fluorescencia de la misma y mediante inmunofluorescencia (IF) indirecta empleando anticuerpos anti-GFP sobre parásitos fijados (Figura 5-3).

Figura 5-3: Metodología general para determinar la localización subcelular de la proteína LbNMNAT en el parásito.



Para estudiar la localización intracelular de la proteína LbNMNAT, se hizo necesario producir anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante His-LbNMNAT. Para ello, los patrones de insolubilidad de dicha proteína cuando es sobre-expresada desde el plásmido pET100-LbNMNAT, se aprovecharon para aislar y solubilizar cuerpos de inclusión, los cuales se purificaron desde SDS-PAGE preparativos y se utilizaron como antígeno en la producción de los anticuerpos policlonales anti His-LbNMNAT en modelos murinos. Los anticuerpos generados se evaluaron mediante ELISA y Western blot. La Figura 5-4 resume la metodología relacionada con la producción de estos anticuerpos.

Figura 5-4: Producción y evaluación de anticuerpos policlonales anti His-LbNMNAT.



5.1.5. Estudio funcional de versiones truncadas de la proteína recombinante His-LbNMNAT

A partir del análisis de las estructuras primarias de la proteína LbNMNAT y las proteínas humanas correspondientes (HsNMNAT1-3), se identificaron inserciones exclusivas en la enzima del parásito. Con el objetivo de evaluar funcional y estructuralmente las inserciones identificadas, se generaron proteínas truncadas en dichas inserciones y se procedió a estudiar la actividad enzimática y los patrones de oligomerización de las mismas. Específicamente, se generaron las proteínas His-LbNMNAT Δ 1-43 y His-LbNMNAT Δ 241-249. La purificación de estas proteínas se realizó mediante IMAC empleando la resina Ni-NTA.

El efecto deletional sobre la actividad enzimática se evaluó ejecutando ensayos enzimáticos acoplados y directos, mientras que el efecto sobre los patrones de oligomerización se investigó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida nativos (PAGE) y gráficos de Ferguson.

5.1.6. Análisis de los niveles de expresión de la NMNAT en el parásito

Con el ánimo de comprender ampliamente el proceso biosintético del NAD en *Leishmania*, se estudiaron los niveles de expresión genética de la NMNAT a nivel transcripcional (ARN mensajero) y traduccional (proteína), en los estadios de diferenciación disponibles del parásito.

Los niveles de expresión del transcrito *lbnmnat* en promastigotes y amastigotes (provenientes de macrófagos infectados), se determinaron mediante extracción de ARN, ensayos de amplificación por PCR acoplados a Transcripción Reversa (RT-PCR) y PCR cuantitativo en Tiempo Real (RT-qPCR). Por su parte, los niveles de expresión de la proteína LbNMNAT se analizaron en extractos proteicos del parásito (promastigotes y amastigotes axénicos) mediante SDS-PAGE y Western blot.

5.1.7. Construcción de las rutas metabólicas del NAD en *Leishmania*

Las rutas de síntesis, modificación, degradación y transporte del NAD y sus precursores en el parásito se construyeron de manera bioinformática. Inicialmente, se analizaron rutas descritas para otros organismos, empleando la Enciclopedia de Genes y Genomas Kyoto (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [104], la base de datos MetaCyc [105] y la Red de Ancestría Molecular (MANET) [106]. Esta información se utilizó como plantilla para construir las rutas de síntesis y degradación del NAD en *Leishmania*.

Luego, cada una de las enzimas involucradas en las rutas mencionadas, se buscaron en las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) y del Centro de Recursos Bioinformáticos de Patógenos Eucariotas (EuPathDB, TriTrypDB) (<http://tritrypdb.org>). Dicha búsqueda se realizó del siguiente modo: en primer lugar se generaron alineamientos múltiples entre las enzimas de interés descritas en otros organismos. Seguidamente, las secuencias consenso obtenidas se emplearon para realizar TBLASTN dentro del genoma del parásito. Esta herramienta genera un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de interés y los 6 marcos de lectura posibles para genes del parásito. La similitud entre las secuencias se evaluó con los valores estadísticos *e-value* y *score*.

Con el objetivo de validar la función de las secuencias candidato identificadas, se determinó la presencia de dominios conservados y la ontología genética de las mismas (NCBI, Conserved Domains; Kegg, Gene Ontology). Finalmente, las secuencias candidato validadas se utilizaron para construir las rutas de síntesis, modificación, degradación y transporte del NAD y sus precursores en *Leishmania*.

5.2. METODOLOGÍA DETALLADA

5.2.1. Expresión de la proteína recombinante His-LbNMNAT en distintos sistemas de expresión

El plásmido recombinante pET100-LbNMNAT se utilizó para transformar mediante choque térmico células *E. coli* de las cepas BL21 (DE3), BL21 Codon Plus (DE3) RIL, BL21 (DE3) pLysS y Rosetta (DE3) pLysS. Los clones resultantes se inocularon individualmente en

medios Luria Bertani (LB) suplementados con 100 µg/ml de ampicilina (cepa BL21 (DE3)) y 50 µg/ml de cloranfenicol (cepas restantes). Los inóculos se incubaron aproximadamente 12 horas (h) (Overnight, ON) a 37°C con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se realizó una dilución (1:50) de los inóculos y se incubaron como se mencionó hasta alcanzar una densidad óptica (OD) a 600 nm de ~ 0.6. En este punto de crecimiento se indujo la expresión de la proteína recombinante utilizando IPTG (concentración final 0.5 mM). Los ensayos de inducción se realizaron durante 6 h a 24°C con agitación constante. Las muestras inducidas se analizaron mediante (SDS-PAGE) en geles discontinuos (gel concentrador: 3.9%; gel separador: 12%).

5.2.2. Co-expresión de la proteína recombinante His-LbNMNAT con chaperonas moleculares en el sistema de expresión BL21 (DE3)

El plásmido pG-KJE8 se utilizó para transformar mediante choque térmico células *E. coli* BL21 (DE3) químicamente competentes. Las células transformadas se seleccionaron sobre medios sólidos LB suplementados con 50 µg/ml de cloranfenicol y se utilizaron para preparar células químicamente competentes empleando métodos con CaCl₂. Estas células competentes se transformaron con el plásmido recombinante pET100-LbNMNAT y los clones resultantes se inocularon individualmente en medios LB suplementados con 100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de cloranfenicol y 1% (P/V) de glucosa. Los inóculos se incubaron ON a 37°C con agitación constante, se realizó una dilución (1:50) de los mismos en el medio mencionado suplementado con 1 mg/ml de arabinosa y 10 ng/ml de tetraciclina (inductores de la expresión de chaperonas) y se incubaron hasta alcanzar una OD a 600 nm de ~ 0.6. En este punto de crecimiento se indujo la expresión de la proteína recombinante utilizando IPTG (concentración final 0.5 mM). Los ensayos de inducción se realizaron ON a 37°C con agitación constante. Las muestras inducidas se analizaron mediante SDS-PAGE en geles discontinuos.

5.2.3. Construcción del plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT

Amplificación y purificación del fragmento *lbnmnat*:

El plásmido recombinante pET100-LbNMNAT se utilizó como plantilla para amplificar el fragmento *lbnmnat* mediante PCR. La reacción de amplificación se ejecutó en un volumen

final de 25 µl de buffer de PCR, el cual contenía 1 mM de MgSO₄, 300 µM de dNTPs, 0.3 µM de oligonucleótidos, 50 ng de plantilla y 0.6 Unidades (U) de *Pfx* Polimerasa (Invitrogen). La secuencia de los oligonucleótidos empleados se indica en la Tabla 5-1 (Oligonucleótidos "*lbnmna*"). Se utilizó el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 94°C, 2 minutos (min) y 30 ciclos de desnaturalización a 94°C, 15 segundos (s), anillaje a 55°C, 30 s y extensión a 68°C, 1 min. La extensión final se realizó durante 7 min a 68°C. Después de realizar la reacción de amplificación, se agregaron 5 U de Taq Polimerasa a la mezcla de reacción, la cual se incubó a 72°C durante 10 min. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (P/V) utilizando buffer TAE 1X (40 mM Tris Acetato, 1 mM EDTA), realizando tinciones con bromuro de etidio 0.05% (V/V). El producto de interés se purificó desde el gel mediante métodos de filtración (Montage DNA Gel Extraction Kit, Millipore).

Tabla 5-1: Secuencia de los oligonucleótidos empleados en el presente estudio.

Nombre	Directo (5' - 3')	Reverso (5' - 3')
<i>lbnmna</i>	GCGGGGATCCATGTTATCCTCTACTGC TGCC	GCGGGGTACCTCAGGACGGAAGC CCCTCTCC
<i>Delección N-terminal</i>	CACCGTCGTTCTCGTCATCT	TCAGGACGGAAGCCCCTCTCC
<i>Delección C-terminal</i>	TCCGTGCCCGACGACACATCCTCG	CAACATGTCGATCTCAATTCTCTC
<i>pSP72</i>	GGCTCTAGAAATGTTATCCTCTACTGCT	GGCTCTAGAGGACGGAAGCCCCTC
<i>glutamil cisteina sintetasa</i>	CCATACAATCTGTCGGTGGA	GCTGCCCTTTGAAGTATTGG
<i>antígeno de superficie</i>	TGGGGTAAACTTCGATTGCT	AAGCGCATCTTACTCATGGA
<i>lbnmna-RT-qPCR</i>	AGGACGGACAAGCTAAAGCC	CGGCTGCAGTAAGGGGTGTA
<i>40s</i>	AGACGCTGGTGAAGAACTGC	AAGTCGATGCCGTAATGCTT

En negrilla se indican las secuencias sustrato para las enzimas de restricción BamHI (Directo) y KpnI (Reverso). En azul se indica la secuencia requerida para la ligación direccionada con el plásmido pET100/D-TOPO. Las regiones subrayadas indican las secuencias sustrato para la enzima de restricción XbaI.

Clonación del producto *lbnmna* en el plásmido pGEMT-Easy:

El producto *lbnmna* purificado se ligó con el plásmido de clonación pGEMT-Easy (Promega) a una razón molar entre el producto y el plásmido de 3:1. La reacción de ligación se utilizó para transformar mediante choque térmico, células *E. coli* TOP 10 químicamente competentes. Los clones resultantes se seleccionaron sobre medios sólidos LB suplementados con 100 µg/ml de ampicilina, 80 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactopiranosido (X-GAL) y 0.5 mM de IPTG. Las colonias obtenidas se rastrearon mediante amplificación por PCR, resuspendiendo cada una de éstas en 30 µl de H₂O e incubándolas a 94°C durante 10 min.

Esta resuspensión de bacterias se utilizó como plantilla en ensayos de PCR. La reacción de amplificación se ejecutó en un volumen final de 15 μ l de buffer de PCR, el cual contenía 1.5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 0.2 μ M de oligonucleótidos (Oligonucleótidos “*lbnmna*”, Tabla 3), 5 U de Taq Polimerasa y la plantilla necesaria para completar el volumen de reacción. Se aplicó el perfil térmico mencionado previamente, utilizando 72°C como temperatura de extensión. Los productos obtenidos se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (P/V) utilizando buffer TBE 0.5 X (44.5 mM Tris, 44.5 mM Borato, 0.025 mM EDTA), realizando tinciones con bromuro de etidio 0.05% (V/V).

Purificación del plásmido recombinante pGEMT-LbNMNAT:

Los clones positivos del ensayo de amplificación se inocularon individualmente en medios LB suplementados con 100 μ g/ml de ampicilina ON a 37°C con agitación constante. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 8000 rpm por 5 min a 4°C. Los precipitados obtenidos se utilizaron para extraer el ADN plasmídico por lisis alcalina [107]. La pureza, concentración e integridad del plásmido purificado (denominado pGEMT-LbNMNAT) se determinó a partir de medidas espectrofotométricas y electroforesis en geles de agarosa 0.8% (P/V) utilizando buffer TBE 0.5 X.

Sub-clonación del producto *lbnmna* en el plásmido pQE30:

Los plásmidos pGEMT-LbNMNAT y pQE30 (Quiagen) se sometieron a ensayos de doble digestión con las enzimas BamHI y KpnI (Fermentas) ON a 37°C. Los productos de la digestión se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (P/V) utilizando buffer TAE 1X. Los fragmentos de interés se purificaron desde los geles como se mencionó previamente. Estos productos se ligaron ON a 22°C empleando la enzima ligasa T4 (Promega). La reacción de ligación se utilizó para transformar mediante choque térmico, células *E. coli* JM109 químicamente competentes. Los clones resultantes se seleccionaron sobre medios sólidos LB suplementados con 100 μ g/ml de ampicilina y se rastrearon mediante amplificación por PCR.

Los clones positivos del ensayo de amplificación se inocularon individualmente en medios LB suplementados con 100 μ g/ml de ampicilina y se realizó extracción plasmídica

mediante lisis alcalina. Con el propósito de confirmar la identidad recombinante del plásmido purificado (denominado pQE30-LbNMNAT), éste se sometió a ensayos de doble digestión con las enzimas BamHI y KpnI para verificar la liberación del inserto de interés (fragmento *lbnmnat*). Adicionalmente, se analizó el plásmido mediante secuenciamiento (Anexo A, análisis y mapa del vector pQE30-LbNMNAT).

5.2.4. Expresión de la proteína recombinante His-LbNMNAT desde el plásmido pQE30-LbNMNAT

El plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT se utilizó para transformar mediante choque térmico, células *E. coli* BL21 (DE3) químicamente competentes. Los clones resultantes se inocularon en medios LB suplementados con 100 µg/ml de ampicilina. La inducción de la proteína recombinante His-LbNMNAT se realizó con IPTG (concentración final 0.5 mM) ON a 37°C con agitación constante. Las muestras inducidas se analizaron mediante SDS-PAGE en geles discontinuos.

5.2.5. Determinación de la solubilidad de la proteína recombinante His-LbNMNAT

Las células provenientes de los ensayos de inducción anteriores, se recolectaron mediante centrifugación a 8000 rpm por 5 min a 4°C. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en buffer de lisis (1 mg/ml lisozima, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0/NaOH, 10 mM imidazol) utilizando 5 ml/gramo de peso húmedo celular. Esta resuspensión se incubó 30 min a 4°C con agitación constante. Las muestras se sometieron a ciclos de ultrasonido (50 % de amplitud, pulsos de 15 s y reposo de 15 s entre los mismos para un total de 10 min), se centrifugaron a 12000 rpm por 20 min a 4°C y se separaron las fracciones solubles de las insolubles. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE en geles discontinuos.

5.2.6. Análisis de la proteína recombinante His-LbNMNAT mediante Western blot

Las muestras a evaluar se separaron mediante SDS-PAGE en geles discontinuos y se transfirieron hacia membranas PVDF (Millipore) aplicando una corriente de 20 mA por 12

h en buffer de transferencia (0.2 M glicina, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 10% (V/V) metanol). La efectividad de las transferencias se evaluó con solución de tinción reversible Ponceau S. Posteriormente, las membranas se bloquearon 2 h con solución de leche descremada 5% (P/V) en TBS-Tween (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.1% (V/V) Tween 20).

La inmunodetección de la proteína recombinante se realizó con el anticuerpo primario anti-6xHis (1:5000) (Abcam) y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a biotina (1:5000) (Sigma). La detección cromogénica de los complejos inmunológicos se realizó utilizando estreptavidina A conjugada a fosfatasa alcalina (1:3000) (Promega) y los sustratos nitro-azul de tetrazolio (NBT) (50mg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3'-indoilfosfato (BCIP) (50mg/ml) (Promega) en buffer sustrato (150 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 9.0, 1 mM MgCl₂). La detección inmunológica se detuvo con agua destilada al evidenciar productos coloreados sobre las membranas.

Entre los cambios de anticuerpos y fosfatasa alcalina se realizaron tres lavados con TBS-T leche de 10 min cada uno. Después de incubar las membranas con la estreptavidina A conjugada a fosfatasa alcalina, estas se lavaron como se mencionó anteriormente con TBS-T.

5.2.7. Purificación de las proteínas recombinantes His-LbNMNAT e His-HsNMNAT1 y 3:

Expresión de las proteínas recombinantes His-HsNMNAT1 y 3:

Para obtener controles positivos en los ensayos de actividad enzimática, se purificaron las proteínas recombinantes His-HsNMNAT1 y 3 mediante IMAC, partiendo de los plásmidos recombinantes pQE30-HsNMNAT1 y 3 [108]. Estos se utilizaron para transformar mediante choque térmico, células *E. coli* BL21 (DE3) químicamente competentes. Los clones de expresión obtenidos se inocularon en 500 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se realizó la inducción del mismo por 6 h a 24°C utilizando IPTG (concentración final 0.5 mM). Finalmente, se recolectaron las células y se prepararon extractos solubles.

Purificación de las proteínas recombinantes His-LbNMNAT e His-HsNMNAT1 y 3 mediante cromatografía de afinidad a níquel:

Los extractos solubles enriquecidos con las proteínas His-LbNMNAT e His-HsNMNAT1 y 3 (20 ml de extracto) se suplementaron con un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma P8340) (relación volumétrica coctel:extracto 1:400). Los extractos se incubaron con la resina Ni-NTA (0.5 ml) previamente equilibrada con buffer de unión (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0/NaOH, 10 mM imidazol) durante 1 h sobre hielo con agitación constante. Esta mezcla se centrifugó a 4000 rpm por 3 min a 4°C y se separó el sobrenadante (proteínas no retenidas) del precipitado, el cual se lavó 3 veces con 10 ml de buffer de lavado (100 mM NaCl, 80 mM Tris/HCl pH 7.5, 30 mM imidazol). Los lavados realizados se monitorearon mediante espectrofotometría a 280 nm.

Finalmente, se realizaron 4 eluciones con 0.5 ml de buffer de elución (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH 7.5, 250 mM imidazol) durante 1 h sobre hielo con agitación constante. Cada eluido se dializó contra 1000 ml de buffer de lisis (sin lisozima y sin imidazol) ON a 4°C y se suplementaron con 1mM de DTT y 10 % (V/V) de glicerol. Los eluidos se almacenaron a -20°C. Los pasos de la purificación se analizaron mediante SDS-PAGE en geles discontinuos.

5.2.8. Ensayos enzimáticos acoplados

Se realizó una mezcla de reacción que contenía 40 mM etanol, 25 mM HEPES/KOH pH 7.4, 14 mM semicarbazida, 10 mM MgCl₂, 1.25 mM ATP (Sigma), 1.25 mM NMN (Sigma) y 2U ADH (Sigma). Esta mezcla se alicuotó en placas de 96 pozos, se incubó a 37°C durante 5 min y se inició la reacción al adicionar 2.5 µg de las muestras a evaluar. Los ensayos se realizaron en un volumen de 100 µl a 37°C con agitación constante en el lector de microplacas GENios (TECAN), registrando los valores de absorbancia a 340 nm durante 30 min.

5.2.9. Ensayos enzimáticos directos

Se realizó una mezcla de reacción que contenía 25 mM HEPES/KOH pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1.25 mM ATP y 1.25 mM NMN. Adicionalmente, se realizaron ensayos con 1.25 mM ATP y 1.25 mM NAMN para evaluar la actividad de la enzima His-LbNMNAT en

presencia de este mononucleótido. La reacción se inició al adicionar 2.5 µg de las muestras a evaluar. Las reacciones enzimáticas se incubaron a 37°C durante 5 min y se frenaron mediante filtración a través de un dispositivo Centricon (Millipore, MWCO 30 kDa). El filtrado obtenido se analizó mediante RP-HPLC.

5.2.10. Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC)

Las separaciones cromatográficas se realizaron con una columna C18 de 25 cm de largo x 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 µm (Phenomenex) en el cromatógrafo Agilent 1200 Series. Se realizó un gradiente de elución utilizando los buffers A (0.1 mM fosfato de potasio, pH 6.0) y B (0.1 mM fosfato de potasio, pH 6.0, 20% (V/V) metanol) de la siguiente manera: 7 min buffer A (100%), 2 min buffer B (30%), 4 min buffer B (60%), 2 min buffer B (30%), 2 min buffer A (100%). Las separaciones se efectuaron a temperatura ambiente con un flujo de 1.5 ml/min, inyectando 10 µl de muestra. La detección de los analitos se realizó a 254 nm. Para realizar análisis cuantitativos, se inyectaron cantidades conocidas de ATP y NAD y se construyeron curvas de calibración.

5.2.11. Determinación de la concentración óptima de trabajo de la proteína recombinante His-LbNMNAT

Los eluidos obtenidos en la cromatografía de afinidad se reunieron en un único pool, el cual se diluyó de manera seriada con buffer de lisis (sin lisozima). La concentración del pool se determinó mediante el método de Bradford utilizando BSA como patrón. Las diluciones preparadas se emplearon para la ejecución de ensayos enzimáticos acoplados. La concentración óptima determinada se empleó en los siguientes ensayos de actividad.

5.2.12. Determinación de las condiciones óptimas de almacenamiento de la proteína recombinante His-LbNMNAT

La proteína recombinante His-LbNMNAT se sometió a diferentes tratamientos, se almacenó a -20°C durante dos semanas y se evaluó su actividad enzimática mediante ensayos enzimáticos acoplados. Se realizaron los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1: suplementar proteína con 1mM de DTT.

Tratamiento 2: suplementar proteína con 1mM de DTT y 10 % (V/V) de glicerol.

Tratamiento 3: micro-diálisis de 100 μ l proteína contra 100 ml de buffer de lisis (sin lisozima y sin imidazol).

El tratamiento más efectivo en conservar la actividad enzimática, se aplicó para el almacenamiento de las proteínas recombinantes purificadas. Adicionalmente, se evaluaron diferentes temperaturas de almacenamiento (-80 y 4°C). Es necesario mencionar que, no se realizaron ensayos de caracterización enzimática con preparaciones de proteína almacenadas por períodos superiores a 5 días, es decir, siempre se trabajó con preparaciones frescas de la proteína His-LbNMNAT.

5.2.13. Ensayos de estabilidad a la temperatura

Los ensayos de termo-estabilidad se realizaron al incubar la enzima a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 45, 50, 55 y 70°C) durante 5 min. Transcurrido este tiempo, la enzima se colocó sobre hielo durante 1 min y se utilizó para la ejecución de ensayos enzimáticos acoplados.

5.2.14. Determinación del pH óptimo de reacción de la proteína recombinante His-LbNMNAT

Se determinó el pH óptimo de reacción evaluando un rango de pH entre 5 y 9, para lo cual se empleó buffer citrato (pH 5-6.5), buffer HEPES (pH 7-7.5) y buffer borato (pH 8-9) en el buffer de reacción, evaluando la producción de NAD mediante ensayos enzimáticos directos.

5.2.15. Determinación de la temperatura óptima de reacción de la proteína recombinante His-LbNMNAT

La temperatura óptima de reacción se estableció ejecutando los ensayos enzimáticos directos a diferentes temperaturas (4-40°C), las cuales se controlaron mediante el empleo de termocicladores (MyCycler, Bio-Rad).

5.2.16. Estudio del efecto de cofactores inorgánicos sobre la actividad enzimática de la proteína recombinante His-LbNMNAT

Se ensayó el efecto de diferentes cationes divalentes (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) a una concentración de 10 mM en el buffer de reacción, sobre la actividad de la proteína recombinante His-LbNMNAT, mediante ensayos enzimáticos directos.

5.2.17. Determinación de las constantes cinéticas (K_m y V_{max}) de la proteína recombinante His-LbNMNAT

Establecidas las condiciones óptimas de actividad enzimática, se determinaron las constantes cinéticas de la proteína recombinante His-LbNMNAT, manteniendo concentraciones saturantes de uno de los sustratos y variando la concentración del otro. Las concentraciones exactas para cada sustrato se indican en los resultados correspondientes (Figura 6-20). Se empleó el ensayo enzimático acoplado para determinar las constantes por los sustratos NMN y ATP. El ensayo enzimático directo se empleó para determinar las constantes por los sustratos NAD y PPi. La velocidad inicial de reacción, expresada como μmol de NAD producidos/min x mg proteína, se determinó a partir de la región lineal de actividad enzimática. Los datos obtenidos se utilizaron para realizar curvas de regresión no lineal (Michaelis-Menten) y lineal (Hanes-Woolf), empleando los programas Prism6 y Excel, respectivamente.

Determinación de la constante de equilibrio (K_D) de la proteína recombinante His-LbNMNAT:

Se ejecutaron ensayos enzimáticos directos durante 2, 4 y 24 horas empleando 500 μM de los sustratos NMN y ATP ó 1 mM de los sustratos NAD y PPi. La cantidad respectiva de los productos sintetizados se determinó mediante curvas de calibración. La K_D se calculó con la fórmula $K_D = [\text{producto 1}] \times [\text{producto 2}] / [\text{sustrato 1}] \times [\text{sustrato 2}]$.

5.2.18. Producción de anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante His-LbNMNAT

Obtención de la proteína recombinante His-LbNMNAT a partir de cuerpos de inclusión:

El clon de expresión BL21 (DE3)-LbNMNAT se inoculó en 100 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml). El inoculo se indujo durante 6 h con IPTG (concentración final 0.5 mM). La fracción insoluble (cuerpos de inclusión, CI) proveniente de la lisis de este cultivo se homogenizó en 2 ml de buffer de lavado 1 (2 M urea, 100 mM Tris/HCl pH 7.0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 2% (P/V) Tritón X-100) y se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4°C. Este lavado se realizó dos veces. Con el propósito de retirar el exceso de urea y Tritón X-100, el precipitado resultante se homogenizó como se mencionó pero en buffer de lavado 2 (100 mM Tris/HCl pH 7.0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT). El precipitado obtenido se homogenizó en 800 µl de buffer de resuspensión (8 M hidrocloreuro de guanidina, 50 mM Tris/HCl pH 7.0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT), se centrifugó a 14000 rpm por 1 h a 4°C y se separaron las fracciones solubles (CI solubilizados) de las insolubles.

Con el objetivo de retirar el exceso de hidrocloreuro de guanidina, los CI solubilizados se sometieron a diálisis contra 2000 ml de buffer de diálisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7.5) a 4°C ON. Dado que se formó un precipitado dentro de la membrana de diálisis, la muestra se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4°C y se separó el sobrenadante del precipitado. El precipitado se resuspendió en buffer de carga para SDS-PAGE y se cargó en geles SDS-PAGE preparativos desde donde se extrajo la banda de interés (proteína His-LbNMNAT), la cual se eluyó con agua desde la matriz de poliacrilamida macerada. Las muestras obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE en geles discontinuos.

Esquema de inmunización de ratones y obtención de sueros sanguíneos:

La obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante His-LbNMNAT se realizó empleando protocolos estandarizados [109] y los CI previamente purificados. Se emplearon ratones hembra *Mus musculus* BALB-C de seis semanas de edad para

realizar inoculaciones intraperitoneales. Se utilizaron dos individuos por cada tratamiento. El programa de inoculación empleado se describe a continuación:

Tabla 5-2: Esquema de inmunización utilizado para la producción de anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante his-Ibnmnat en ratones.

	1ª Inoculación	2ª Inoculación	3ª Inoculación	4ª Inoculación
Día	0	8	16	24
Adyuvante de Freund	Completo	Incompleto	Incompleto	Incompleto
Cantidad antígeno (µg)	~ 50	~ 50	~ 50	~ 50
Volumen de inyección (µl)	350	350	350	350

Las emulsiones antigénicas se prepararon en el adyuvante correspondiente de la siguiente manera: según la concentración del antígeno, se mezcló el volumen apropiado del mismo con el adyuvante en cuestión, completando el volumen de inyección con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4. El adyuvante empleado representó la mitad del volumen total de la emulsión. Esta mezcla se homogenizó con vortex durante 10 min. Como control de inmunización (suero no relacionado) se inyectó PBS preparado en el adyuvante apropiado.

Dos semanas después de la cuarta inoculación, se tomaron 100 µl de sangre periférica de cada individuo. Estas muestras se incubaron a 37°C durante 20 min (coagulación) y se centrifugaron a 12000 rpm por 20 min a 4°C. El suero obtenido (sobrenadante) se suplementó con glicerol 10% (V/V) y se almacenó a -80°C. Este proceso se repitió una semana después. Finalmente, se obtuvo la sangre total de los ratones cuando se completaron cuatro semanas después de la última inoculación.

Los ratones BALB-C se obtuvieron en el Instituto Nacional de Salud de Colombia, se mantuvieron en el Bioterio del Departamento de Farmacia bajo condiciones libres de patógenos y se manipularon siguiendo protocolos aprobados por el Comité de Ética de Animales de Experimentación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

Purificación de los anticuerpos anti His-LbNMNAT:

La proteína His-LbNMNAT (200 μ g) se separó mediante SDS-PAGE en geles discontinuos. La proteína se transfirió a membrana de nitrocelulosa, la banda de interés se visualizó con Ponceau S, se cortó la región de membrana correspondiente y se realizó un pre-eluido con glicina 100 mM pH 2.5 por 10 min con agitación constante. La membrana se lavó con TBS-T por 10 min y se bloqueó en TBS-T leche 5% (P/V) por 1 h. El exceso de leche se retiró mediante tres lavados con TBS-T de 10 min cada uno. La membrana se cortó en cuadros de 2 x 2 mm y se incubó ON con los sueros obtenidos en agitación constante. Los anticuerpos no unidos se almacenaron a -20°C y las membranas se lavaron con TBS-T como se mencionó. Los lavados se monitorearon por espectrofotometría. Se lavó hasta obtener medidas de Abs a 280 nm inferiores a 0.1. Finalmente, se realizaron eluidos de la siguiente manera: se adicionaron 150 μ l de glicina 100 mM pH 2.5 a las membranas y se incubaron por 10 min, agitando con vortex cada 2 min. Los eluidos se neutralizaron con 15 μ l de Tris/HCl 2 M pH 8.5 y se almacenaron a -20°C [110].

Evaluación de diferentes diluciones de los anticuerpos anti His-LbNMNAT mediante ELISA:

Se realizaron ELISAs indirectos en placas de 96 pozos preparando el antígeno empleado para inocular los ratones (proteína His-LbNMNAT) en buffer carbonato 50 mM pH 9,6 a una concentración de 100 μ g/ml. De esta preparación se sembraron 100 μ l por pozo. La placa se cubrió con plástico y papel aluminio, se incubó 1 h a 37°C y posteriormente 48 h a 4°C . Se realizaron tres lavados con PBS pH 7.4, se adicionaron 200 μ l de solución de leche descremada en PBS al 5% (P/V) durante 2 h a 37°C y se lavó nuevamente tres veces con PBS. Se adicionaron 100 μ l de diferentes diluciones del anticuerpo primario anti His-LbNMNAT preparadas en PBS durante 2 h a 37°C . Se realizaron tres lavados con PBS y se agregaron 100 μ l del anticuerpo secundario (anti-ratón acoplado a peroxidasa) (Sigma) en una dilución de 1:8000 preparada en PBS durante 2 h a 37°C y se realizaron cinco lavados con PBS. El revelado de la placa se realizó con 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) (Sigma) y peróxido de hidrógeno en buffer citrato-fosfato 100mM pH 5. La placa se leyó a 410 nm.

Evaluación de diferentes diluciones de los anticuerpos anti His-LbNMNAT mediante Western blot:

El antígeno empleado para realizar las inoculaciones de los ratones (proteína His-LbNMNAT) se separó mediante SDS-PAGE en geles discontinuos, cargando 500 ng del mismo por carril. Las proteínas se transfirieron hacia membranas PVDF y la detección inmunológica del antígeno se realizó utilizando como anticuerpo primario diferentes diluciones (1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:10000) del anticuerpo anti His-LbNMNAT preparadas en TBS-T y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a biotina (1:5000). La detección cromogénica de los complejos inmunológicos se realizó empleando estreptavidina A conjugada a fosfatasa alcalina. La detección cruzada de las NMNATs recombinantes de *P. falciparum* (His-PfNMNAT), *G. lamblia* (His-GINMNAT) y *H. sapiens* (His-HsNMNAT3), se verificó utilizando el anticuerpo anti His-LbNMNAT en una dilución 1:5000. El suero no relacionado (1:500) y el anticuerpo anti-His (1:5000) se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente.

5.2.19. Determinación de la localización intracelular de la proteína NMNAT en *L. braziliensis*

Cultivo de promastigotes y ensayos de diferenciación *in vitro*:

Se emplearon promastigotes de *L. braziliensis* (M2904 MHOM/BR/75M2904), *L. mexicana* (BEL21) y *L. major* (MHOM/IL/80/Friedlin). Las dos primeras especies se cultivaron en medio LIT pH 7.4 suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (V/V) a 26°C en flasks de 25 cm² (T25), mientras que *L. major* se cultivó en medio RPMI-1640 pH 7.4 suplementado con SFB 10% (V/V). De manera adicional, los promastigotes de *L. braziliensis* se cultivaron en medio Schneider pH 7.4 (Sigma) suplementado con SFB 10% (V/V) (medio completo). El crecimiento celular se monitoreó mediante la construcción de curvas de crecimiento empleando el hematocitómetro de Neubauer. Los cultivos se diluyeron al alcanzar la fase de crecimiento estacionaria, inoculando parásitos a una concentración inicial de 1×10^6 células/ml [111].

Para los ensayos de diferenciación *in vitro*, cuyo objetivo es generar amastigotes axénicos, se cultivaron promastigotes de *L. braziliensis* en medio RPMI-1640 suplementado con SFB 10% (V/V) pH 6 a 37°C durante 48 h [112, 113]. El proceso de diferenciación se monitoreó mediante observaciones microscópicas.

Preparación de extractos de proteínas:

Aproximadamente $7,5 \times 10^8$ promastigotes se colectaron mediante centrifugación a 8000 rpm por 10 min a 4°C, se lavaron 2 veces con 10 ml de PBS pH 7.4, se resuspendieron en 500 μ l de buffer de lisis (0.1X PBS, coctel de inhibidores de proteasas (1:200), 0.1% (V/V) Tritón X-100) y se incubaron durante 30 min a 4°C con agitación constante. Una alícuota de esta suspensión celular se almacenó a 4°C (*Extracto total Tritón X-100*). La suspensión restante se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4°C y se almacenó el sobrenadante a 4°C (*Fracción soluble*). El precipitado se resuspendió en buffer de carga 1X para SDS-PAGE (*Fracción insoluble*). Adicionalmente, se recolectaron parásitos y se lisaron en buffer de carga 1X para SDS-PAGE (1×10^5 células/ μ l) (*Extracto total SDS*). Todas las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en geles discontinuos.

Inmunodetección de la proteína LbNMNAT endógena mediante Western blot:

Los extractos de proteínas preparados (*Extracto total Tritón X-100*, *Fracción soluble*, *Fracción insoluble* y *Extracto total SDS*) se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron hacia membranas de nitrocelulosa o PVDF. La inmunodetección de la proteína LbNMNAT se realizó empleando el anticuerpo primario anti His-LbNMNAT (1:3000 en TBS-T) ON y el anticuerpo secundario anti ratón IgG conjugado a peroxidasa (1:5000 en TBS-T) durante 2 h. El protocolo de Western blot se realizó como se mencionó previamente pero los complejos inmunológicos se revelaron con el sistema ImmunoCruz Luminol Reagent Kit (Santa Cruz Biotechnology). Adicionalmente, se empleó el anticuerpo policlonal anti His-TcNMNAT (*T. cruzi* NMNAT, IgG, 1:1000 en TBS-T). En este caso, se utilizaron membranas PVDF, el anticuerpo secundario anti ratón IgG conjugado a biotina (1:4000), estreptavidina A conjugada a fosfatasa alcalina (1:3000) y el sistema de revelado con NBT y BCIP en buffer sustrato. Para el caso de los anticuerpos primarios anti His-LbNMNAT aviares (IgYs), se utilizó una dilución 1:1000 en TBS-T y el anticuerpo secundario anti gallina IgY conjugado a peroxidasa (1:2000).

Inmunodetección de la proteína LbNMNAT endógena mediante inmunofluorescencia:

Los parásitos provenientes de 1 ml de cultivo confluyente, se lavaron tres veces con 1 ml de PBS, centrifugando a 5000 rpm por 5 min a 4°C. El precipitado de parásitos se resuspendió en 0.5 ml de PBS y se aplicaron aproximadamente 2×10^5 promastigotes sobre láminas tratadas con poli-L-lisina. Las células se fijaron con paraformaldehído 4% (P/V) preparado en PBS durante 1 h a 4°C, se incubaron con glicina 100 mM durante 15 min y se permeabilizaron con acetona durante 10 min a 4°C. Los montajes se bloquearon empleando BSA 1% (P/V) en PBS durante 1 h. El anticuerpo anti His-LbNMNAT (1:1000 en solución de bloqueo) se aplicó sobre la lámina durante 1 h. Los anticuerpos secundarios anti ratón IgG acoplados a Cy2 o Alexa 488 (1:1000 en solución de bloqueo) (Invitrogen) se aplicaron sobre las láminas durante 1 h en oscuridad. La marcación del ADN se realizó con DAPI (1 μ g/ml en PBS) durante 5 min. Para los estudios de colocalización, los parásitos se incubaron durante 30 min en PBS suplementado con glucosa (5 mM) y la sonda mitocondrial Mitotracker Red CMXRos (100 nM) (Invitrogen) a 26°C. Los parásitos se lavaron con PBS, se aplicaron sobre las láminas y se continuó con el protocolo mencionado. Las láminas se cubrieron con medio de montaje (Fluoromont-G) (Invitrogen) y se visualizaron empleando el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1.

Construcción del plásmido pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP:

La amplificación del fragmento *lbnmnat* se realizó mediante PCR empleando el plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT como plantilla y los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 5-1 (Oligonucleótidos “pSP72”). El protocolo de amplificación, purificación y ligación del producto con el plásmido pGEMT-Easy se realizó como se mencionó previamente (Sección 5.2.3). El fragmento *lbnmnat* se liberó desde el plásmido pGEMT-Easy empleando la endonucleasa XbaI (Fermentas) ON a 37°C. El fragmento obtenido se ligó empleando la enzima ligasa T4, con en el vector de expresión para *L. braziliensis* pSP72R α neo α GFP [114] previamente digerido con la enzima de restricción XbaI y sometido a procesos de defosforilación con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternero durante 2 h a 37°C (Promega). El análisis de los clones se realizó mediante PCR de colonia y la identidad del plásmido recombinante se verificó por análisis de restricción,

PCR y secuenciamiento. El vector construido (pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP) permite la expresión de la proteína LbNMNAT fusionada a GFP en el extremo carboxilo terminal (Anexo B, mapa del vector pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP).

Transfección de promastigotes:

El plásmido recombinante pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP se utilizó para transfectar promastigotes de *L. braziliensis* mediante electroporación siguiendo un protocolo de alto voltaje (1600 V), previamente estandarizado [114]. Los parásitos provenientes de 10 ml de cultivo confluyente se lavaron 1 vez con 3 ml de Cytomix (120 mM KCl, 25 mM Hepes pH 7.6, 10 mM K₂HPO₄, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0.15 mM CaCl₂) frío, centrifugando a 1000 gravedades (rcf) durante 10 min a 4°C. El precipitado de parásitos se resuspendió en 1 ml de Cytomix, de los cuales se transfirieron 450 μ l a celdas de electroporación de 4 mm conteniendo 25 μ g del plásmido recombinante.

La celda se incubó sobre hielo durante 10 min y se aplicaron 3 pulsos de 1600 V, 25 μ F de capacitancia y resistencia infinita dejando intervalos de 20 s entre los pulsos. Las células electroporadas se incubaron 24 h a 26°C en un volumen final de 5 ml de medio Schneider suplementado con SFB 20% (V/V) fresco. Luego, se adicionaron 5 ml adicionales del medio mencionado suplementado con geneticina G418 (Gibco-BRL) 120 μ g/ml. Los cultivos se monitorearon diariamente al microscopio. 15 días después se observaron parásitos vivos, los cuales se continuaron cultivando en medio Schneider suplementado con SFB 10% (V/V) y 60 μ g/ml G418.

Detección de la proteína LbNMNAT-GFP en promastigotes:

La proteína LbNMNAT-GFP se detectó dentro del promastigote mediante dos estrategias: 1. Observando la fluorescencia de GFP sobre células fijadas con paraformaldehído. 2. Aplicando el protocolo de IF mencionado utilizando el anticuerpo primario anti GFP (1:250) y el anticuerpo secundario anti conejo IgG acoplado a Alexa 488 (1:1000) (Invitrogen). Las observaciones se realizaron en el microscopio Nikon Eclipse C1. Adicionalmente, se analizaron macrófagos infectados con parásitos transfectados con el plásmido recombinante pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP, para lo cual se establecieron ensayos de infección *in vitro*, como se describe a continuación.

Cultivo de macrófagos:

La línea celular de macrófagos murinos J744 se mantuvo en 5 ml de medio RPMI-1640 (GIBCO-BRL) suplementado con L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 2g/L y SFB 20% (V/V) (medio completo) en flasks T25 a 37°C y atmosfera de CO₂ 5%. Se realizó cambio de medio aproximadamente cada 36-48 h, cuando el color del medio viró de rosado a amarillo (indicador de acidificación).

Ensayo de infección *in vitro*:

Promastigotes en fase tardía de crecimiento logarítmico (72 horas después de haber sido inoculados) se colectaron mediante centrifugación a 4000 rpm por 10 min a 10°C. Los parásitos se resuspendieron en 2 ml de medio completo RPMI-1640. Paralelamente, se cambió el medio RPMI-1640 de los flasks donde se encontraban los macrófagos y se inocularon los parásitos, empleando una relación aproximada de 1:20 entre macrófagos y parásitos. Los cultivos se incubaron a 37°C y atmosfera de CO₂ 5% durante 4 horas para permitir la infección.

Con el propósito de retirar los promastigotes no infectivos, se retiró el medio por inversión, se adicionaron 5 ml de PBS pH 7.4 atemperado a 37°C, se incubó alrededor de 30 segundos y se retiró el PBS. En total, se realizaron tres lavados. Se agregaron 5 ml de medio completo RPMI-1640 y se incubaron los cultivos a 37°C y atmosfera de CO₂ 5% durante 72 horas [115]. El ensayo de infección se monitoreó continuamente mediante observaciones al microscopio. Los promastigotes empleados para los ensayos de infección se encontraban en pase 4.

Detección de la proteína LbNMNAT-GFP en amastigotes:

La proteína LbNMNAT-GFP en los amastigotes se observó directamente mediante la fluorescencia de GFP en los cultivos de macrófagos infectados empleando el microscopio Nikon Eclipse C1.

5.2.20. Estudio de la estructura cuaternaria de la proteína recombinante His-LbNMNAT

La organización oligomérica de la proteína His-LbNMNAT se estudió mediante dos técnicas experimentales: construcción de gráficos de Ferguson y cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Gráficos de Ferguson:

La siguiente metodología se basó en protocolos estandarizados [116–118]. La proteína His-LbNMNAT purificada se analizó en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas (PAGE) [100] cargando 2 µg de la misma. Adicionalmente, se cargaron a modo de control, 4 µg de proteínas cuya estructura cuaternaria ha sido descrita: lactoalbúmina, inhibidor de tripsina, anhidrasa carbónica, ovoalbúmina y BSA. Para la construcción de los gráficos, se corrieron 4 geles paralelos con diferentes concentraciones de acrilamida (6, 8, 10 y 12 %), a partir de los cuales se determinó la migración relativa de cada proteína (R_f). Estos datos se utilizaron para determinar los coeficientes de migración (K_r) de cada muestra y se procedió a graficar curvas de $-\text{Log } K_r$ vs Log MW (Gráfico de Ferguson). Empleando la ecuación de la recta de las curvas graficadas, se determinó el peso molecular de las bandas observadas para la proteína His-LbNMNAT en los PAGE realizados.

Cromatografía de exclusión molecular (SEC):

La proteína His-LbNMNAT purificada mediante IMAC se analizó por SEC, inyectando 500 µg de muestra en una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences), previamente equilibrada en el siguiente buffer de equilibrio: 50 mM $\text{Na}(\text{PO})_4$, 300 mM NaCl y 0.5 mM DTT. La cromatografía se realizó empleando el sistema Äkta Purifier (GE Healthcare Life Sciences), a 4°C con un flujo de 0.5 ml/min. Las fracciones recogidas se monitorearon mediante absorbancia a 280 nm, SDS-PAGE en geles discontinuos y ensayos de actividad acoplados.

Una vez confirmada la actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT eluida, se aprovechó la información del cromatograma generado para calcular el peso de la proteína e inferir su organización cuaternaria. Para esto, se construyeron curvas de calibración empleando proteínas de peso molecular conocido, las cuales se sometieron al

mismo protocolo de separación. Se analizaron las proteínas lisozima (14 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), BSA (66 kDa) y la proteína His-HsNMNAT1 (32 kDa) purificada en el presente trabajo.

Las cuatro proteínas patrón se mezclaron y se aplicaron en la columna de SEC. Adicionalmente, se inyectó azul de dextrán para determinar el volumen muerto de la columna. La información contenida en el cromatograma de la mezcla de las proteínas patrón se utilizó para establecer el coeficiente de partición (K_{av}) de cada una de las mismas en la columna, con lo cual se generó la curva de calibración de peso molecular correspondiente (K_{av} vs Log MW). Empleando la ecuación de la recta de las curvas graficadas, se determinó el peso molecular de la proteína His-LbNMNAT eluida.

5.2.21. Evaluación del efecto deletéreo de secuencias exclusivas de la proteína recombinante His-LbNMNAT sobre su actividad enzimática y patrones de oligomerización

Identificación de secuencias exclusivas en la proteína LbNMNAT:

Se realizó un alineamiento múltiple con las estructuras primarias de la proteína LbNMNAT y las isoenzimas humanas HsNMNAT1-3 (números de acceso en el NCBI: CAM37960.1, NP_073624.2, NP_055854.1 y NP_001307440.1, respectivamente) empleando el programa CLC Sequence Viewer 7 y los métodos de alineamiento MUSCLE, Clustal W y Clustal O. Se identificaron los motivos de unión a ATP en las secuencias analizadas y se buscaron inserciones específicas en la proteína del parásito. Luego, se produjeron las proteínas recombinantes deletéreas en las inserciones encontradas. Específicamente, se generaron las proteínas recombinantes His-LbNMNAT Δ 1-43 e His-LbNMNAT Δ 241-249.

Generación y estudio de la proteína recombinante His-LbNMNAT Δ 1-43:

El plásmido pET100-LbNMNAT [9] se empleó como plantilla para amplificar el fragmento codificante para la proteína LbNMNAT Δ 1-43. La amplificación se realizó por PCR empleando oligonucleótidos que permiten eliminar los primeros 129 nucleótidos del fragmento *lbnmnat* original (Oligonucleótidos “Delección N-terminal”, Tabla 5-1). El

producto amplificado se clonó de manera direccionada en el plásmido de expresión pET100/D-TOPO (Invitrogen). El plásmido recombinante resultante, denominado pET100-LbNMNAT Δ 1-43 (Anexo C, mapa del vector pET100-LbNMNAT Δ 1-43), se analizó por secuenciamiento y se empleó para sobre-expresar la proteína recombinante de interés en el sistema de co-expresión con chaperonas. La purificación de la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 se realizó como se mencionó anteriormente pero lavando la resina Ni-NTA con 5 mM ATP [119].

La actividad enzimática de la proteína purificada se evaluó mediante ensayos enzimáticos acoplados y directos y su organización oligomérica se estudió construyendo gráficos de Ferguson.

Generación y estudio de la proteína recombinante His-LbNMNAT Δ 241-249:

El plásmido pQE30-LbNMNAT construido en este estudio se utilizó como plantilla para amplificar el fragmento codificante para la proteína LbNMNAT Δ 241-249. La amplificación se realizó mediante PCR empleando oligonucleótidos que permiten eliminar los nucleótidos 721-747 del fragmento *lbnmnat* original (Oligonucleótidos “Delección C-terminal”, Tabla 5-1). Para esto, se empleó el kit de mutagénesis *Phusion Site Direct Mutagenesis* (Finnzymes) que permite generar mutaciones puntuales, inserciones y deleciones sobre el plásmido inicial.

El plásmido recombinante resultante, denominado pQE30-LbNMNAT Δ 241-249 (Anexo D, mapa vector pQE30-LbNMNAT Δ 241-249), se analizó por secuenciamiento y se empleó para sobre-expresar la proteína recombinante de interés en los sistemas *E. coli* BL21 (DE3), Codon Plus y co-expresión con chaperonas. El estudio de la actividad enzimática y los patrones de oligomerización de la proteína His-LbNMNAT Δ 241-249 no se realizaron debido a que la proteína se acumuló en la fracción insoluble de los sistemas de expresión empleados.

5.2.22. Estudio de los niveles de expresión de la NMNAT a través del ciclo de vida del parásito

Recolección de cultivos de promastigotes:

Los promastigotes en fase media de crecimiento logarítmico (48 h después de su dilución) se recolectaron mediante centrifugación a 4000 rpm por 10 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con 10 ml de PBS pH 7.4, frío centrifugando a 4000 rpm por 5 min a 4°C. Las células se dividieron en dos alícuotas, las cuales se destinaron para extracción de ARN y preparación de extractos proteicos, respectivamente.

Extracción de ARN de promastigotes:

El precipitado celular proveniente de una de las alícuotas se resuspendió en 300 µl de TRIzol (Invitrogen) mediante pipeteo (30 veces), seguido de vortex. Se adicionaron 60 µl de cloroformo a la muestra y se agitó manualmente durante 15 s. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 3 min y se centrifugaron a 12000 rcf por 10 min a 4°C. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo de 1.5 ml nuevo. Luego, se adicionaron 150 µl de isopropanol (100%) a la muestra, se mezcló 5 veces por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 rcf por 10 min a 4°C. Al precipitado resultante de ARN se le adicionó 1 ml de etanol 75% (V/V), se agitó con vortex y se centrifugó a 7500 rcf por 5 min a 4°C. El precipitado final se resuspendió en 32 µl de agua DEPC mediante pipeteo. Las muestras se almacenaron a -70°C.

Extracción de ARN de macrófagos infectados:

Los macrófagos infectados con promastigotes (72 h post-infección) se lavaron una vez con 10 ml de PBS pH 7.4 frío. Las células se lisaron por pipeteo al adicionar 700 µl de Trizol al flask y se continuó con el protocolo de extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc).

Cuantificación del ARN:

La cantidad y calidad del ARN se verificaron por medidas de espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

Tratamiento con DNasa I:

Se emplearon 2 μg de ARN puro (A_{260}/A_{280} mayor a 2.0), desde el cual se eliminaron trazas de ADN genómico, realizando tratamiento con 2 U de DNasa I (RQ1, Promega) a temperatura ambiente durante 20 min.

Síntesis de ADNc:

Se empleó el sistema de transcripción reversa ImProm-II (A3800, Promega) y oligo DT (0,5 μg /reacción). Las estructuras secundarias del ARN se desnaturalizaron incubando las muestras a 70°C durante 5 min previo a la síntesis de ADNc. Se emplearon las siguientes condiciones: anillaje (ARN y Oligo DT) a 25°C durante 5 min. Retro-transcripción a 42°C durante 60 min. Desnaturalización de la retro-transcriptasa a 70°C durante 15 min. Las muestras se almacenaron a -20°C.

Análisis de expresión genética mediante PCR convencional:

Los experimentos de PCR convencional se realizaron empleando oligonucleótidos para amplificar los genes *gamma glutamil cisteina sintetasa*, *proteína antígeno de superficie* y *lbnmnat* (Oligonucleótidos “*glutamil cisteina sintetasa*”, “*antígeno de superficie*” y “*lbnmnat*”, respectivamente, Tabla 5-1). La especificidad del ensayo de amplificación se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con SYBR Green.

Inicialmente, los ADNc se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C y se amplificaron a través de 30 ciclos que consistían de 30 s de desnaturalización a 95°C, 45 s de anillaje a 56°C y 1 min de extensión a 72°C. Luego, se realizó una extensión final de 10 min a 72°C. Los niveles de expresión genética se determinaron mediante análisis de densitometría empleando el Programa Image J. Los experimentos se realizaron por triplicado biológico.

Análisis de expresión genética mediante PCR cuantitativo en Tiempo Real (RT-qPCR):

Los experimentos de PCR en Tiempo Real se realizaron en el equipo 7500 de Applied Biosystems, empleando el kit SYBR Green PCR Master Mix (LifeTechnologies). Se emplearon oligonucleótidos para amplificar el gen ribosomal *40s* de *L. braziliensis* y el gen *lbnmnat* (Oligonucleótidos “40S” y “*lbnmnat-RT-qPCR*”, Tabla 5-1). Las condiciones de amplificación fueron optimizadas para ambos juegos de oligonucleótidos y la especificidad del ensayo se verificó mediante análisis de las correspondientes curvas de melting. Los ADNc se amplificaron a través de 40 ciclos que consistían de 10 s de desnaturalización a 95°C, 15 s de anillaje a 56°C y 10 s de extensión a 72°C. Los niveles de expresión genética se determinaron mediante el método Pfaffl. La linealidad del ensayo se verificó mediante la construcción de una curva de calibración para cada gen, utilizando como plantilla diluciones seriadas del pool de los ADNc de todas las muestras. La eficiencia de amplificación para cada gen se calculó a partir de la pendiente de dicha curva. Los resultados se presentan como la razón entre los niveles de expresión del gen de interés *lbnmnat* y el gen de referencia *40s*. Los experimentos se realizaron por triplicado biológico, de los cuales a su vez se realizaron duplicados técnicos.

Análisis de expresión genética a nivel de proteína mediante Western blot:

Se recolectaron promastigotes y amastigotes axénicos de *L. braziliensis*, los cuales se lisaron en buffer de carga 1X para SDS-PAGE (1×10^5 células/ μ l) (*Extracto total SDS*), como se mencionó previamente. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en geles discontinuos y Western blot empleando el anticuerpo anti His-LbNMNAT.

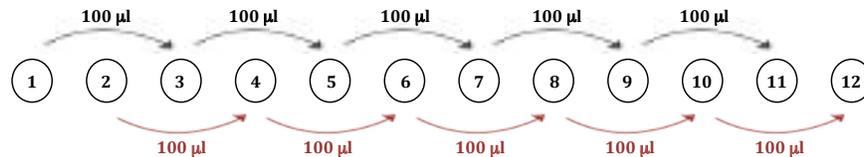
5.3. OTROS PROTOCOLOS

5.3.1. Ensayo de estrés oxidativo

Determinación IC₅₀ de H₂O₂:

Se preparó una solución de H₂O₂ 50 mM en medio Schneider completo. En el pozo 1 de la placa, se adicionaron 24 μ l de la solución de H₂O₂ 50 mM y 176 μ l de medio Schneider completo para completar un volumen final de 200 μ l y una concentración de H₂O₂ 6 mM.

En el pozo 2 de la placa, se adicionaron 16 μl de la solución de H_2O_2 50 mM y 184 μl de medio Schneider completo para completar un volumen final de 200 μl y una concentración de H_2O_2 4 mM. Se adicionaron 100 μl de medio Schneider completo desde el pozo 3 hasta el pozo 12 y se realizó la dilución seriada de la solución del pozo 1 y 2 de la siguiente manera:



Se eliminaron 100 μl de solución del pozo 11 y 12 para asegurar el mismo volumen en todos los pozos. Se preparó una solución de células en fase media de crecimiento logarítmico a una concentración de 1×10^7 parásitos/ml en medio Schneider completo. Se sembró un volumen de 100 μl de la solución celular en los pozos 1-12 con el fin de tener 1×10^6 parásitos/pozo. La placa se incubó durante 2 h a 25°C. Los parásitos se contaron en cámara de Neubauer, realizando una dilución 1:10 en PBS y se construyeron gráficos de IC_{50} (porcentaje de lisis celular vs concentración de H_2O_2). La presencia de flagelo móvil fue el criterio de viabilidad que se tuvo en cuenta.

Tratamiento celular con H_2O_2 :

Una vez determinada la concentración IC_{50} por el H_2O_2 , se procedió al cultivo de promastigotes en fase media de crecimiento logarítmico en medio Schneider completo y en presencia de la concentración IC_{50} determinada. La incubación se realizó durante 2 h a 25°C. Luego, los parásitos se recolectaron mediante centrifugación y se procedió con la extracción de ARN y la síntesis de ADNc. Extractos proteicos de parásitos tratados y sin tratar se analizaron mediante Western blot con el anticuerpo anti His-LbNMNAT.

5.3.2. Modelamiento predictivo

Las secuencias primarias de las proteínas a modelar se enviaron al servidor SwissModel o I-TASSER [120, 121]. Los modelos se minimizaron energéticamente con el servidor 3D Refine (<http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/>) [122]. El procesamiento y generación de

imágenes se realizó con el programa UCSF Chimera [73]. Los modelos se validaron construyendo gráficos de Ramachandran [123].

5.3.3. Inmunoprecipitación (IP) de la proteína LbNMNAT

Se prepararon extractos solubles de promastigotes transfectados con el plásmido recombinante pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP y se realizó la desnaturalización del mismo del siguiente modo: el extracto se suplementó con SDS 0.2% (P/V) y se incubó en agua a ebullición por 10 min. Se adicionó Tritón X-100 0.5% (V/V) y se adicionó un volumen de buffer IP (Tris/HCL 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol 5% (V/V)). El extracto se aclaró por 1h a 4°C con agitación constante, empleando 50 μ l de proteína A acoplada a sefarosa (SIGMA), previamente equilibrada en buffer IP.

El extracto aclarado se incubó ON con 20 μ l del anticuerpo anti His-LbNMNAT purificado a 4°C con agitación constante. Se adicionaron 80 μ l de proteína A acoplada a sefarosa, previamente equilibrada en buffer IP y se incubó por 2h a 4°C con agitación constante. El inmunoprecipitado se obtuvo al centrifugar las muestras a 3000 rpm por 3 min a 4°C. El precipitado obtenido se lavó 3 veces con 500 μ l de buffer IP, 10 min cada uno. El precipitado final se resuspendió en 80 μ l de buffer de carga para SDS-PAGE 1X y se incubó en agua a ebullición por 6 min. Las muestras obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE y tinciones con azul Coomassie coloidal (G-250) ((NH₄)₂SO₄ 10% (P/V), Coomassie G-250 0,1% (P/V), ácido ortofosfórico 3% (V/V), etanol 20% (V/V)) ON. Paralelamente, se realizó Western blot con los anticuerpos anti His-LbNMNAT.

5.3.4. Análisis de proteínas mediante espectrometría de masas (MS)

La banda inmunoprecipitada de ~22 kDa se extrajo desde el gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie coloidal (G-250) y se envió a análisis mediante MALDI-MS/MS a la compañía Alphalyse, USA (<http://www.alphalyse.com>).

6. Resultados

A continuación, se presentarán las evidencias experimentales y bioinformáticas relacionadas con los objetivos específicos propuestos en este trabajo. La secuencia en la que se expondrán los resultados corresponde al orden en que se propusieron los objetivos. La discusión de los resultados se desarrollará en un capítulo aparte.

6.1. La proteína recombinante His-LbNMNAT se obtuvo en fracciones solubles

En un trabajo previo, se construyó el plásmido pET100-LbNMNAT, que permite expresar la proteína His-LbNMNAT (37.8 kDa) en la fracción insoluble del sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3) (Figura 6-1). Con el propósito de aumentar la solubilidad de la proteína His-LbNMNAT, en dicho trabajo se modificaron las condiciones del ensayo de expresión. Específicamente, se expresó la proteína de interés a bajas temperaturas (20-24°C), se incrementó la fuerza iónica del buffer de lisis (1.0 M NaCl) y se activaron las chaperonas endógenas de *E. coli* adicionando solventes orgánicos (etanol) en el medio de inducción. Ninguna de las condiciones ensayadas favorecieron la solubilidad de la proteína bajo estudio [9].

Por esta razón, en el presente trabajo se aplicaron tres estrategias experimentales con el propósito de solubilizar la proteína His-LbNMNAT: 1. Expresión en diferentes sistemas bacterianos. 2. Co-expresión con chaperonas moleculares. 3. Expresión desde el plásmido pQE30. Solubilizar la proteína His-LbNMNAT es un requisito previo a su caracterización enzimática, uno de los objetivos experimentales de este estudio.

En relación con los sistemas de expresión, se evaluaron tres cepas de *E. coli*: 1-BL21 Codon Plus (DE3) RIL. 2-BL21 (DE3) pLysS. 3-Rosetta (DE3) pLysS. La proteína His-LbNMNAT se logró expresar únicamente en la cepa BL21 Codon Plus (DE3) RIL. Al comparar la fracción soluble de dicha cepa con aquella de la cepa original (BL21 (DE3)), no se observó aumento de la solubilidad de la proteína recombinante de interés (Anexo E).

Los resultados obtenidos con el sistema de co-expresión con chaperonas moleculares, indicaron que la proteína His-LbNMNAT se acumula tanto en la fracción insoluble como soluble del sistema empleado (Figura 6-2 A). Resultados similares se observaron al expresar la proteína recombinante desde el plásmido pQE30-LbNMNAT, cuando se induce la expresión a 24°C en el sistema *E. coli* BL21 (DE3) (Figura 6-2 B). El peso molecular teórico de la proteína His-LbNMNAT expresada desde el plásmido pQE30-LbNMNAT es de 36 kDa. La construcción de dicho plásmido se indica en la Figura 6-3.

Figura 6-1: La proteína recombinante His-LbNMNAT expresada desde el plásmido pET100 se acumula en la fracción insoluble del sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3). Las fracciones insolubles (Ins) y solubles (Sol) provenientes de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido recombinante pET100-LbNMNAT no inducidas (1 y 3) e inducidas con IPTG (2 y 4) se analizaron mediante SDS-PAGE 12%. La flecha roja indica la acumulación de la proteína His-LbNMNAT en la fracción insoluble. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa. Tomado de [9].

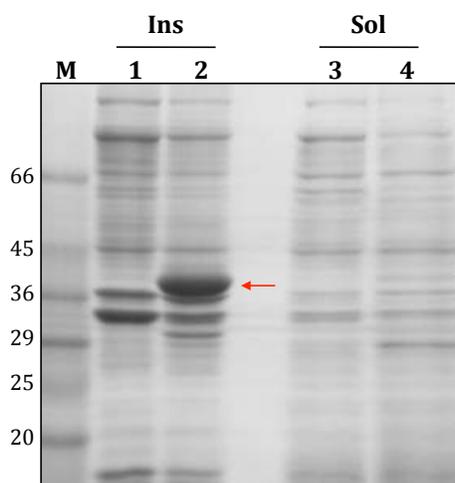
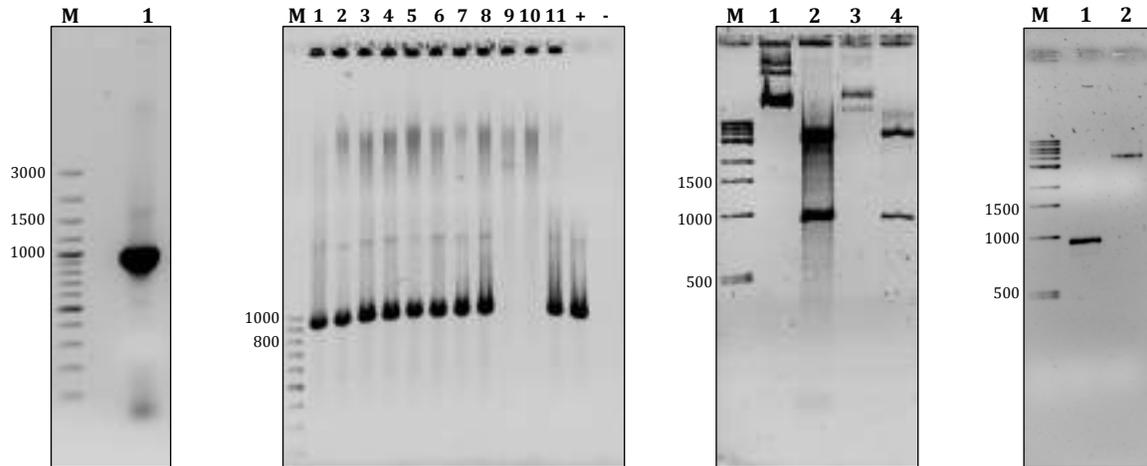


Figura 6-3: Construcción del plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT y expresión de la proteína His-LbNMNAT. **A.** Amplificación del fragmento *lbnmnat* (936 pb) (1) mediante PCR empleando el plásmido pET100-LbNMNAT como plantilla. El producto amplificado se purificó desde el gel y se ligó con el vector de clonación pGEMT-Easy. La reacción de ligación se empleó para transformar células *E. coli* TOP 10. Gel de agarosa 1% (P/V) tratado con bromuro de etidio (Figuras A-E y G). M, marcador de peso molecular en pares de bases (pb) (Figuras A-G). **B.** Análisis mediante PCR de colonia (11 colonias TOP 10) (1-11). +: control positivo (vector pET100-LbNMNAT como plantilla), -: control negativo (agua como plantilla). **C.** Los plásmidos recombinantes pGEMT-Easy-LbNMNAT de 2 de las colonias obtenidas se sometieron a ensayos de doble digestión con las enzimas de restricción KpnI y BamHI. Plásmidos sin digerir (1 y 3) y digeridos (2 y 4). El fragmento *lbnmnat* liberado se purificó desde el gel. **D.** Fragmento *lbnmnat* purificado (1) y plásmido pQE30 previamente digerido con las enzimas de restricción KpnI y BamHI (2). Estas muestras se ligaron y la reacción de ligación se empleó para transformar células *E. coli* JM109. **E.** Análisis mediante PCR de colonia (4 colonias JM109) (1-4). +: control positivo (vector pGEMT-Easy-LbNMNAT como plantilla), -: control negativo (agua como plantilla). **F.** Doble digestión teórica del plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT con las enzimas de restricción KpnI y BamHI (1). Simulación generada con el programa NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) [124]. **G.** Los plásmidos recombinantes pQE30-LbNMNAT de 2 de las colonias JM109 obtenidas se sometieron a ensayos de doble digestión con las enzimas de restricción KpnI y BamHI. Plásmidos sin digerir (1 y 3) y digeridos (2 y 4). Los plásmidos se analizaron mediante secuenciamiento y su mapa se indica en el Anexo A. **H.** Las fracciones totales de células de expresión *E. coli* M15 transformadas con el plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT no inducidas (1) e inducidas (2) se analizaron mediante SDS-PAGE 10%. La flecha azul indica la sobreexpresión de la proteína His-LbNMNAT. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa.

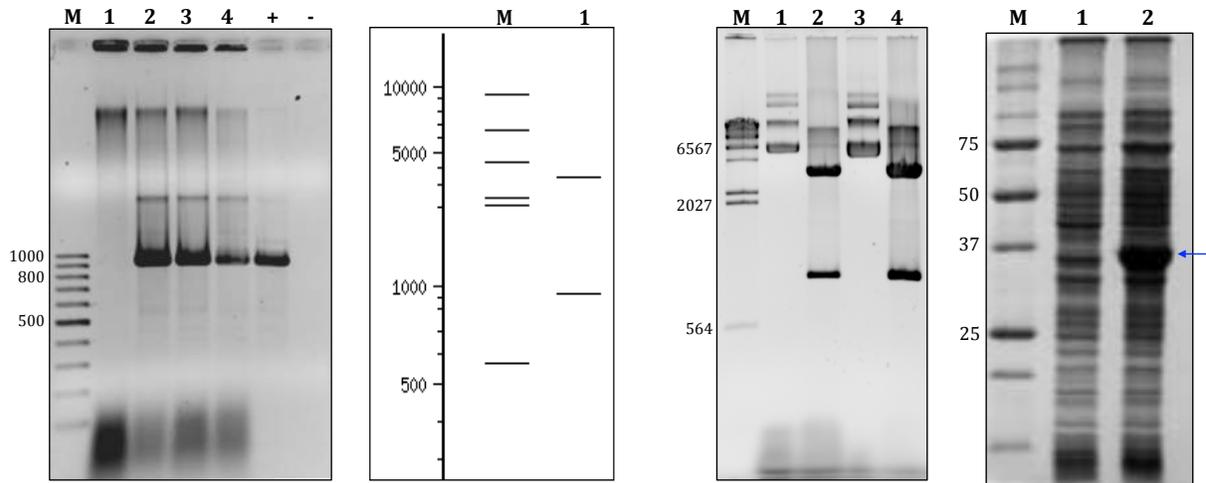


A

B

C

D



E

F

G

H

6.2. Purificación de la proteína recombinante His-LbNMNAT

La proteína His-LbNMNAT se purificó mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) empleando la resina de níquel y ácido nitrilotriacético (Ni-NTA). Dicha resina se caracteriza por enlazar, mediante complejos de coordinación de níquel, la etiqueta de histidinas (6xHis) fusionada a las proteínas recombinantes de interés [125,

126]. El protocolo de purificación se realizó en solución utilizando como muestras de partida, las fracciones solubles provenientes de las estrategias de solubilización 2 y 3 mencionadas con anterioridad. La proteína His-LbNMNAT se purificó de manera parcial desde las dos muestras empleadas. La purificación realizada a partir de la fracción soluble del sistema de co-expresión, generó eluidos contaminados con la chaperona GroEL (60 kDa) que se une a la resina Ni-NTA, tal como se ha observado en otros estudios [127]. Por el contrario, al efectuar la purificación desde la fracción soluble proveniente de la estrategia 3, se obtuvieron eluidos más puros (Figura 6-4).

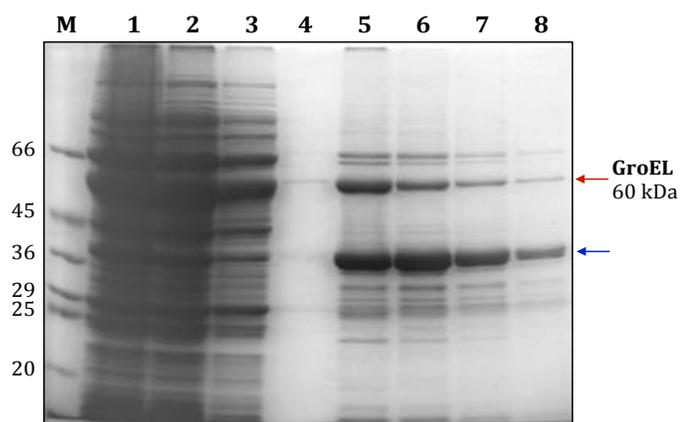
Con el propósito de optimizar la purificación de la proteína His-LbNMNAT desde la fracción soluble de la estrategia 3, se modificaron las condiciones del protocolo cromatográfico. Dichas modificaciones incluyeron la ejecución de la purificación en columna y el lavado de la misma con 75 mM de imidazol, previo a los pasos de elución. Las nuevas condiciones experimentales permitieron obtener una mayor cantidad de la proteína recombinante parcialmente pura. La banda contaminante entre 25 y 37 kDa observada en el eluido obtenido, corresponde a un producto de degradación de la proteína His-LbNMNAT, según los análisis de Western blot empleando el anticuerpo anti-6xHis (Figura 6-5).

El eluido proveniente de la cromatografía de afinidad optimizada, se empleó para efectuar el estudio de la organización cuaternaria de la proteína His-LbNMNAT y para realizar su caracterización enzimática, como se describirá más adelante. Dada la necesidad de emplear controles positivos apropiados en los experimentos recién mencionados, en el presente trabajo se realizó la purificación, mediante IMAC, de las proteínas His-HsNMNAT1 y 3 (33 y 29 kDa, respectivamente). Estas proteínas se expresaron en el sistema *E. coli* BL21 (DE3) a partir de vectores de expresión pQE30 construidos en trabajos previos [108] (Figura 6-6).

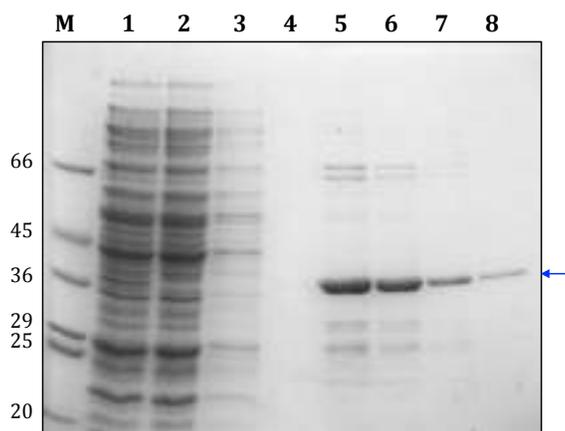
La actividad enzimática de las proteínas purificadas (His-LbNMNAT e His-HsNMNAT1 y 3) se confirmó mediante ensayos enzimáticos acoplados y directos (Figura 6-7 y 6-8). Adicionalmente, la Tabla 6-1 indica los factores de purificación alcanzados para las proteínas estudiadas en el presente trabajo. En conjunto, los protocolos de purificación implementados hasta este punto del trabajo, permitieron purificar de manera parcial la proteína His-LbNMNAT y a homogeneidad las proteínas control His-HsNMNAT1 y 3.

Todas las proteínas purificadas presentaron actividad enzimática de acuerdo con los ensayos enzimáticos ejecutados.

Figura 6-4: Purificación parcial de la proteína recombinante His-LbNMNAT mediante IMAC. **A.** La proteína His-LbNMNAT se co-expresó desde el vector pET100 junto con chaperonas moleculares y se purificó a partir de la fracción soluble resultante. La flecha roja indica la chaperona GroEL. La flecha azul indica la proteína His-LbNMNAT. **B.** Purificación de la proteína His-LbNMNAT a partir de la fracción soluble del sistema de expresión con el plásmido pQE30. La flecha azul indica la proteína His-LbNMNAT. Fracciones solubles de partida (1), proteínas no enlazadas (2), lavados 1 (3) y 10 (4), eluidos 1-4 (5-8). SDS-PAGE 10%. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa.



A



B

Figura 6-5: Optimización de la purificación de la proteína recombinante His-LbNMNAT mediante IMAC. **A.** Purificación de la proteína His-LbNMNAT a partir de la fracción soluble del sistema de expresión con el plásmido pQE30. Fracción soluble de partida (1), proteínas no enlazadas (2), lavado con 75 mM imidazol (3), eluido con 250 mM imidazol (4). SDS-PAGE 10%. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. **B.** Adicionalmente, la fracción soluble de partida (1) y el eluido con 250 mM imidazol (2) se analizaron mediante Western blot utilizando el anticuerpo primario anti-6xHis. Sistema de revelado con fosfatasa alcalina. M, marcador de peso molecular en kDa. Las flechas azules indican la proteína His-LbNMNAT. La flechas rojas indican un producto de degradación de la proteína His-LbNMNAT.

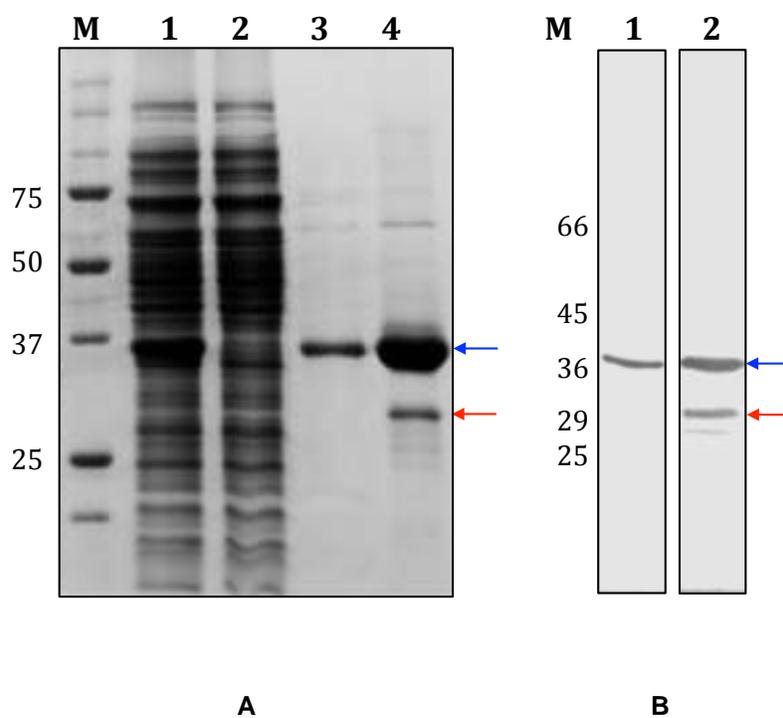
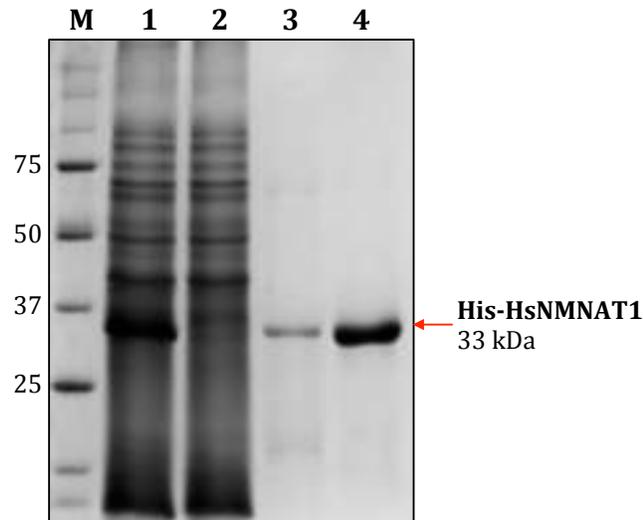
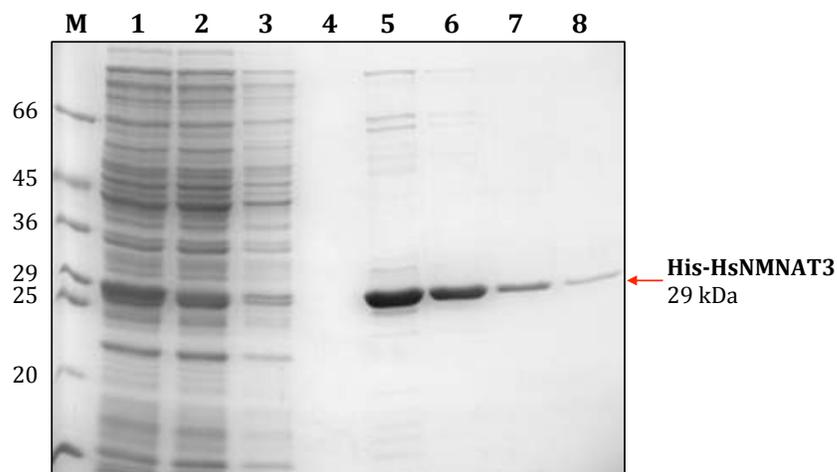


Figura 6-6: Purificación de las proteínas recombinantes control His-HsNMNAT1 y 3 mediante IMAC. **A.** Purificación de la proteína His-HsNMNAT1. Fracción soluble de partida (1), proteínas no enlazadas (2), lavado con 75 mM imidazol (3), eluido con 250 mM imidazol (4). **B.** Purificación de la proteína His-HsNMNAT3. Fracción soluble de partida (1), proteínas no enlazadas (2), lavados 1 (3) y 10 (4), eluidos con 250 mM imidazol 1-4 (5-8). SDS-PAGE 12%. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa.



A



B

Tabla 6-1: Rendimiento de la purificación de algunas de las proteínas empleadas en el presente estudio

Proteína	Fracción	Concentración (mg/ml)	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación (x-veces)
His-LbNMNAT	Lisado	8,9	28	249,2	33,0	0,13	100	-
	Eluido	6,4	1,2	7,68	1,8	0,26	5,43	1,96
His-HsNMNAT-1	Lisado	10,9	23,8	259,42	149,2	0,58	100	-
	Eluido	13,18	1,6	21,08	62,1	2,95	41,61	5,12
His-LbNMNAT Δ 1-43	Lisado	3	13,5	40,5	-	-	100	-
	Eluido	0,3	2	0,6	-	-	*NC	90-100

* NC: No calculado

Figura 6-7: La proteína recombinante His-LbNMNAT purificada de manera parcial es catalíticamente activa. La actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT se verificó mediante ensayos enzimáticos acoplados, registrando la absorbancia a 340 nm. Como

control positivo de actividad enzimática se utilizó la proteína His-HsNMNAT1. Para la ejecución del ensayo se emplearon 50 μg de cada enzima.

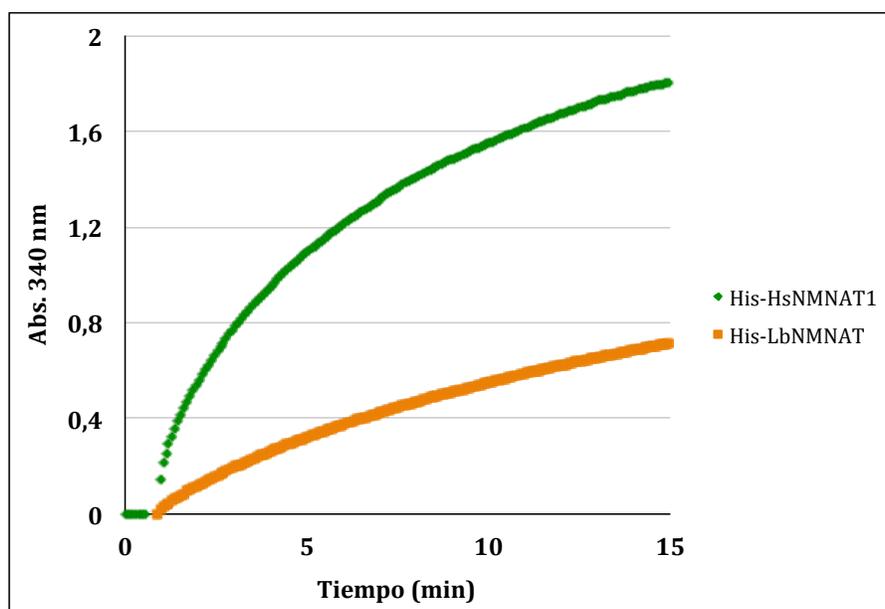
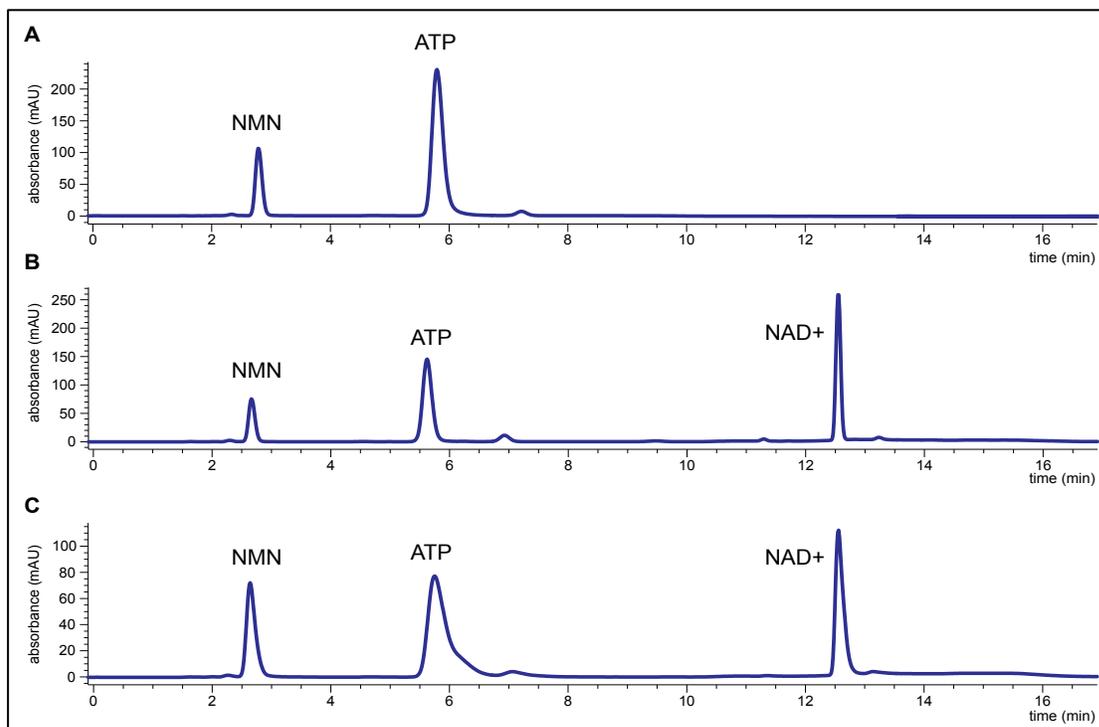


Figura 6-8: Confirmación de la actividad enzimática de la proteína recombinante His-LbNMNAT parcialmente purificada. La síntesis de NAD^+ se verificó mediante RP-HPLC empleando las siguientes muestras: **A.** Buffer de reacción. **B.** Proteína His-HsNMNAT3 (control positivo de actividad enzimática). **C.** Proteína His-LbNMNAT. Para la ejecución del ensayo se utilizaron 2,5 μg de cada enzima. Se indican los picos correspondientes para los sustratos NMN y ATP, así como para el producto NAD^+ .



6.3 Análisis de la estructura cuaternaria de la proteína recombinante His-LbNMNAT

Con el objetivo de estudiar experimentalmente la estructura cuaternaria de la proteína His-LbNMNAT, se aplicaron dos estrategias metodológicas: cromatografía de exclusión molecular (SEC) y construcción de gráficos de Ferguson.

6.3.1. La proteína recombinante His-LbNMNAT es monomérica según SEC

El eluido enriquecido con la proteína His-LbNMNAT proveniente del protocolo IMAC (Figura 6-5) se sometió a SEC. El cromatograma correspondiente indicó un pico principal con un volumen de elución de 16,01 ml. El análisis de las fracciones de dicho pico (fracciones 49-51) mediante SDS-PAGE y ensayos de actividad enzimática, confirmaron la identidad de la proteína His-LbNMNAT (Figura 6-9). Es importante señalar que el acople de las técnicas IMAC y SEC permitió purificar homogéneamente la proteína His-LbNMNAT (Figura 6-9 A, carril 3). Este acople cromatográfico se plantea como punto de

partida para estudios futuros que requieran una alta pureza de la muestra, tales como cristalografía de rayos X.

Para calcular el peso molecular de la proteína His-LbNMNAT e inferir su organización cuaternaria, se construyó una curva de calibración empleando proteínas patrón de peso molecular conocido, las cuales se sometieron a SEC. Se emplearon las proteínas lisozima (14 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), BSA (66 kDa) y la proteína recombinante His-HsNMNAT1 (33 kDa) purificada en el presente estudio (Figura 6-6). Esta última proteína eluyó de la columna de exclusión en un volumen de elución de 12,31 ml, correspondiente a la fracción 9, cuya funcionalidad catalítica se confirmó mediante ensayos enzimáticos acoplados (Figura 6-10).

La proteína HsNMNAT1, tanto endógena como recombinante, exhibe una organización homo-tetramérica según ensayos SEC [128, 129]. Adicionalmente, estudios de cristalografía de rayos X han indicado un ensamblaje homo-hexamérico para la misma [72]. Por esta razón, en la construcción de la curva de calibración se asumieron las dos posibles estructuras cuaternarias para esta proteína patrón (4-mer: 132 kDa, 6-mer: 198 kDa). Las cuatro proteínas patrón se mezclaron y se aplicaron en la columna de exclusión. A partir del cromatograma obtenido para dicha mezcla (Figura 6-11 A), se determinaron los coeficientes de partición (K_{av}) de cada una de las proteínas en la columna (Tabla 6-2), datos con los cuales se generó la curva de calibración de peso molecular correspondiente (K_{av} vs Log MW) (Figura 6-11 B y C). La inyección individual de las cuatro proteínas patrón en la columna, generó resultados idénticos a los obtenidos con la mezcla de patrones (Anexo F).

Al interpolar en las curvas de calibración el volumen de elución obtenido para la proteína His-LbNMNAT (16,01 ml), se obtuvieron valores de 46 y 42 kDa, cercanos al peso molecular de la proteína recombinante monomérica (36 kDa). Estos resultados indican que, bajo las condiciones experimentales empleadas en este estudio, la proteína His-LbNMNAT no presenta estructura cuaternaria. Se recomienda realizar ensayos de SEC en presencia de los sustratos NMN y ATP con el propósito de evaluar el efecto de los mismos sobre la estructura cuaternaria de la proteína His-LbNMNAT. Mediante cristalografía de rayos X se ha observado que la NMNAT de *Pseudomonas aeruginosa* establece dímeros y tetrámeros en presencia de ATP y NAMN, respectivamente [75]. Por

su parte, la NMNAT de *B. subtilis* es tetramérica en su forma de apo-enzima pero cuando esta unida a NAAD es dimérica [130].

Figura 6-9: Análisis de la proteína recombinante His-LbNMNAT mediante SEC. **A.** La proteína His-LbNMNAT eluyó de la columna de exclusión en un pico principal con un volumen de elución de 16,01 ml. **B.** La fracción soluble de partida (1), el eluido proveniente de la purificación IMAC que se inyectó en la columna SEC (2) y la fracción 50 de la purificación SEC (3) se analizaron mediante SDS-PAGE 12%. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa. **C.** La actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT contenida en el pico principal del cromatograma de la Figura A (fracciones 49-50), se verificó mediante ensayos enzimáticos acoplados.

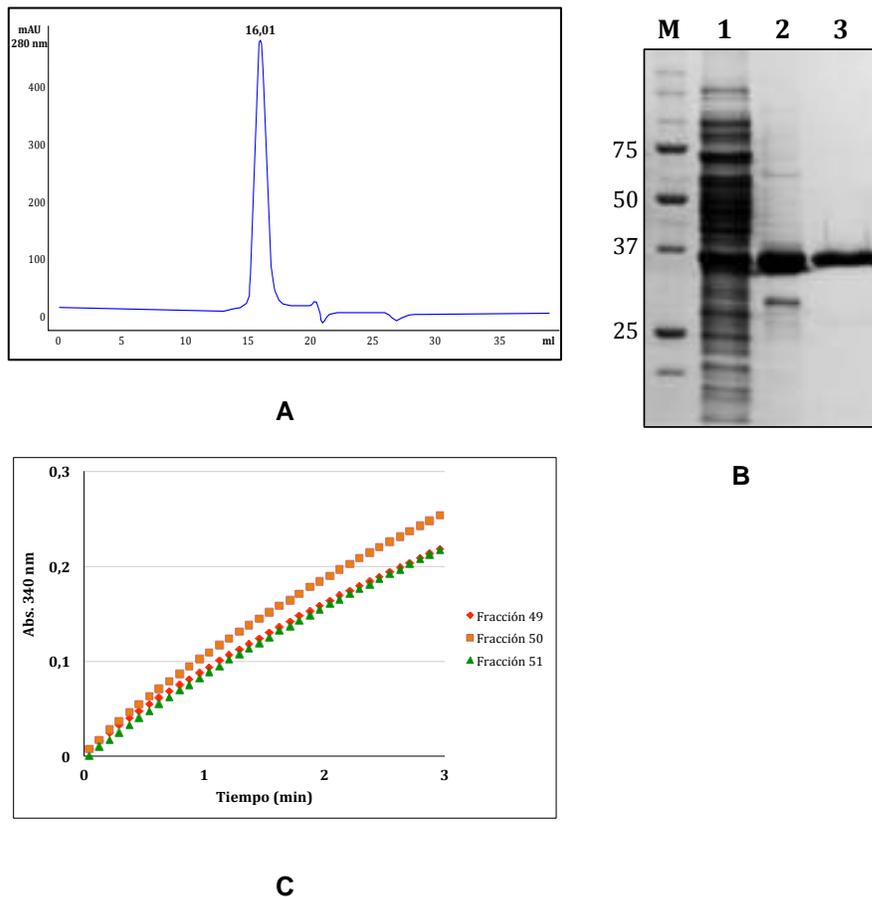


Figura 6-10: Análisis de la proteína recombinante His-HsNMNAT1 mediante SEC. **A.** La proteína His-HsNMNAT1 eluyó de la columna de exclusión en un pico principal con un volumen de elución de 12,31 ml. **B.** La fracción soluble de partida (1), el eluido proveniente de la purificación IMAC que se inyectó en la columna SEC (2) y la fracción 50 de la purificación SEC (3) se analizaron mediante SDS-PAGE 12%. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa. **C.** La actividad enzimática de la proteína His-HsNMNAT1 contenida en el pico principal del cromatograma de la Figura A (fracciones 49-50), se verificó mediante ensayos enzimáticos acoplados.

proveniente de la purificación IMAC que se inyectó en la columna SEC (2) y la fracción 9 de la purificación SEC (3) se analizaron mediante SDS-PAGE 12%. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa. **C.** La actividad enzimática de la proteína His-HsNMNAT1 contenida en el pico principal del cromatograma de la Figura A (fracción 9), se verificó mediante ensayos enzimáticos acoplados.

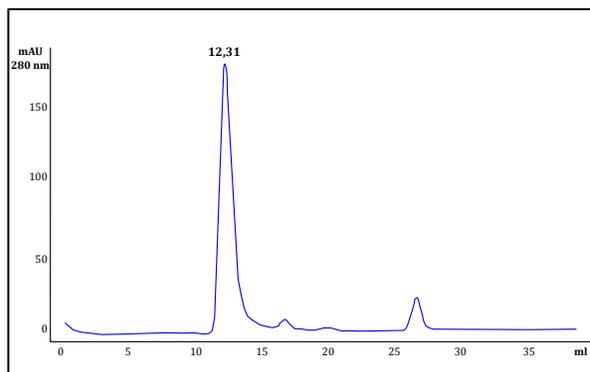
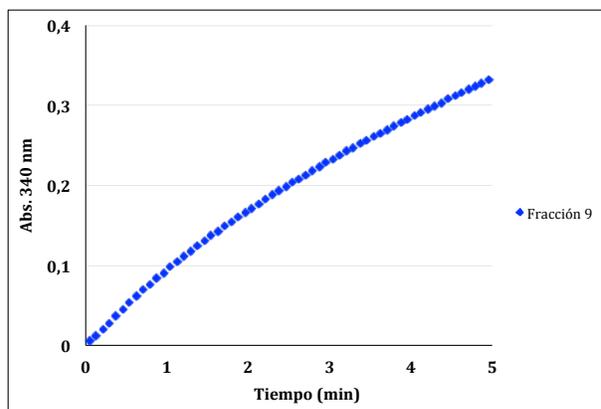
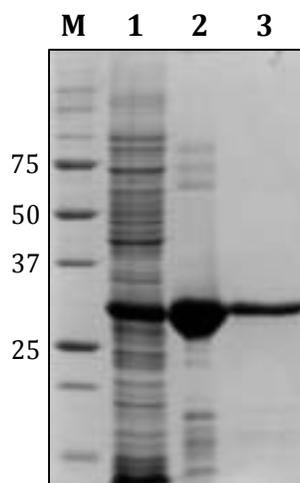
**A****C****B**

Figura 6-11: Análisis de proteínas patrón mediante SEC. **A.** Cromatograma obtenido para la separación por cromatografía de exclusión molecular de la mezcla de patrones. **B.** y **C.** Curvas de calibración de peso molecular (K_{av} vs Log MW) asumiendo ensamblajes 4-mer y 6-mer para la proteína patrón His-HsNMNAT1, respectivamente.

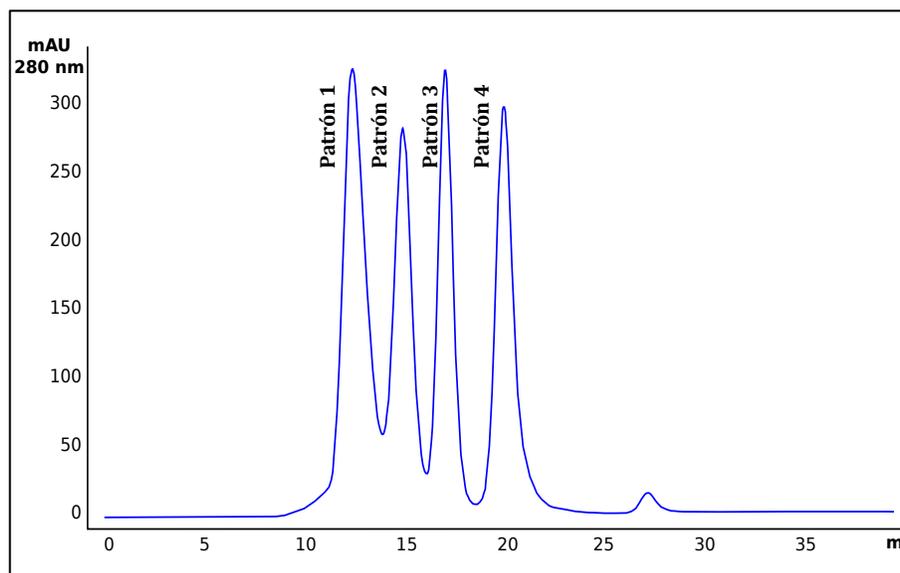
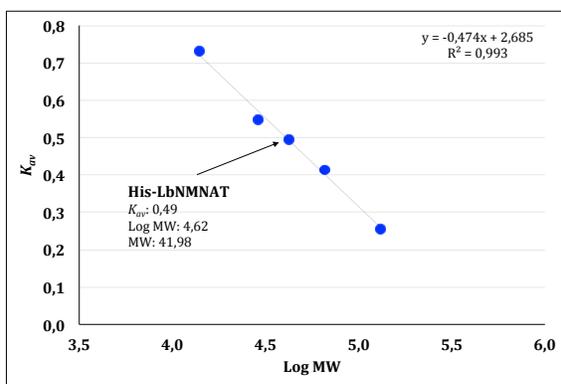
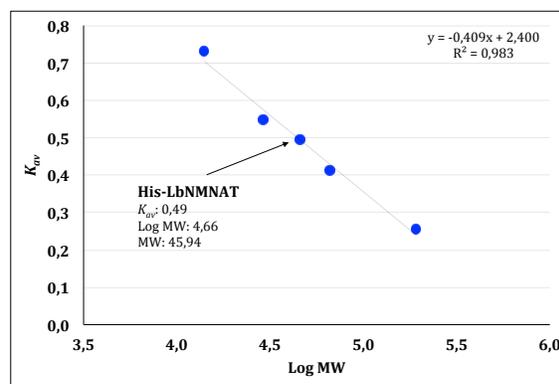
**A****B****C**

Tabla 6-2: Coeficientes de partición (K_{av}) de las proteínas patrón empleadas en SEC.

Proteína patrón	Peso molecular en Da (MW)	Log MW	Volumen de elución (V_e) (ml)	Coeficiente de partición (K_{av})= $V_e - V_o / V_c - V_o$
His-HsNMNAT-1 (6-mer)	198000	5,283301	12,27	0,256653
His-HsNMNAT-1 (4-mer)	132000	5,120574	12,27	0,256653
BSA	66463	4,822579	14,75	0,413814
Anhidrasa carbónica	29000	4,462397	16,85	0,546894
Lisozima	14307	4,155548	19,76	0,731305
Otros datos				
Azul de dextrán	Volumen muerto (V_o): 8,22 ml			
Columna Superdex 200 10/300	Volumen de la columna (V_c): 24 ml			

6.3.2. La proteína recombinante His-LbNMNAT puede establecer diferentes organizaciones cuaternarias según gráficos de Ferguson

Enfocados en obtener información sobre la organización cuaternaria de la proteína His-LbNMNAT mediante técnicas experimentales adicionales, se procedió a su análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas (PAGE). Esta estrategia permitió observar distintas organizaciones de la proteína His-LbNMNAT, en 4 bandas de distinto peso molecular. La identidad de estas bandas se confirmó mediante inmunodetección utilizando el anticuerpo anti-6xHis (Figura 6-12).

La construcción y análisis de gráficos de Ferguson, metodología ampliamente utilizada para la determinación de estructuras cuaternarias [116–118], requiere el empleo de

proteínas patrón cuya organización oligomérica ha sido determinada. En el presente trabajo se emplearon las proteínas lactoalbúmina (14 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), anhidrasa carbónica, ovoalbúmina (43 kDa) y BSA, las cuales se analizaron en PAGEs de diferentes concentraciones de acrilamida (Figura 6-13). La migración relativa (R_f) de las proteínas patrón en los distintos geles (Tabla 6-3) se empleó para determinar el coeficiente de retardo (K_r) para las mismas (Figura 6-14 y Tabla 6-4). Los valores de K_r , que corresponden a la pendiente de cada una de las rectas mostradas en la Figura 6-14, se utilizaron para construir el respectivo gráfico de Ferguson (Figura 6-15).

Una vez calculados los K_r de los patrones, se determinó el K_r de las cuatro bandas observadas para la proteína His-LbNMNAT, valores que se interpolaron en el gráfico de Ferguson construido y que permitieron calcular el peso molecular de dichas bandas (Figura 6-16 y Tabla 6-5). Los pesos moleculares obtenidos, al ser divididos por el peso molecular de la proteína His-LbNMNAT monomérica (36 kDa), indicaron que las cuatro bandas corresponden a diferentes organizaciones oligoméricas. Los valores se ajustan al peso molecular esperado para monómeros (en concordancia con los resultados obtenidos por SEC), dímeros, trímeros y hexámeros (Tabla 6-5).

Los gráficos de Ferguson aportan información sobre la estructura cuaternaria de las proteínas analizadas. Sin embargo, en el caso de las 4 bandas observadas para la proteína His-LbNMNAT, se sugiere evaluar su actividad enzimática, verificando la funcionalidad catalítica de estas posibles organizaciones oligoméricas. La zimografía representa una alternativa experimental para tal fin.

Conjuntamente, los experimentos implementados para el estudio de la estructura cuaternaria de la proteína His-LbNMNAT, aportaron información estructural novedosa: los ensayos de SEC revelaron que dicha proteína eluye como un monómero enzimáticamente activo, mientras que el gráfico de Ferguson indicó diferentes organizaciones oligoméricas de la misma (dímeros, trímeros y hexámeros).

Figura 6-12: Análisis de la proteína recombinante His-LbNMNAT nativa mediante PAGE. **A.** La proteína His-LbNMNAT proveniente de la purificación mediante IMAC se separó electroforéticamente en geles de poliacrilamida nativos 12 % (2). Como control, se cargó la proteína anhidrasa carbónica que establece estructuras cuaternarias (1). Las flechas negras indican las 4 bandas observadas para la muestra His-LbNMNAT. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. **B.** Adicionalmente, la proteína His-LbNMNAT se analizó mediante Western blot utilizando el anticuerpo primario anti-6xHis. Membrana PVDF. Los rombos negros corresponden a las 4 bandas observadas en la Figura A. Sistema de revelado con peroxidasa.

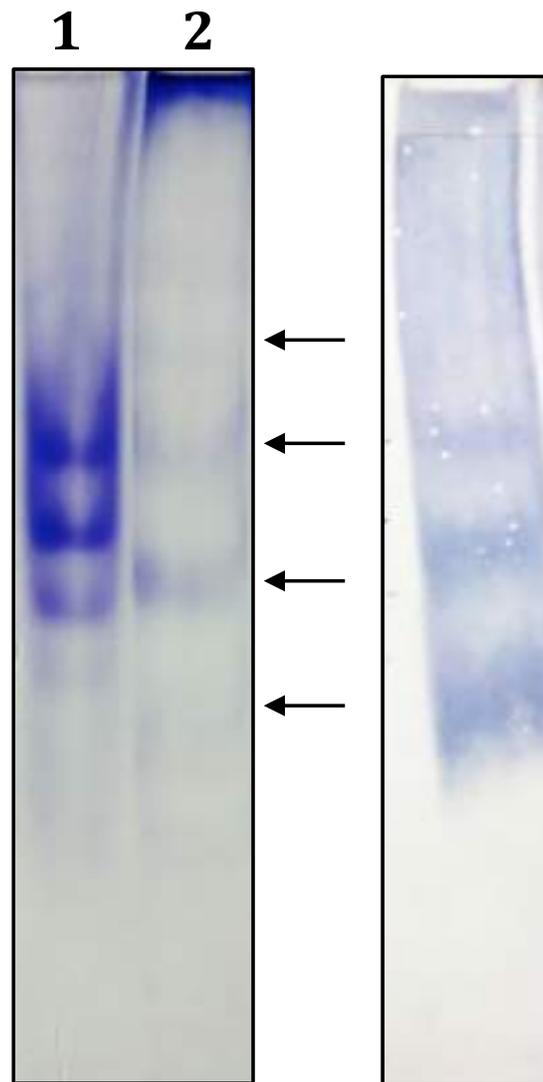


Figura 6-13: Análisis de proteínas nativas mediante PAGE. Las proteínas patrón lactoalbúmina (1), inhibidor de tripsina (2), anhidrasa carbónica (3), ovoalbúmina (4), BSA (5) y la proteína His-LbNMNAT proveniente de la purificación mediante IMAC (6) se separaron en PAGEs de diferentes porcentajes de acrilamida. Las flechas rojas indican las bandas utilizadas de cada patrón para construir el gráfico de Ferguson. Las flechas negras indican las 4 bandas observadas para la proteína His-LbNMNAT junto con su nomenclatura. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie.

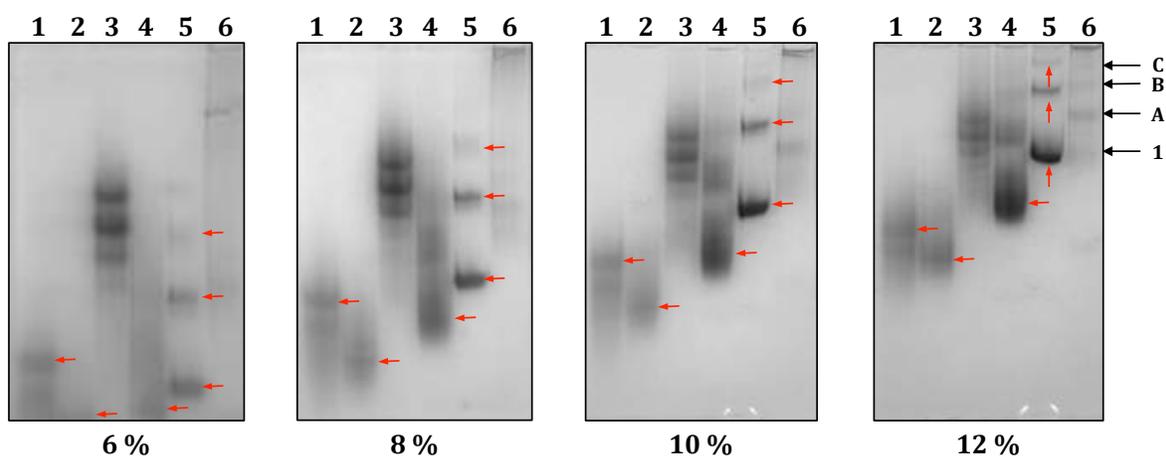


Tabla 6-3: Migración relativa (R_f) de las proteínas patrón analizadas mediante page.

	Lactoalbúmina (14 kDa)	Inhibidor de tripsina (20 kDa)	Anhidrasa carbónica (29 kDa)	*BSA (66 kDa)	BSA (132 kDa)	BSA (198 kDa)
% acrilamida	Log R_f	Log R_f	Log R_f	Log R_f	Log R_f	Log R_f
12	-0,31	-0,25	-0,53	-0,51	-0,93	-1,33
10	-0,23	-0,15	-0,46	-0,35	-0,63	-0,93
8	-0,16	-0,07	-0,34	-0,19	-0,39	-0,54
6	-0,07	-0,01	-0,25	-0,04	-0,17	-0,29

* En el caso del BSA se utilizaron las 3 bandas observadas en los PAGEs para construir el gráfico de Ferguson.

Figura 6-14: Determinación de los coeficientes de retardo (K_r) de las proteínas patrón analizadas mediante PAGE. El K_r de las proteínas lactoalbúmina (14 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y BSA (66, 132 y 198 kDa) se determinó a partir de la ecuación de las rectas, las cuales se indican en la Tabla 6-4.

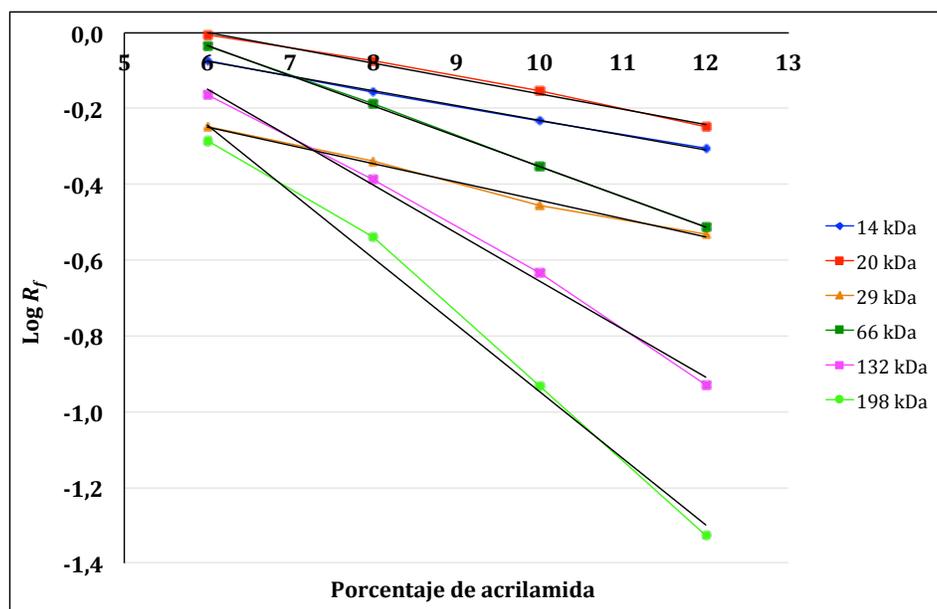


Tabla 6-4: Coeficiente de retardo (K_r) de las proteínas patrón analizadas mediante PAGE.

Muestra	Ecuación de la recta	R^2	K_r
14 kDa	$y = -0,039x + 0,1593$	0,99893	0,039
20 kDa	$y = -0,0405x + 0,244$	0,99544	0,0405
29 kDa	$y = -0,0483x + 0,0412$	0,99403	0,0483
66 kDa	$y = -0,0799x + 0,4461$	0,99953	0,0799
132 kDa	$y = -0,1267x + 0,6118$	0,9954	0,1267
198 kDa	$y = -0,1759x + 0,8119$	0,9904	0,1759

Figura 6-15: Gráfico de Ferguson. Los coeficientes de retardo (K_r) y el peso molecular de las proteínas patrón analizadas mediante PAGE, se emplearon para construir el gráfico de Ferguson. La ecuación de la recta obtenida se utilizó para calcular el peso molecular de las 4 bandas observadas para la proteína His-LbNMNAT en los geles nativos. Los pesos calculados se indican en la Tabla 6-5.

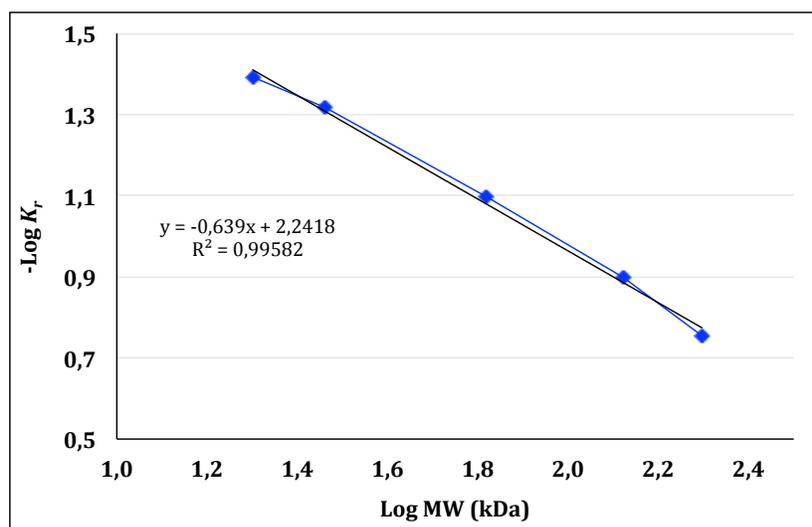


Figura 6-16: Determinación de los coeficientes de retardo (K_r) de las 4 bandas de la proteína His-LbNMNAT analizada mediante PAGE. El K_r de las bandas A-C y 1 se tomó a partir de la ecuación de las rectas indicadas.

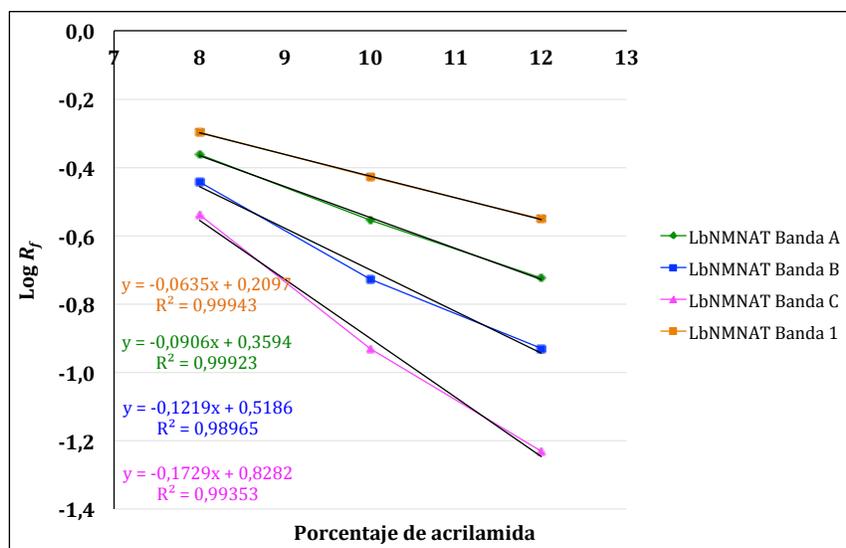


Tabla 6-5: Determinación del tipo de oligómero para la proteína His-LbNMNAT a partir del gráfico de Ferguson.

Proteína His-LbNMNAT	K_r	$-\text{Log } K_r$	Log MW	MW (kDa)	MW/36	Oligómero
Banda 1	0,0635	1,20	0,0635	39,92	1,11	Monómero
Banda A	0,0906	1,04	0,0906	73,08	2,03	Dímero
Banda B	0,1219	0,91	0,1219	121,07	3,36	Trímero
Banda C	0,1729	0,76	0,1729	219,41	6,09	Hexámero

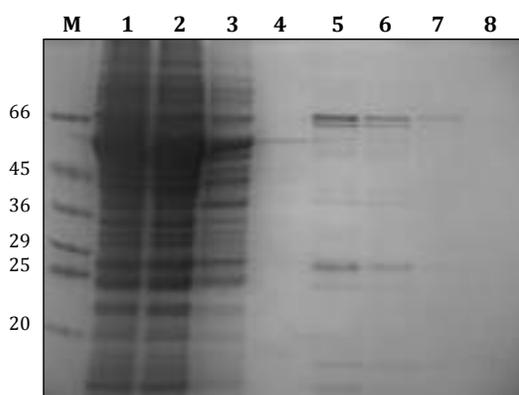
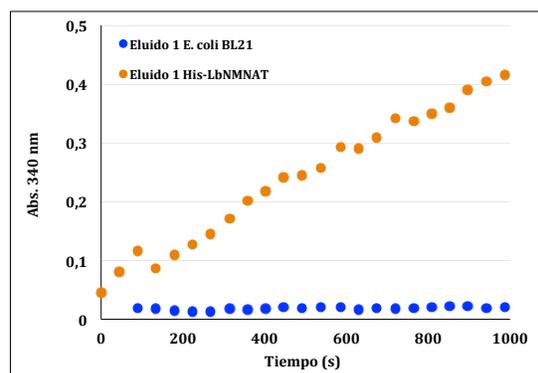
6.4 Caracterización enzimática de la proteína recombinante His-LbNMNAT

Como se indicó con anterioridad, la proteína His-LbNMNAT purificada mediante IMAC, exhibe actividad catalítica (Figuras 6-7 y 6-8). Teniendo en cuenta que la proteína se purificó de manera parcial, entonces la síntesis de NAD observada puede deberse no solo a la proteína de interés, sino también a la actividad de las NMNATs propias del sistema de expresión.

Para descartar esta posibilidad, la fracción soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar e inducidas, se sometió al protocolo de purificación mediante IMAC. Los

eluidos resultantes se utilizaron para ejecutar ensayos enzimáticos acoplados, los cuales no evidenciaron síntesis de NAD (Figura 6-17). Este resultado permite concluir que la actividad enzimática observada para la proteína His-LbNMNAT parcialmente purificada, proviene de si misma.

Figura 6-17: El sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3) no exhibe actividad enzimática de NMNAT. **A.** Purificación mediante IMAC de proteínas de la fracción soluble del sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar e inducido. Fracción soluble de partida (1), proteínas no enlazadas (2), lavados 1 (3) y 10 (4), eluidos 1-4 (5-8). SDS-PAGE 10%. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa. **B.** El eluido 1 (20 μ l) obtenido en el ensayo de purificación mostrado en la Figura A se empleó para realizar ensayos enzimáticos acoplados. Como control positivo de reacción se empleó el eluido 1 (20 μ l) obtenido en el ensayo IMAC de la proteína His-LbNMNAT (Figura 6-4 B).

**A****B**

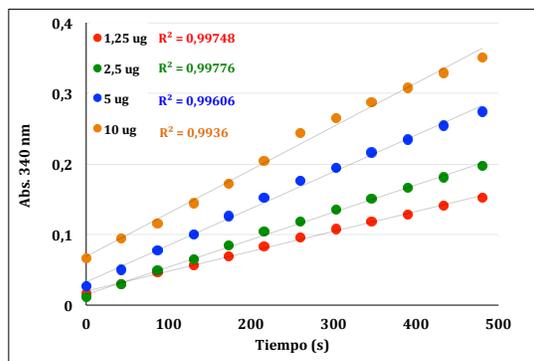
La caracterización enzimática de la proteína His-LbNMNAT incluyó el estudio de aspectos como: concentración de trabajo, medios de almacenamiento y termo-estabilidad. Adicionalmente, se establecieron las condiciones experimentales óptimas de actividad catalítica (sistemas de amortiguación, pH, temperatura y cofactores enzimáticos), bajo las cuales se determinaron los siguientes parámetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidad máxima (V_{max}) y número de recambio (K_{cat}). Finalmente, se determinó la constante de equilibrio (K_D) y se evaluó la capacidad de la proteína His-LbNMNAT para sintetizar NAAD a partir de los sustratos NAMN y ATP.

Inicialmente, se evaluaron diferentes cantidades de la proteína His-LbNMNAT en ensayos enzimáticos acoplados (1.5-10 μg de enzima/reacción). Estos ensayos, cuyas curvas de progreso se mantuvieron lineales durante el tiempo de reacción, indicaron que es posible trabajar hasta con 10 μg de la enzima sin agotar los sustratos de la reacción (Figura 6-18 A). De acuerdo con estos resultados, los siguientes ensayos de actividad se ejecutaron empleando 2,5 μg de enzima/reacción. Luego, se ensayaron dos sistemas de amortiguación en la mezcla de reacción: Tris/HCl (pK_a 8.1) y HEPES/KOH (pK_a 7.5). Aunque con ambos sistemas se observó actividad enzimática, los datos obtenidos con el buffer HEPES presentaron una menor desviación estándar entre sí con respecto al buffer Tris (Figura 6-18 B), razón por la cual se eligió el sistema de amortiguación HEPES para el estudio de la proteína His-LbNMNAT.

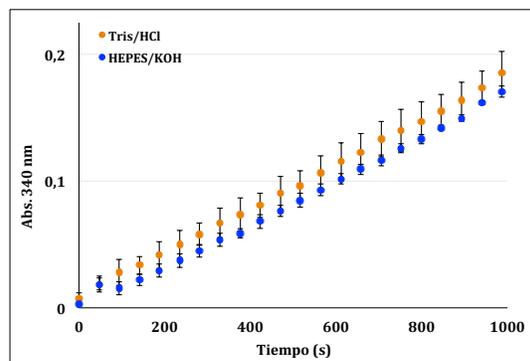
Con el propósito de establecer condiciones apropiadas de almacenamiento de la proteína His-LbNMNAT, se aplicaron las condiciones empleadas para otras NMNATs, evaluando 3 tratamientos: almacenamiento de la enzima a -20°C suplementada con 1. DTT 1 mM. 2. DTT 1 mM y glicerol 10% (V/V). 3. Enzima en buffer de lisis (300 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 pH 8.0/NaOH). Al cabo de dos semanas de almacenamiento, se ejecutaron ensayos enzimáticos acoplados, los cuales revelaron que únicamente el tratamiento 2 conserva la actividad de la enzima (Figura 6-18 C). Resultados similares se obtuvieron al almacenar la enzima a -80°C con DTT y glicerol (Figura 6-18 D). Respecto a los ensayos de termo-estabilidad, se observó que a partir de 40°C la actividad de la proteína His-LbNMNAT es abolida por completo (Figura 6-18 E).

Figura 6-18: Estudio enzimático de la proteína His-LbNMNAT. Mediante ensayos enzimáticos acoplados se realizó la evaluación de: **A.** Concentración de proteína. (El R^2

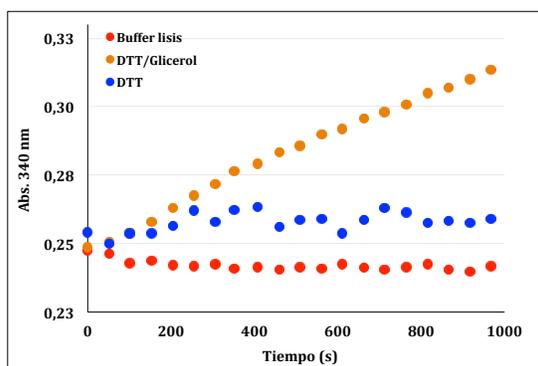
para cada ensayo indica la linealidad de los mismos). **B.** Sistemas de amortiguación. Datos indicados como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$). **C.** Buffer de almacenamiento. **D.** Temperatura de almacenamiento. **E.** Termo-estabilidad.



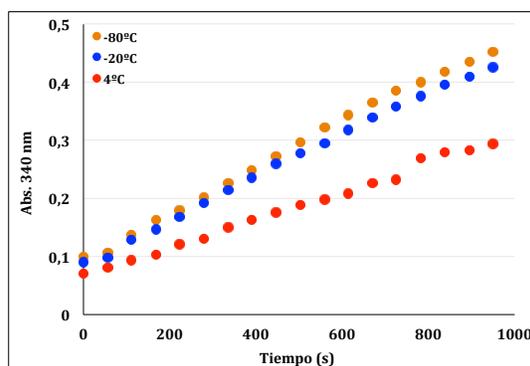
A



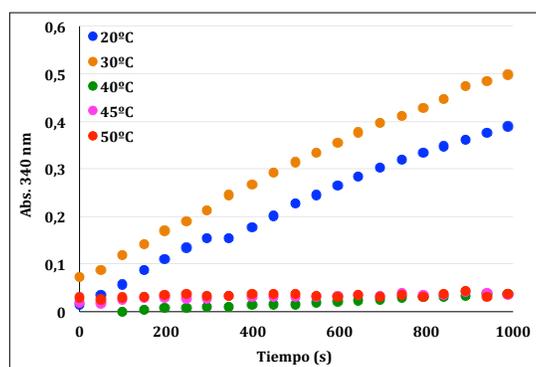
B



C



D

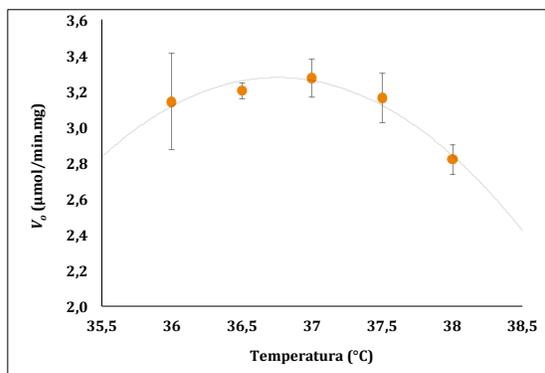
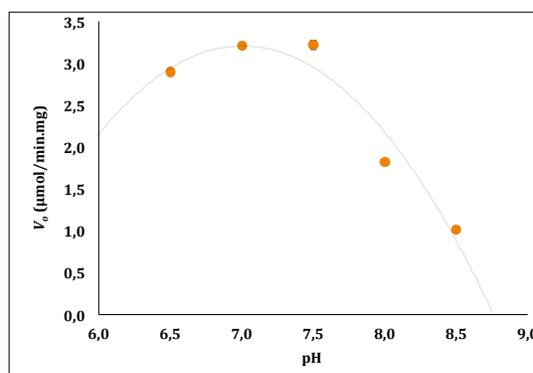


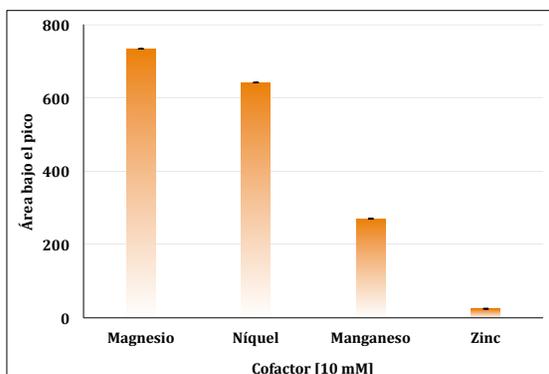
E

En relación con las condiciones óptimas de temperatura y pH de reacción, se obtuvieron valores respectivos de 37°C y un pH óptimo entre 6,5 y 7,5 (Figura 6-19). La evaluación de diferentes cationes divalentes sobre la actividad enzimática de la proteína His-

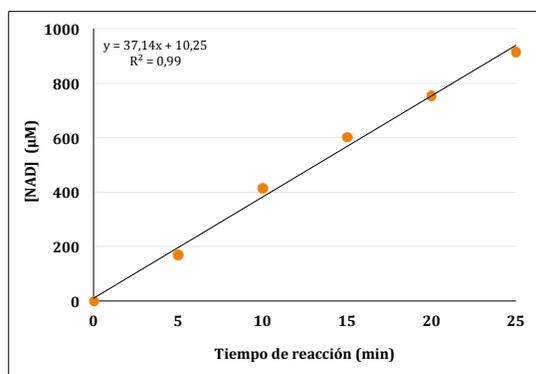
LbNMNAT indicó que la enzima cataliza su reacción preferentemente en presencia de Mg^{2+} , tal como se ha reportado para las iso-enzimas humanas HsNMNAT2 y 3 [62] y de levadura ScNMNAT1 [131]. La actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT en presencia de níquel (87%), manganeso (42%) y zinc (9%) se calculó con respecto a la actividad registrada con magnesio (100%). En presencia de Ca^{2+} y Cu^{2+} no se observó actividad enzimática (Figura 6-19 C).

Figura 6-19: Condiciones óptimas de actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT. Mediante ensayos enzimáticos directos se determinaron las condiciones óptimas de: **A.** Temperatura. **B.** pH. **C.** Cationes divalentes. **D.** Rango lineal de actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT. Los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$).

**A****B**



C



D

Una vez determinadas las condiciones óptimas de actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT, se procedió al estudio de sus parámetros cinéticos. Para lograr este objetivo, se debe calcular la velocidad inicial de reacción de la enzima dentro del rango lineal de actividad [64]. Por esta razón, se ejecutaron ensayos enzimáticos a diferentes tiempos y se determinó la cantidad de NAD^+ producido mediante análisis por RP-HPLC. Estos ensayos indicaron que la actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT es lineal, al menos, durante los 25 min iniciales de la reacción, bajo las condiciones óptimas de actividad (Figura 6-19 D). Con base en este resultado, se determinaron los parámetros cinéticos de la enzima ejecutando ensayos de actividad durante 2 min.

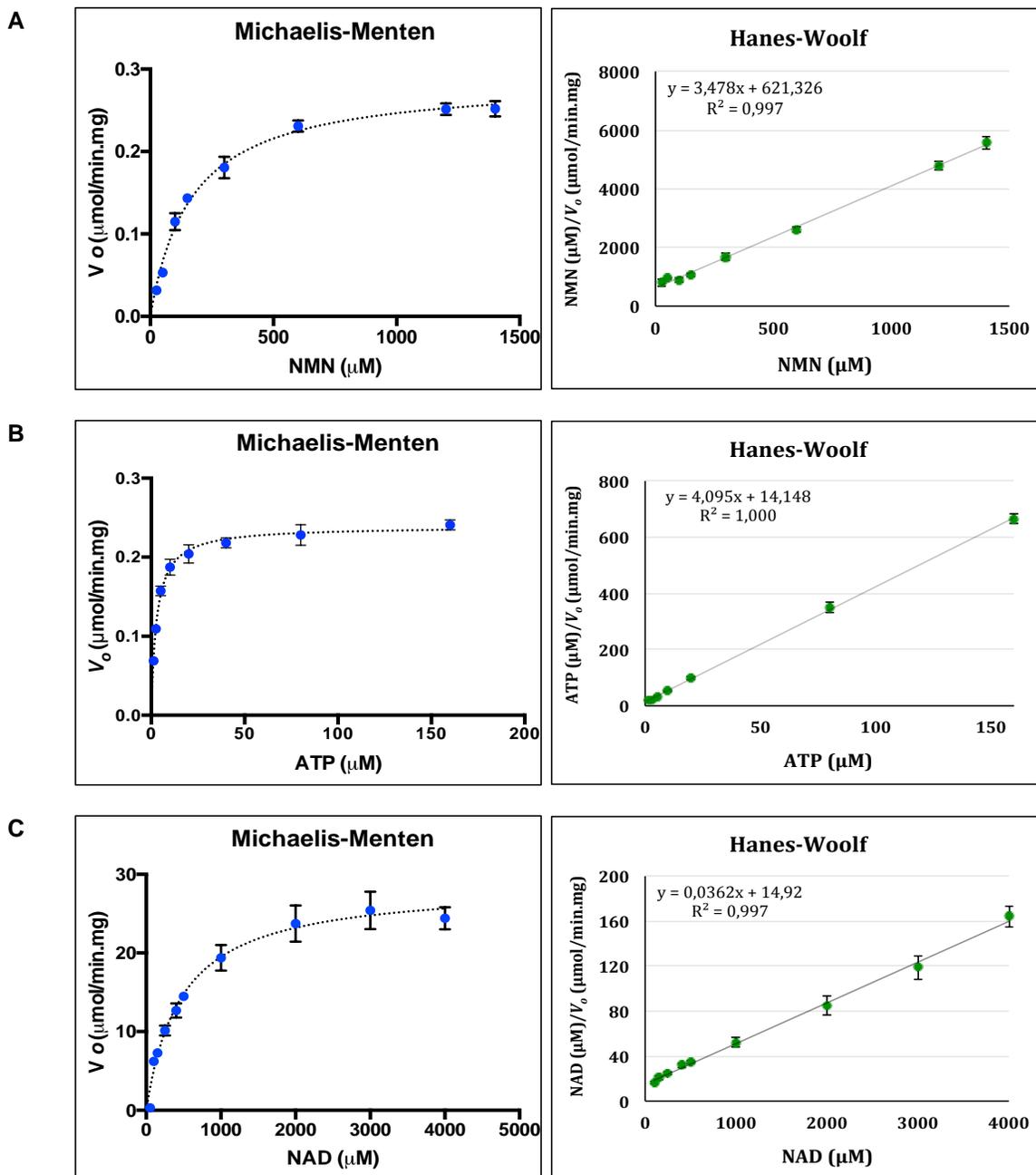
La determinación de las constantes de afinidad (K_m) por los sustratos NMN y ATP se realizó mediante ensayos enzimáticos acoplados mientras que para los sustratos NAD y PPi se empleó el ensayo enzimático directo y el análisis correspondiente mediante RP-HPLC. La elección del tipo de ensayo se realizó teniendo en cuenta que la determinación de los parámetros cinéticos de las iso-enzimas humanas His-HsNMNAT1-3 se ha efectuado del mismo modo [62, 108]. La cantidad de productos sintetizados por la proteína His-LbNMNAT se cuantificó empleando curvas de calibración (Anexo G). El análisis de datos se basó en métodos de regresión no lineal (Michaelis-Menten) y lineal (Hanes-Woolf), que generaron resultados consistentes entre sí (Tabla 6-6 y Figura 6-20).

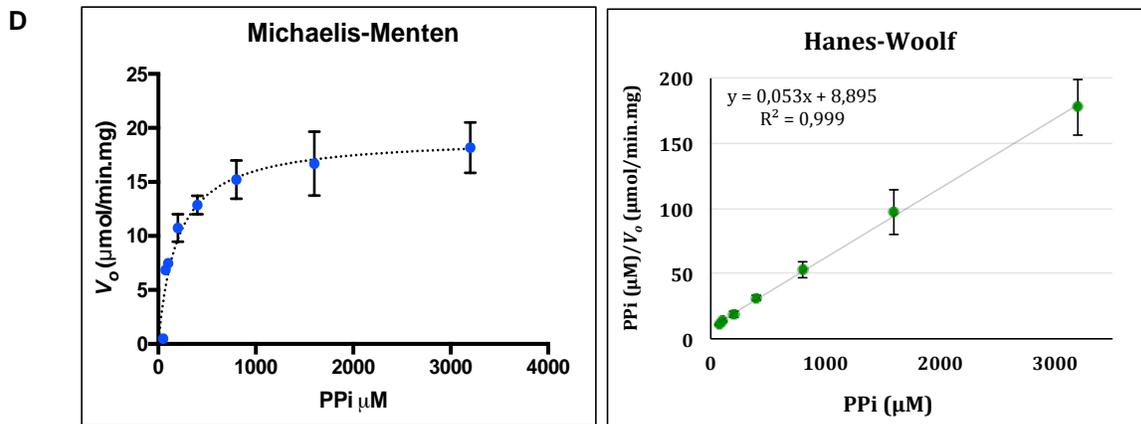
Tabla 6-6: Parámetros cinéticos de la proteína His-LbNMNAT.

Sustrato	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$)	Número de recambio, K_{cat} (sec^{-1})

	Lineal	No lineal	Lineal	No lineal	Lineal	No lineal
NMN	178,7	166,7	0,3	0,3	0,2	0,2
ATP	3,5	2,9	0,2	0,2	0,1	0,1
NAD	412,2	470,2	27,6	28,7	16,6	17,2
PPi	166,6	196	18,7	19,2	11,2	11,5

Figura 6-20: Determinación de los parámetros cinéticos de la proteína His-LbNMNAT. Mediante métodos de regresión lineal (Hanes-Woolf, programa Excel) y no lineal (programa Prism6), se determinaron los valores de K_m y V_{max} . Se emplearon concentraciones saturantes de los siguientes sustratos: **A.** ATP: 10 mM. **B.** NMN: 5 mM. **C.** PPi: 10 mM. **D.** NAD: 10 mM. Los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$).





Con relación a los 4 sustratos evaluados, la proteína His-LbNMNAT exhibe la mayor afinidad por el ATP y la menor afinidad por el NAD. Para el NMN y PPI se determinaron valores de K_m dentro del rango reportado para otras NMNATs (Tabla 1-2). Al comparar los sustratos de la reacción directa (NMN y ATP), se observó que la proteína His-LbNMNAT es ~ 57 veces ($166,7/2,9$) más afín por el ATP con respecto al NMN. Este resultado es semejante con aquellos reportados para las NMNATs de *E. coli* (NadR) y *S. solfataricus* (Tabla 1-2), cuyas afinidades respectivas por el ATP son 400 y 175 veces mayores en comparación con la afinidad por el NMN. A pesar de esta semejanza, la alta afinidad por el ATP observada en estas proteínas resulta ser una excepción, en comparación con el resto de las NMNATs caracterizadas hasta el momento.

El análisis de la velocidad máxima, reveló que la proteína His-LbNMNAT es más rápida catalizando la degradación del NAD, en contraste con su capacidad para sintetizarlo. Específicamente, se obtuvieron valores cercanos a $20 \mu\text{mol}/\text{min.mg}$ para la degradación del NAD con respecto a $0,2 \mu\text{mol}/\text{min.mg}$ para la síntesis del mismo (Tabla 6-6). Los números de recambio (K_{cat}) calculados confirmaron este resultado, dado que la enzima consume ~ 16 moléculas de NAD/s en la reacción reversa, en comparación con $0,2$ moléculas de NMN/s en la reacción directa. Una tendencia similar se ha reportado para las iso-enzimas His-HsNMNAT1-3, las cuales son tres veces más eficientes degradando NAD *in vitro* [108].

En vista de que la proteína His-LbNMNAT puede catalizar tanto la reacción directa (síntesis de NAD y PPI) como reversa (síntesis de ATP y NMN), se determinó la constante de equilibrio (K_D) para ambas reacciones. Para esto, se ejecutaron ensayos enzimáticos

directos incubando la enzima con los sustratos ATP y NMN o NAD y PPI durante diferentes intervalos de tiempo (2, 4, 24h), al cabo de los cuales se cuantificó el producto sintetizado. Las constantes calculadas indicaron que la reacción reversa se favorece *in vitro* (Tabla 6-7). Ziegler y colaboradores han propuesto que la baja disponibilidad fisiológica de PPI limita la reacción reversa de la NMNAT, razón por la que la actividad adenilil transferasa de la enzima prevalece *in vivo* [108].

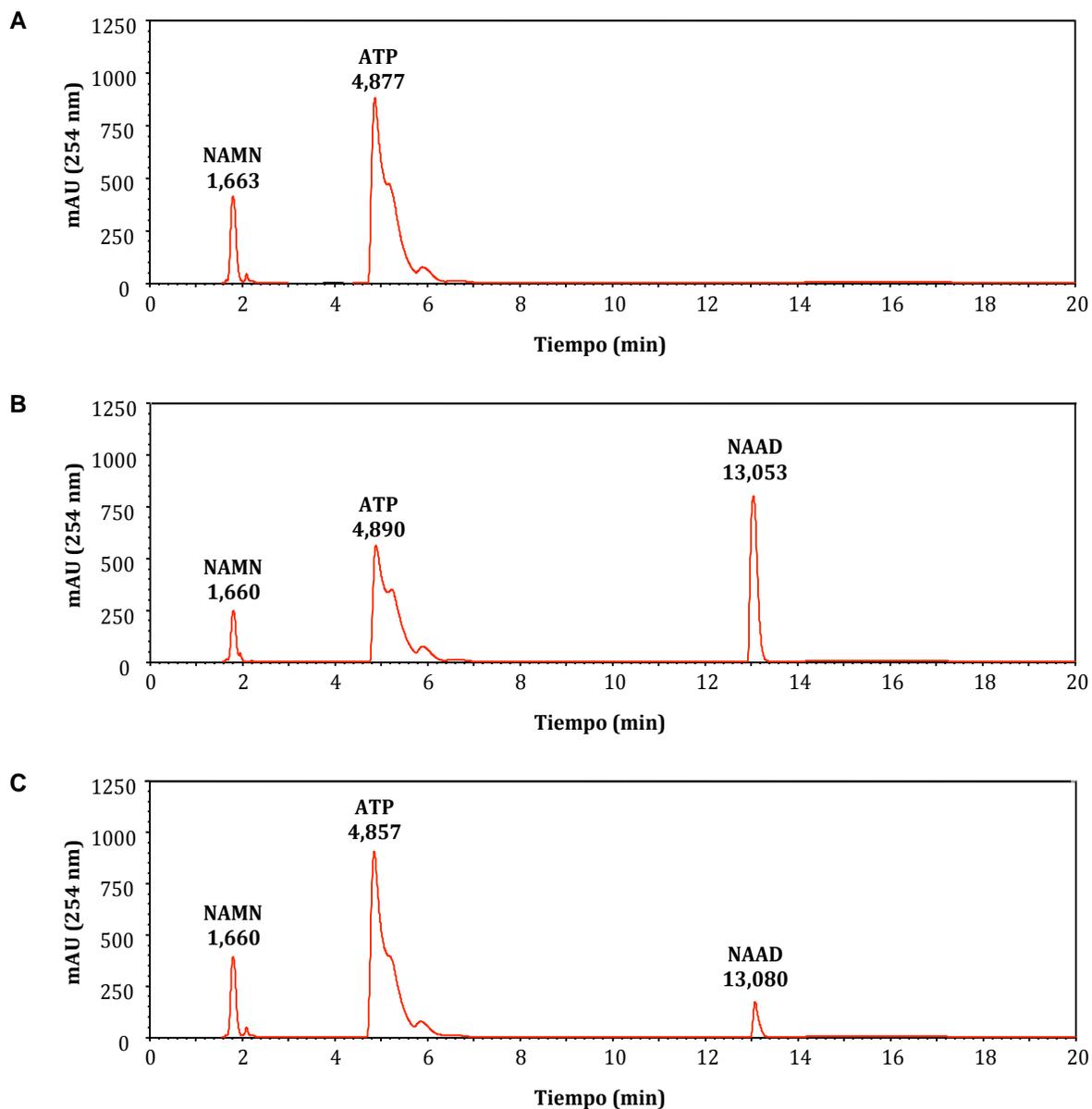
Tabla 6-7: Constante de equilibrio (K_D) de la proteína His-LbNMNAT.

REACCIÓN DIRECTA (NMN+ATP)					
Tiempo (h)	NAD (μM)	PPI (μM)	ATP (μM)	NMN (μM)	$K_D = \frac{[\text{NAD}] \cdot [\text{PPI}]}{[\text{NMN}] \cdot [\text{ATP}]}$
2	132,893	132,893	341,469	341,469	0,151
4	174,127	174,127	455,974	455,974	0,146
24	129,976	129,976	339,349	339,349	0,147
REACCIÓN REVERSA (NAD+PPI)					
Tiempo (h)	NAD (μM)	PPI (μM)	ATP (μM)	NMN (μM)	$K_D = \frac{[\text{NMN}] \cdot [\text{ATP}]}{[\text{NAD}] \cdot [\text{PPI}]}$
2	288,999	288,999	898,948	898,948	9,676
4	273,428	273,428	876,645	876,645	10,279
24	215,715	215,715	705,746	705,746	10,704

Teniendo en cuenta que la mayoría de NMNATs pueden emplear el NAMN como sustrato para sintetizar NAAD (Tabla 1-2), se evaluó la capacidad de la proteína His-LbNMNAT para catalizar esta reacción. El análisis de ensayos enzimáticos directos por RP-HPLC, indicó la síntesis del producto NAAD por parte de la proteína His-LbNMNAT, tal como sucedió con el control positivo (proteína His-HsNMNAT3) (Figura 6-21). Los resultados reportados en el presente trabajo, algunos de los cuales hemos publicado previamente [132], aportan información funcional sobre la proteína recombinante His-LbNMNAT. De manera adicional, dichos resultados ofrecen nuevas rutas de exploración científica, como por ejemplo, la determinación de los parámetros cinéticos por el sustrato NAMN y la evaluación de inhibidores basados en la estructura del ATP (dada la alta afinidad que

exhibe la proteína His-LbNMNAT por el mismo), que sirvan como punto de partida para el desarrollo de posibles estrategias de control del patógeno.

Figura 6-21: La proteína recombinante His-LbNMNAT sintetiza NAAD. La síntesis de NAAD se verificó mediante RP-HPLC empleando las siguientes muestras: **A.** Buffer de reacción. **B.** Proteína His-HsNMNAT3 (control positivo de actividad enzimática). **C.** Proteína His-LbNMNAT. Para la ejecución del ensayo se utilizaron 2,5 µg de cada enzima. Se indican los picos y tiempos de retención correspondientes para los sustratos NAMN y ATP, así como para el producto NAAD.



6.5 Localización celular de la proteína LbNMNAT en *L. braziliensis*

Con el propósito de identificar, a nivel celular, donde ocurre la síntesis del NAD en el parásito *L. braziliensis*, se aprovecharon diversas herramientas computacionales. Los 3 predictores empleados sugirieron una localización mitocondrial para la proteína LbNMNAT. Sin embargo, uno de los servidores (Euk-mPLoc) predijo, adicionalmente, localización nuclear y citosólica para la proteína bajo estudio (Tabla 6-8).

Por su parte, las herramientas MitoProtII [133], [iPSORT](#) [134] y SignalP [135], no detectaron señales de localización celular en la proteína mencionada. La ausencia de este tipo de señales, permite suponer una localización citosólica para la proteína LbNMNAT.

Tabla 6-8: Predicción de la localización celular de la proteína LbNMNAT.

PREDICTOR	LOCALIZACIÓN SUGERIDA	REFERENCIA
SubLoc	Mitocondria	[136]
ESLpred	Mitocondria	[137]
Euk-mPLoc	Mitocondria, citoplasma y núcleo	[138]

Para corroborar las observaciones computacionales indicadas, se aplicaron diferentes estrategias experimentales, basadas en la detección de la proteína LbNMNAT del parásito por técnicas de Western blot e inmunolocalización *in situ*, específicamente, inmunofluorescencia. Teniendo en cuenta que estas técnicas requieren la utilización de anticuerpos contra la proteína de interés y que no existen anticuerpos comerciales disponibles para tal fin, en el presente trabajo se generaron y evaluaron diferentes anticuerpos dirigidos contra la proteína His-LbNMNAT. Esta herramienta inmunológica se empleó para detectar la NMNAT endógena de *L. braziliensis*.

6.5.1. Producción de anticuerpos policlonales anti His-LbNMNAT

Como se mencionó, la proteína His-LbNMNAT se acumula en la fracción insoluble del sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3) cuando se expresa desde el vector pET100-LbNMNAT (Figura 6-1). Esta propiedad se aprovechó para obtener fracciones enriquecidas con la proteína de interés, mediante la implementación de técnicas de aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión (CI) [139]. Estas técnicas, basadas en el uso de agentes caotrópicos como urea e hidrocloreuro de guanidina, permitieron obtener abundantes cantidades de la proteína His-LbNMNAT en fracciones solubles e insolubles (Figura 6-22).

La fracción soluble enriquecida con la proteína His-LbNMNAT se cuantificó mediante densitometría (10 µg de antígeno/ml de inóculo inducido) (Figura 6-22 B) y se utilizó como antígeno para la producción de anticuerpos policlonales en modelos murinos, siguiendo el esquema de inoculación descrito en la metodología. Una vez cumplido el programa de inmunización de los ratones, se extrajeron sangrías y se obtuvieron sueros sanguíneos, los cuales se denominaron “*anticuerpos anti His-LbNMNAT*”, cuyo volumen y concentración de proteínas se indica en la Tabla 6-9.

Figura 6-22: Aislamiento y cuantificación del antígeno His-LbNMNAT a partir de CI. **A.** Las fracciones solubles (1) e insolubles (2) resultantes del aislamiento, solubilización y diálisis de los CI de la proteína recombinante His-LbNMNAT se analizaron mediante SDS-PAGE 8%. **B.** La fracción soluble (Sol) se cuantificó mediante densitometría empleando como patrón diferentes cantidades (µg) de BSA (0,5; 1; 2; 4). SDS-PAGE 12%. Las flechas rojas y azules indican la proteína His-LbNMNAT y el producto de degradación de la misma, respectivamente. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa.

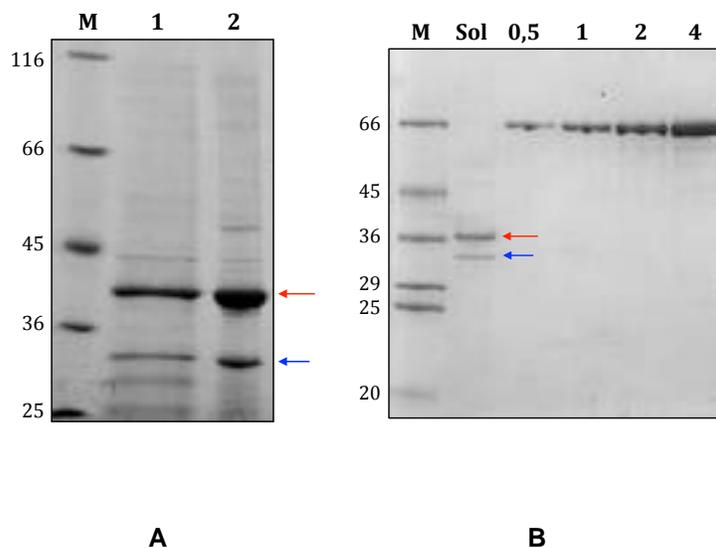


Tabla 6-9: Concentración de proteínas en los sueros sanguíneos de los ratones inmunizados.

RATÓN	SUERO	VOLUMEN (μ L)	OD _{280 nm}	*CONCENTRACIÓN (mg/ml)
1	1	100	1,1	29,7
	2	100	1,4	37,8
	3	200	1,4	37,8
2	1	100	1,3	35,1
	2	100	1,2	32,4
Control	1	100	1,3	35,1
	2	100	1,4	37,8
	3	200	1,3	35,1

* 1 Abs_{280 nm} = 1,35 mg/ml (IgG) [109]. Factor de dilución de cada suero = 20.

Evaluación de los anticuerpos anti His-LbNMNAT por ELISA y Western blot:

Los sueros mencionados se diluyeron de manera seriada (1:1000, 1:3000, 1:6000, 1:9000) y se utilizaron para realizar ELISAs indirectos fijando sobre la placa de 96 pozos la proteína His-LbNMNAT empleada para la inoculación de los ratones (10 μ g/pozo). Se

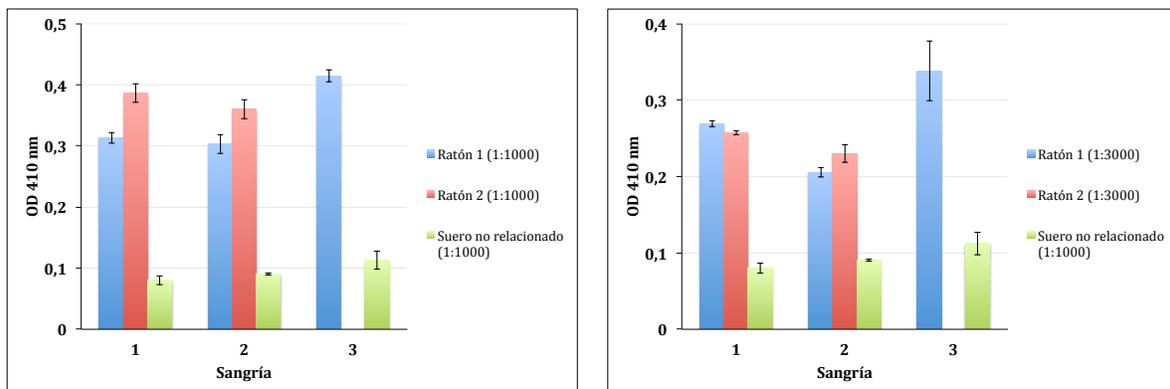
evaluaron los anticuerpos anti His-LbNMNAT de los dos ratones inmunizados junto con uno de los sueros control (ratón inoculado con PBS) (Figura 6-23). Los valores de densidad óptica (OD) registrados para cada muestra, se aprovecharon para calcular el título correspondiente de los anticuerpos evaluados. El título se calculó teniendo en cuenta definiciones previas [140] de la siguiente manera:

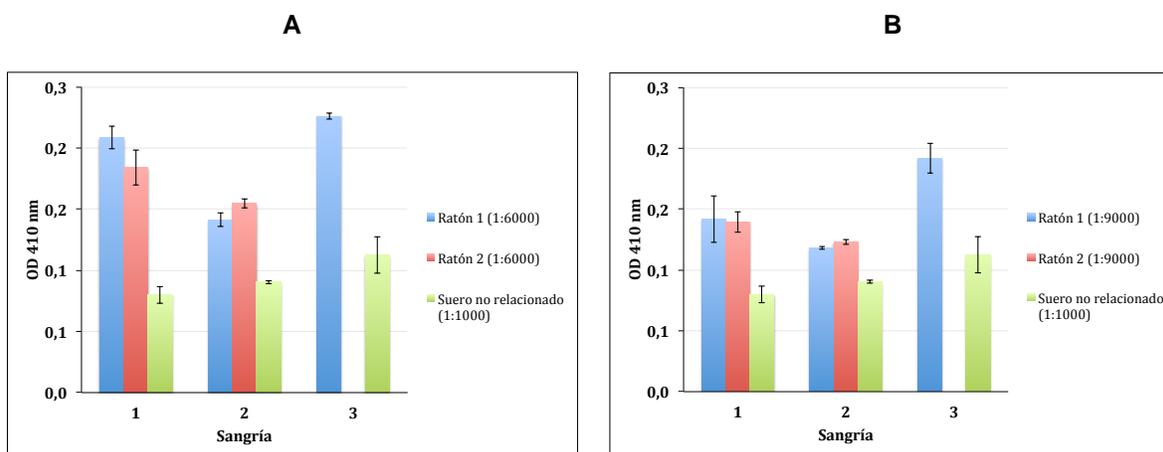
Se calcula el valor promedio de OD obtenida para cada dilución de anticuerpo y para el control negativo (suero sanguíneo de ratones no inmunizados). Luego, se establece el punto de corte, que se calcula como:

Punto de corte = promedio de la OD del control negativo + 3 veces su desviación estándar

El valor del punto de corte permite determinar el título de cada anticuerpo evaluado según la siguiente definición: el título corresponde a la mayor dilución del anticuerpo cuyos valores promedio de OD superen el valor del punto de corte. La dilución que se tuvo en cuenta del suero no relacionado para calcular punto de corte fue 1:1000. Con base en esta definición, se calculó el título de los anticuerpos evaluados, el cual resultó ser 1:9000 para todos los sueros ensayados (Tabla 6-10).

Figura 6-23: Evaluación de los sueros anti His-LbNMNAT mediante ELISA. Se indican los resultados obtenidos para las siguientes diluciones de los sueros evaluados: **A.** 1:1000. **B.** 1:3000. **C.** 1:6000. **D.** 1:9000. El proceso de revelado se realizó empleando ABTS y peróxido de hidrógeno. Los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$). La sangría 3 del ratón 2 no se evaluó debido a que el ratón murió antes de la sangría final.





Empleando el suero 3 del ratón 1 se realizaron ensayos de Western blot sobre la proteína recombinante His-LbNMNAT (~37.8 kDa). Todas las diluciones preparadas con este suero reconocieron de manera específica la proteína His-LbNMNAT, evidenciando la utilidad del protocolo de solubilización de CI para la producción de anticuerpos policlonales en modelos murinos (Figura 6-24).

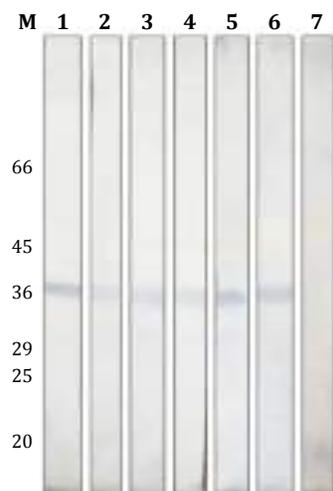
Tabla 6-10: Valores promedio de OD obtenidos para los anticuerpos anti His-LbNMNAT en ELISA

		DILUCIONES DE LOS ANTICUERPOS			
RATÓN INMUNIZADO	SANGRÍA	1:1000	1:3000	1:6000	1:9000
1	1 ^a	0,31	0,27	0,21	0,14
	2 ^a	0,30	0,21	0,14	0,12
	3 ^a	0,41	0,34	0,23	0,19
2	1 ^a	0,39	0,26	0,18	0,14
	2 ^a	0,36	0,23	0,15	0,12
	3 ^a	-	-	-	-

Valores de punto de corte calculados con las sangrías de los ratones no inmunizados: Sangrías: 1^a= 0,1; 2^a = 0,09; 3^a= 0,16. Resaltado en naranja se indica el título obtenido para los sueros evaluados.

Figura 6-24: Evaluación de los anticuerpos anti His-LbNMNAT mediante Western blot. Diferentes diluciones del suero 3 del ratón 1 se emplearon para inmunodetectar la

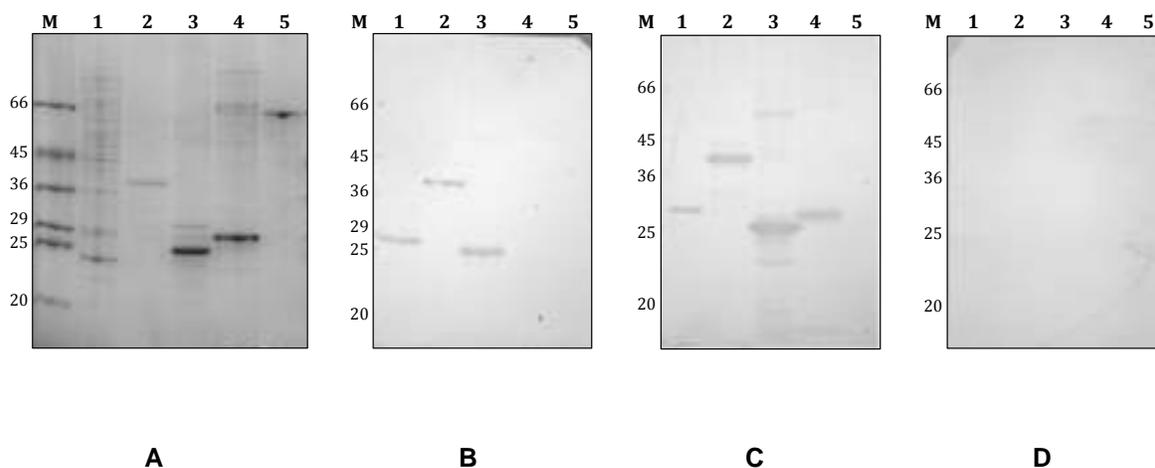
proteína His-LbNMNAT (500 ng/carril) transferida a membranas PVDF. Como control positivo se empleó el anticuerpo primario anti 6xHis (1). Como control negativo se empleó el suero no relacionado en dilución 1:500 (7). Se evaluaron las siguientes diluciones del anticuerpo anti His-LbNMNAT: 1:500 (2), 1:1000 (3), 1:2500 (4), 1:5000 (5) y 1:10000 (6). Sistema de revelado con fosfatasa alcalina. M, marcador de peso molecular en kDa.



Con el propósito de evaluar el reconocimiento cruzado de otras NMNATs por los anticuerpos anti His-LbNMNAT, se utilizaron fracciones proteicas totales de clones de *E. coli* que expresan la NMNAT de *G. lamblia* (His-GINMNAT, ~28 kDa, 25% de identidad con His-LbNMNAT) [94], *P. falciparum* (His-PfNMNAT, ~29 kDa, 37% de identidad con His-LbNMNAT) y la iso-enzima humana His-HsNMNAT3 (~29 kDa, 28% de identidad con His-LbNMNAT). El reconocimiento inmunológico de estas proteínas se realizó con la dilución 1:5000 del suero 3 del ratón 1.

Este experimento reveló el reconocimiento cruzado de las proteínas His-GINMNAT e His-PfNMNAT, mientras que las proteínas His-HsNMNAT3 y BSA no se reconocieron en el ensayo (Figura 6-25). Todas las proteínas evaluadas, a excepción de BSA, poseen la etiqueta 6xHis en su extremo amino terminal. Teniendo en cuenta que los anticuerpos anti His-LbNMNAT no reconocieron la proteína His-HsNMNAT3, se puede señalar que dicho anticuerpo reconoce epítopes propios de las NMNATs y no de la etiqueta 6xHis.

Figura 6-25: Inmunodetección cruzada de diferentes NMNATs con los anticuerpos anti His-LbNMNAT. **A.** Muestras evaluadas: extracto proteico del clon *E. coli* BL21 Rosetta His-GINMNAT (1), CI His-LbNMNAT (2), CI His-PfNMNAT (3), His-HsNMNAT3 (4), BSA (5). Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE 12%. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. Adicionalmente, las muestras se analizaron mediante Western blot utilizando los siguientes anticuerpos: **B.** Anti His-LbNMNAT (1:5000). **C.** Anti-6xHis (1:3000). **D.** Suero no relacionado (1:5000). **B-D:** Membranas PVDF. Sistema de revelado con fosfatasa alcalina. M, marcador de peso molecular en kDa.



6.5.2. Inmunodetección de la proteína “LbNMNAT” endógena de *L. braziliensis*

En seguida se presentarán experimentos de Western blot e inmunofluorescencia sobre muestras de parásitos del género *Leishmania*. Estos experimentos se realizaron empleando los anticuerpos anti His-LbNMNAT, específicamente, el suero 3 del ratón 1.

En primer lugar, se prepararon extractos de proteínas totales, solubles e insolubles de promastigotes de *L. braziliensis*. Los extractos totales se prepararon de 2 maneras: 1- Resuspensión de parásitos en buffer de carga 1X para SDS-PAGE (*Extracto total SDS*). 2- Resuspensión de parásitos en buffer de lisis con Tritón X-100 (*Extracto total Tritón X-100*). Los extractos solubles se obtuvieron al centrifugar (12000 rpm por 5 min a 4°C) la resuspensión celular de parásitos en buffer de lisis con Tritón X-100. El sobrenadante y precipitado obtenidos se denominaron *Fracción soluble* e *insoluble*, respectivamente.

Los 3 extractos mencionados (totales, solubles e insolubles) se analizaron mediante Western blot empleando los anticuerpos anti His-LbNMNAT. Inesperadamente, se detectó de manera específica una señal intensa de ~ 22 kDa (Figura 6-26), 12 kDa menos que el peso molecular teórico de la proteína LbNMNAT (33,7 kDa). La señal de ~ 22 kDa se observó tanto en fracciones solubles como insolubles del parásito (Figura 6-27). Adicionalmente, los ensayos de Western blot efectuados sobre *Extractos solubles* de diferentes especies de *Leishmania*, no solo del Nuevo sino del Viejo Mundo, revelaron la misma señal de ~ 22 kDa (Figura 6-28).

Con el objetivo de validar la señal detectada con los anticuerpos anti His-LbNMNAT generados en ratón, se ejecutaron ensayos de Western blot utilizando otros anticuerpos producidos en nuestro grupo de investigación: 1. Anticuerpos policlonales anti His-LbNMNAT generados en modelos aviares (IgYs). 2. Anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante NMNAT de *Trypanosoma cruzi* (His-TcNMNAT).

Al emplear los anticuerpos anti His-LbNMNAT aviares sobre *Extractos totales SDS* de promastigotes de *L. braziliensis*, se observó la misma señal de ~ 22 kDa detectada con los anticuerpos de ratón (Figura 6-29). Por su parte, los anticuerpos anti His-TcNMNAT reconocieron tanto la proteína recombinante control His-LbNMNAT así como la señal de ~ 22 kDa en el extracto de proteínas del parásito (Figura 6-30). Teniendo en cuenta el alto porcentaje de identidad entre las proteínas LbNMNAT y TcNMNAT (40%), este último resultado sugiere que la señal detectada de ~ 22 kDa, podría corresponder a la NMNAT endógena de *L. braziliensis*.

Figura 6-26: Evaluación de diferentes extractos proteicos totales de promastigotes de *L. braziliensis*. Carriles 1 y 2: *Extracto total SDS* (1×10^7 parásitos) y *Extracto total Tritón X-100* (1×10^7 parásitos), respectivamente. **A.** SDS-PAGE 10%. Proteínas visualizadas con azul Coomassie. Las inmunodetecciones se realizaron sobre membranas PVDF empleando los siguientes anticuerpos: **B.** Anti His-LbNMNAT (1:3000). **C.** Suero no relacionado (1:1000). Sistema de revelado con Luminol. M, marcador de peso molecular en kDa. Las flechas azules indican productos de degradación o reconocimientos inespecíficos.

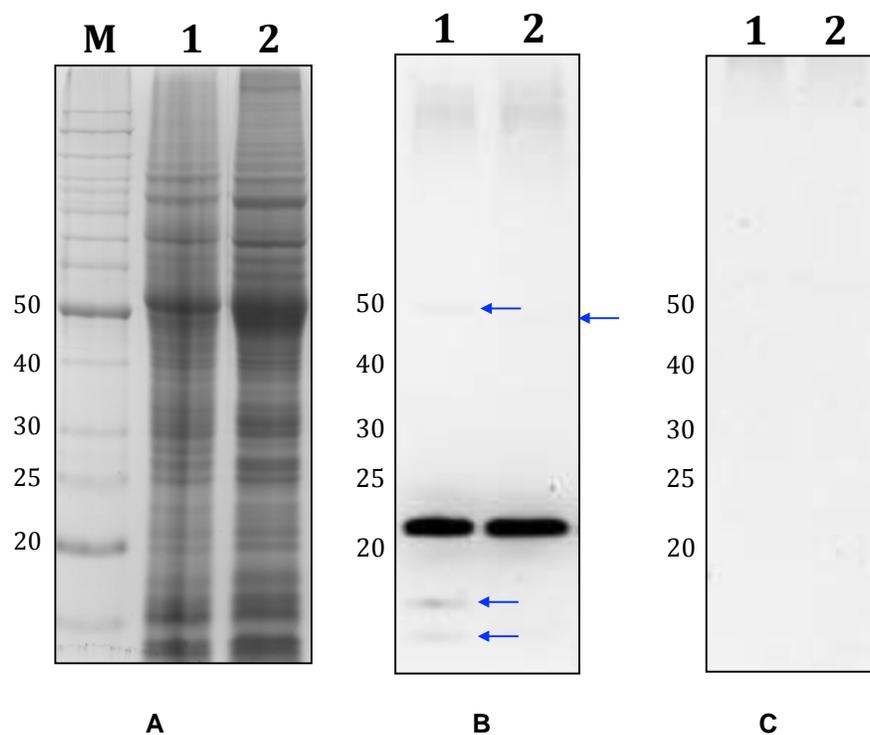


Figura 6-27: Evaluación de fracciones proteicas solubles e insolubles de promastigotes de *L. braziliensis*. Carriles 1 y 2: *Fracción soluble* (10 μ g) y *Fracción insoluble*, respectivamente. **A.** SDS-PAGE 10%. Proteínas visualizadas con azul Coomassie. Las inmunodetecciones se realizaron sobre membranas PVDF empleando los siguientes anticuerpos: **B.** Anti His-LbNMNAT (1:3000). **C.** Suero no relacionado (1:1000). Sistema de revelado con Luminol. M, marcador de peso molecular en kDa.

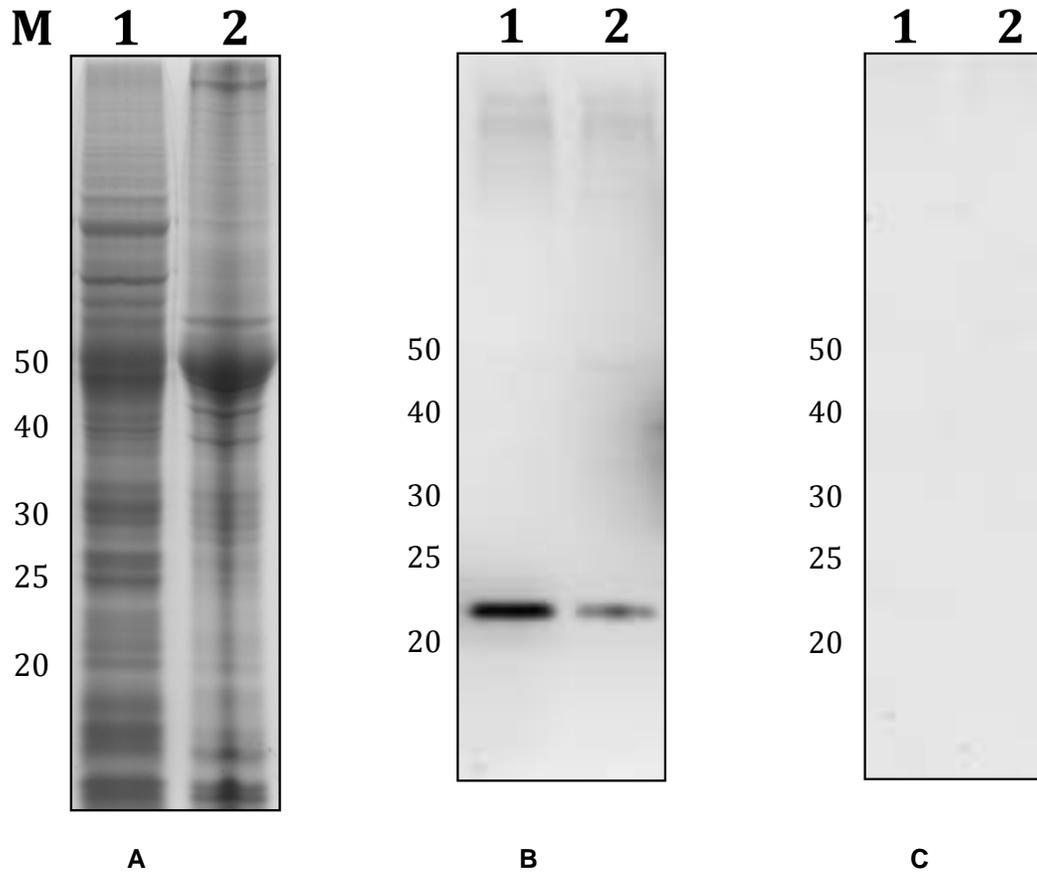


Figura 6-28: Ensayos de inmunodetección sobre promastigotes de diferentes especies del género *Leishmania*. Carriles 1-3: Fracciones solubles (10 μ g) de *L. braziliensis*, *L. major* y *L. mexicana*, respectivamente. **A.** SDS-PAGE 10%. Proteínas visualizadas con azul Coomassie. **B.** La inmunodetección se realizó sobre membranas de nitrocelulosa empleando los anticuerpos anti His-LbNMNAT (1:3000). El revelado de las membranas se realizó empleando Luminol. M, marcador de peso molecular en kDa. Las flechas azules indican productos de degradación o reconocimientos inespecíficos.

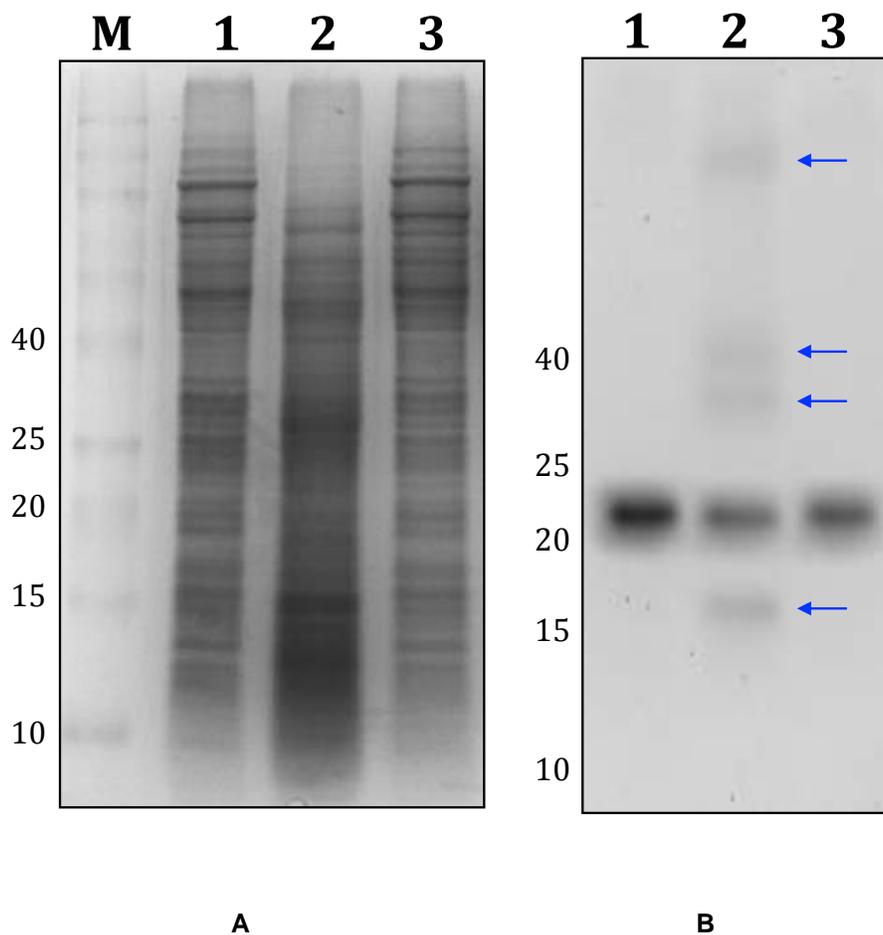
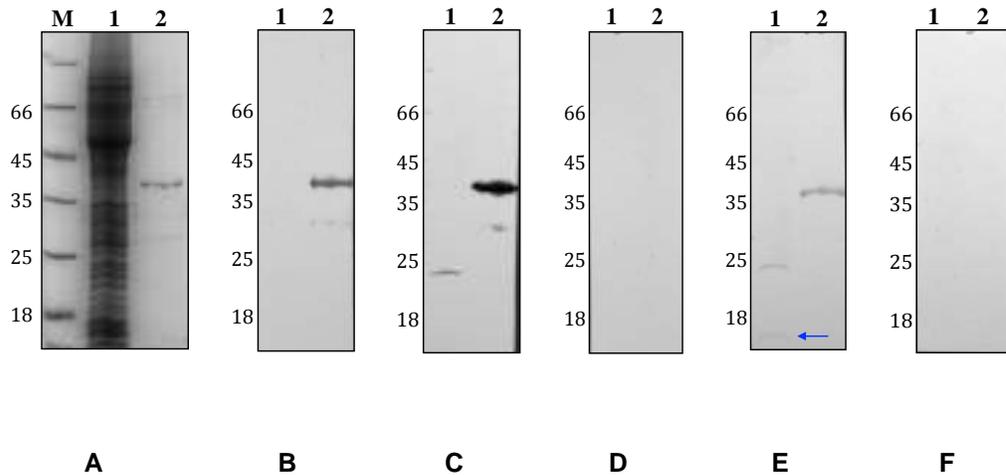


Figura 6-29: Ensayos de inmunodetección utilizando diferentes anticuerpos sobre extractos totales de promastigotes de *L. braziliensis*. Carriles 1 y 2: *Extracto total SDS* (2×10^7 parásitos) y proteína His-LbNMNAT (1 μ g), respectivamente. **A.** SDS-PAGE 12%. Proteínas visualizadas con azul Coomassie. Las inmunodetecciones se realizaron sobre membranas PVDF empleando los siguientes anticuerpos: **B.** Anti-6xHis (1:4000). **C.** Anti His-LbNMNAT de ratón (1:2000). **D.** Suero no relacionado de ratón (1:1000). **E.** Anti His-

LbNMNAT de ave (1:500). **F.** Suero no relacionado de ave (1:50). Sistema de revelado con peroxidasa. M, marcador de peso molecular en kDa. La flecha azul indica un producto de degradación o un reconocimiento inespecífico.



Finalmente, se separaron extractos solubles de promastigotes de *L. braziliensis* mediante electroforesis bidimensional (2DE), realizando tinciones con nitrato de plata y reconocimientos paralelos mediante Western blot con los anticuerpos anti His-LbNMNAT de ratón. Esta nueva estrategia electroforética permitió reconocer, una vez más, la señal de ~ 22 kDa y brindó información sobre el pI de la misma, que se ubicó hacia la zona de valores de pH ácidos (Figura 6-31).

Figura 6-30: Detección de la proteína “LbNMNAT” empleando anticuerpos anti His-TcNMNAT. Carriles 1-3: *Fracción soluble* (~20-40 μ g), proteínas His-LbNMNAT (37 kDa, 200 ng) e His-TcNMNAT (36 kDa, 200 ng), respectivamente. **A.** SDS-PAGE 12%. Proteínas visualizadas con azul Coomassie. Las inmunodetecciones se realizaron sobre

membranas PVDF empleando los siguientes anticuerpos: **B.** Anti His-LbNMNAT (1:2000). **C.** Anti His-TcNMNAT (1:2000). **D.** Suero no relacionado (1:2000). Sistema de revelado con fosfatasa alcalina. M, marcador de peso molecular en kDa.

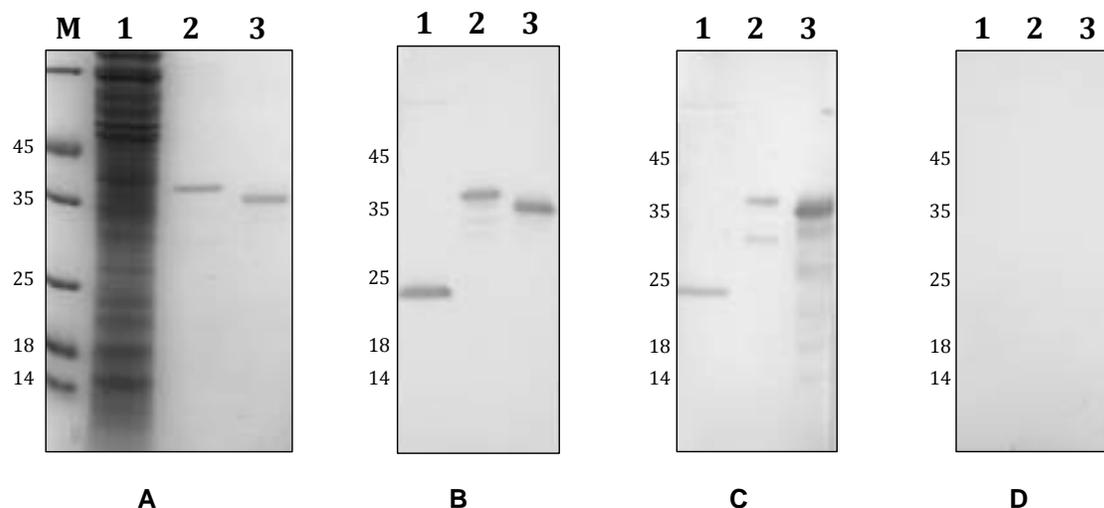
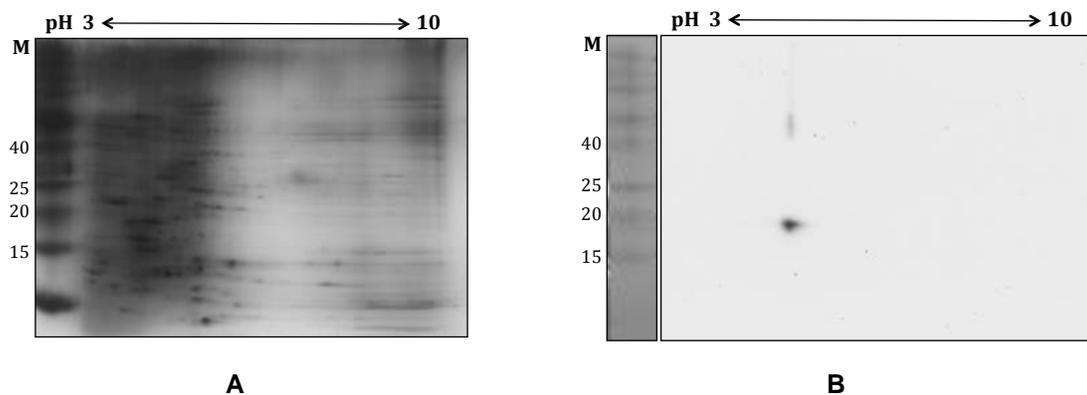


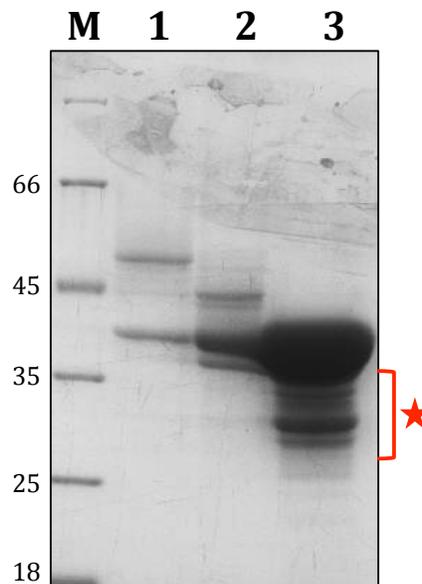
Figura 6-31: Evaluación del extracto soluble de proteínas de promastigotes de *L. braziliensis* mediante electroforesis 2D y Western blot. Aproximadamente 30 μ g del extracto soluble de proteínas de *L. braziliensis* se separaron mediante punto isoeléctrico en un gradiente no lineal de pH (3-10) y SDS-PAGE 12%. **A.** Proteínas visualizadas con nitrato de plata. **B.** Detección paralela mediante Western blot con los anticuerpos anti His-LbNMNAT sobre membranas de nitrocelulosa. Sistema de revelado con Luminol. M, marcador preteñido de peso molecular en kDa.



En vista de los resultados de inmunodetección de una señal persistente de \sim 22 kDa, se realizó un ensayo adicional: la generación de un nuevo anticuerpo anti His-LbNMNAT en ratones. En esta ocasión, se utilizó como antígeno la proteína His-LbNMNAT proveniente

de procesos de solubilización de CI y purificación desde SDS-PAGE preparativo (Figura 6-32). En términos generales, se empleó un antígeno más puro en comparación con el antígeno empleado para la generación de los anticuerpos anti His-LbNMNAT iniciales (Figura 6-22).

Figura 6-32: Aislamiento del antígeno His-LbNMNAT a partir de CI y SDS-PAGE preparativo. La fracción insoluble resultante del aislamiento, solubilización y diálisis de los CI de la proteína recombinante His-LbNMNAT se separó mediante SDS-PAGE preparativo. Desde este gel se cortaron 3 bandas alrededor del tamaño molecular de la proteína His-LbNMNAT, las cuales se utilizaron para eluir las proteínas que contenían. Los eluidos obtenidos de las 3 bandas (carriles 1-3) se analizaron mediante SDS-PAGE 10%. La estrella roja indica productos de degradación de la proteína His-LbNMNAT en los eluidos provenientes de la banda 3. Esta última muestra se empleó para la inoculación de nuevos ratones BALB/C. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa. a purificación de este nuevo antígeno se realizó como parte de las actividades de entrenamiento en el Laboratorio, del estudiante de maestría Andrés Herrera.

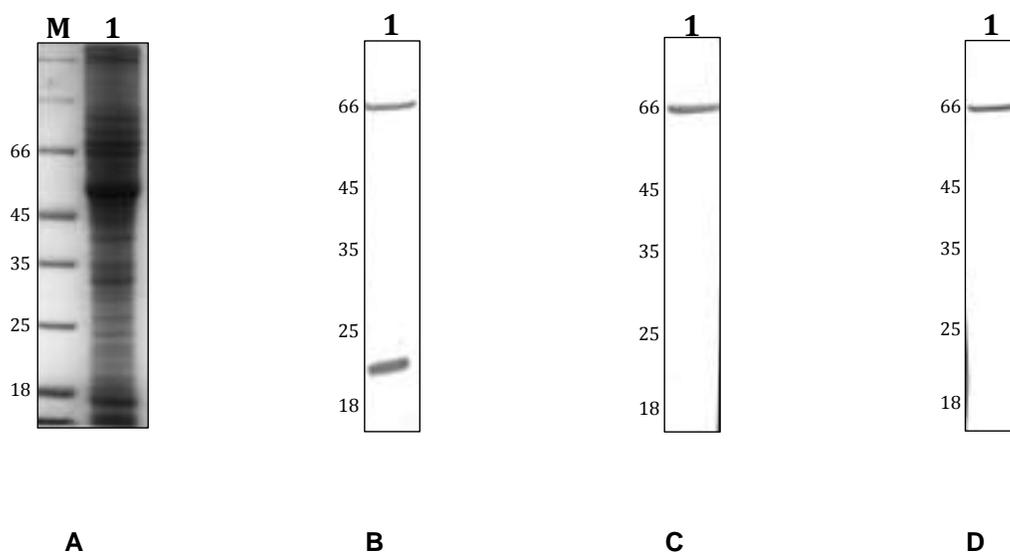


El nuevo anticuerpo generado se purificó mediante métodos de afinidad [110] empleando la proteína His-LbNMNAT inmovilizada en membranas de nitrocelulosa. El anticuerpo purificado se utilizó para realizar ensayos de Western blot sobre *Extractos totales SDS* de

promastigotes de *L. braziliensis*, en los cuales se detectó la señal de ~ 22 kDa, tal como se observó con los anticuerpos anti His-LbNMNAT iniciales. Adicionalmente, se detectó una banda inespecífica de 66 kDa en este nuevo experimento (Figura 6-33). Atribuimos esta inespecificidad al sistema de revelado, dado que el análisis de una membrana control en la que se empleó únicamente anticuerpo secundario, generó la misma señal.

En conjunto y de manera recurrente, los experimentos de inmunodetección mediante Western blot, revelaron una banda de menor peso molecular al esperado (~ 22 vs 33,7 kDa) no solo en diferentes tipos de extractos proteicos, sino en distintas especies de *Leishmania*, empleando diversos anticuerpos dirigidos contra la proteína NMNAT.

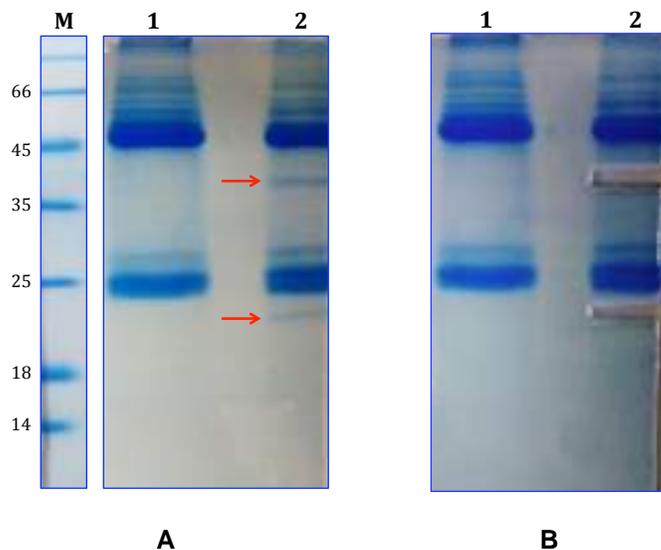
Figura 6-33: Detección de la proteína “LbNMNAT” empleando los nuevos anticuerpos anti His-LbNMNAT. Carril 1: *Extracto total SDS* (2×10^7 parásitos) de promastigotes de *L. braziliensis*. **A.** SDS-PAGE 12%. Proteínas visualizadas con azul Coomassie. Las inmunodetecciones se realizaron sobre membranas PVDF empleando los siguientes anticuerpos: **B.** Anti His-LbNMNAT nuevos (1:4000). **C.** Suero no relacionado (1:1000). **D.** Sin anticuerpo primario. Este último ensayo indica que la proteína de 66 kDa corresponde a un producto inespecífico detectado por el anticuerpo secundario anti ratón biotinilado. Sistema de revelado con fosfatasa alcalina. M, marcador de peso molecular en kDa.



6.5.3. Ensayos de inmunoprecipitación de la banda de 22 kDa y análisis por espectrometría de masas (MS)

Con el ánimo de confirmar definitivamente la identidad de la señal de ~ 22 kDa, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando los nuevos anticuerpos anti His-LbNMNAT. La estandarización de este experimento permitió la inmunoprecipitación de bandas de ~ 22 y 37 kDa (Figura 6-34). Esta última banda corresponde, probablemente, a la proteína His-LbNMNAT empleada para la purificación del nuevo anticuerpo anti His-LbNMNAT que es eluida desde la membrana de nitrocelulosa junto con el anticuerpo de interés. Ambas bandas se extrajeron desde el SDS-PAGE y se enviaron para análisis mediante MALDI-TOF MS/MS. Actualmente, dicho estudio está en curso y de ser posible, los resultados generados se describirán en la sustentación oral del presente trabajo de investigación.

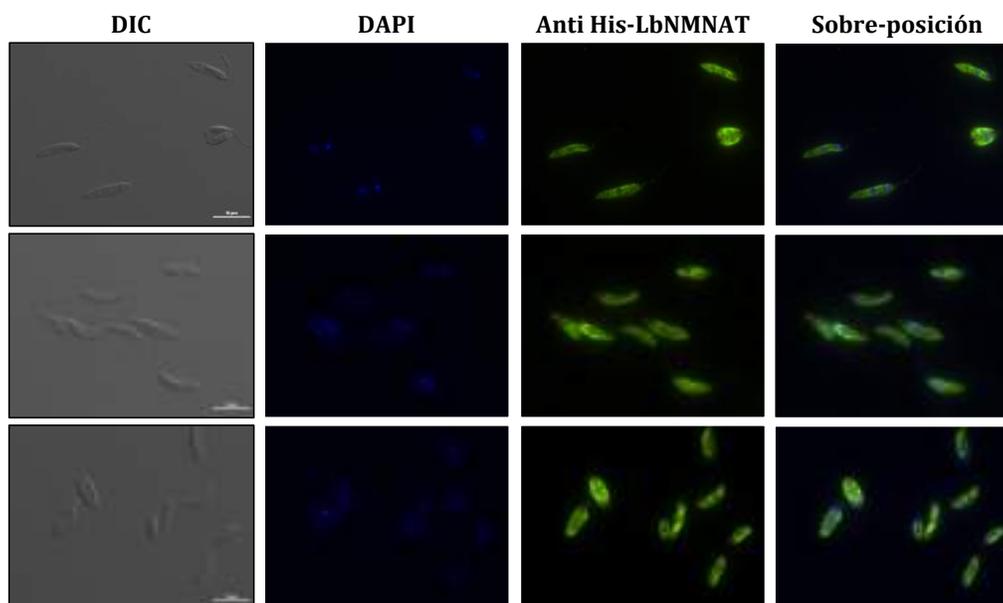
Figura 6-34: Inmuno-precipitación de la proteína “LbNMNAT” empleando los nuevos anticuerpos anti His-LbNMNAT. Carriles 1 y 2: inmuno-precipitados realizados con el suero no relacionado y el nuevo anticuerpo anti His-LbNMNAT, respectivamente. **A.** SDS-PAGE 15%. Las flechas rojas indican las dos bandas (37 y 22 kDa) que se enviaron para análisis de MS. **B.** SDS-PAGE 15% después de la extracción de las bandas de interés. Proteínas visualizadas con azul Coomassie coloidal (G-250). M, marcador de peso molecular en kDa.



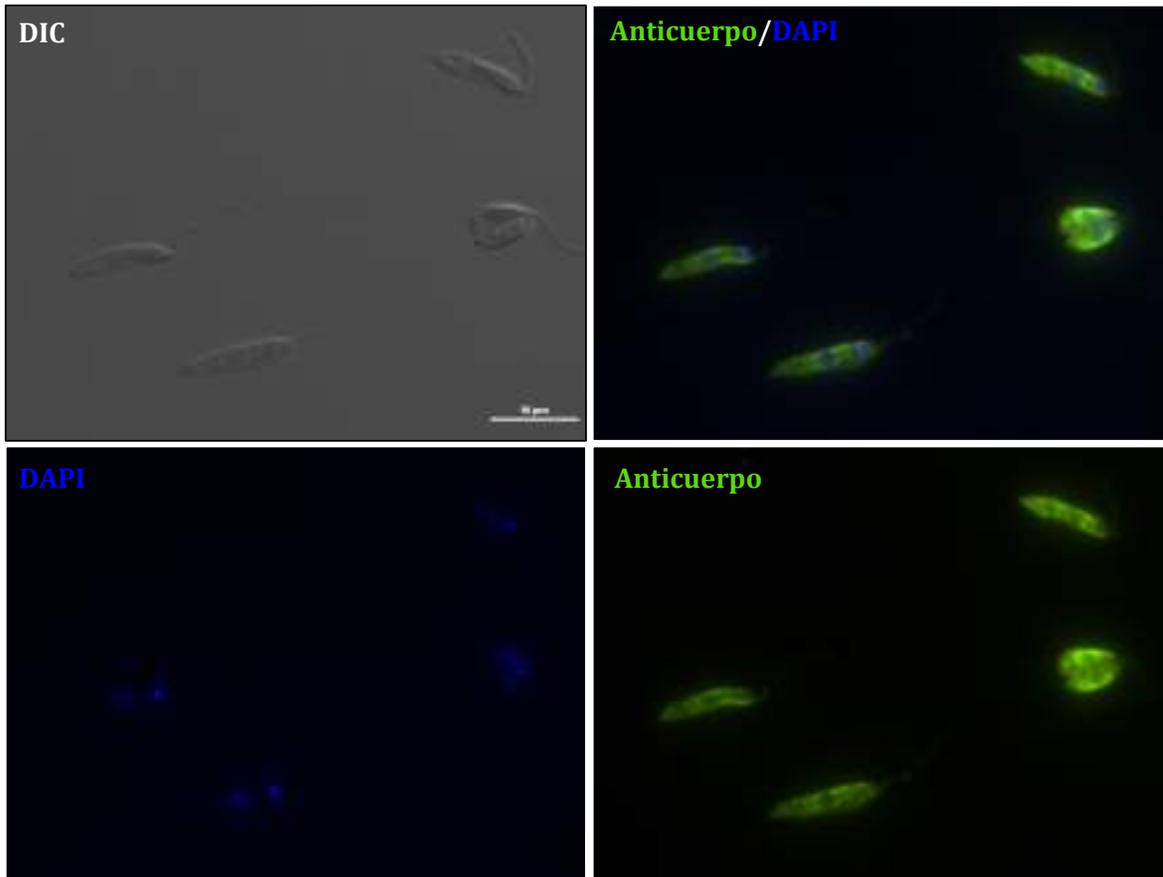
6.5.4. Inmunodetección de la proteína “LbNMNAT” mediante inmunofluorescencia

La localización subcelular de la proteína “LbNMNAT” se estudió mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos anti His-LbNMNAT iniciales y el anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 488, sobre promastigotes de *L. braziliensis*. Este ensayo reveló un patrón de localización citosólica de la proteína “LbNMNAT”. Evidentemente, dicha proteína exhibe una localización extra-nuclear y algunas zonas del citoplasma presentan una fluorescencia más intensa que otras, indicando la acumulación de la proteína “LbNMNAT” en sitios particulares del citoplasma (Figura 6-35). Ninguna señal se detectó con los anticuerpos no relacionados (Figura 6-36).

Figura 6-35: Localización subcelular de la proteína LbNMNAT en promastigotes de *L. braziliensis*. **A.** Para la detección de la proteína LbNMNAT se emplearon los anticuerpos anti His-LbNMNAT (1:1000) y el anticuerpo secundario anti ratón conjugado a Alexa 488 (1:1000). Se muestran tres campos ópticos diferentes. DAPI indica la localización del ADN en el núcleo y la mitocondria (cinetoplasto). Imágenes DIC, escala= 10 μm . **B.** Campo ampliado de muestras tratadas con los anticuerpos anti His-LbNMNAT (1:1000). Las imágenes se obtuvieron empleando el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1.

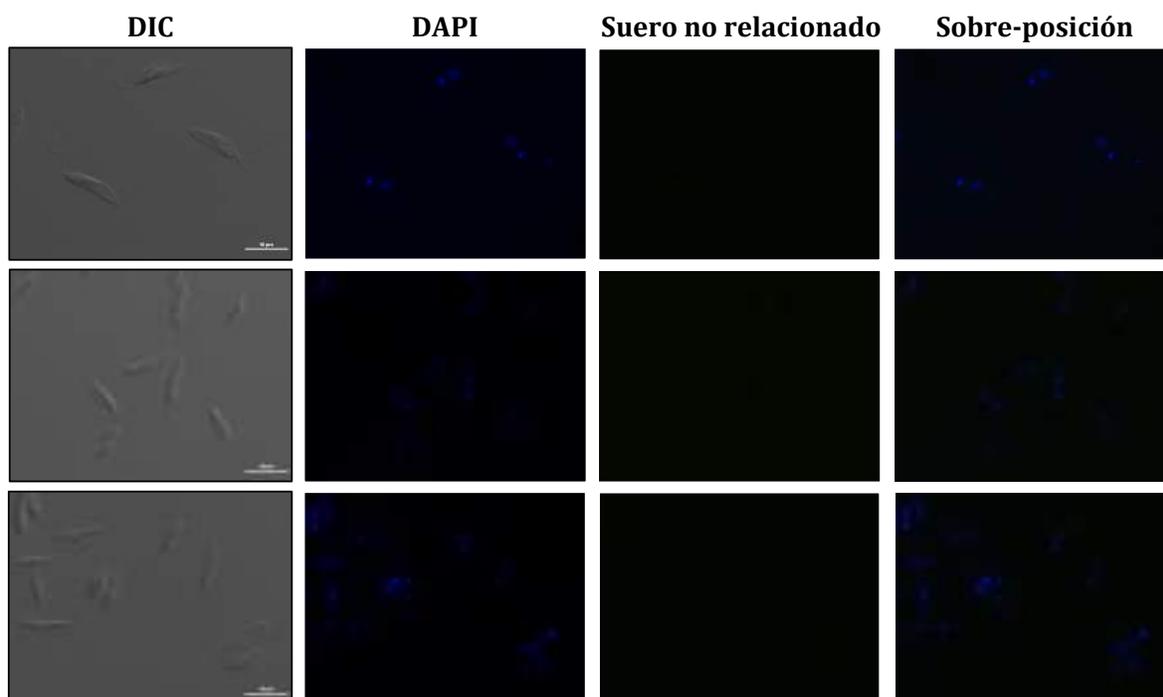


A

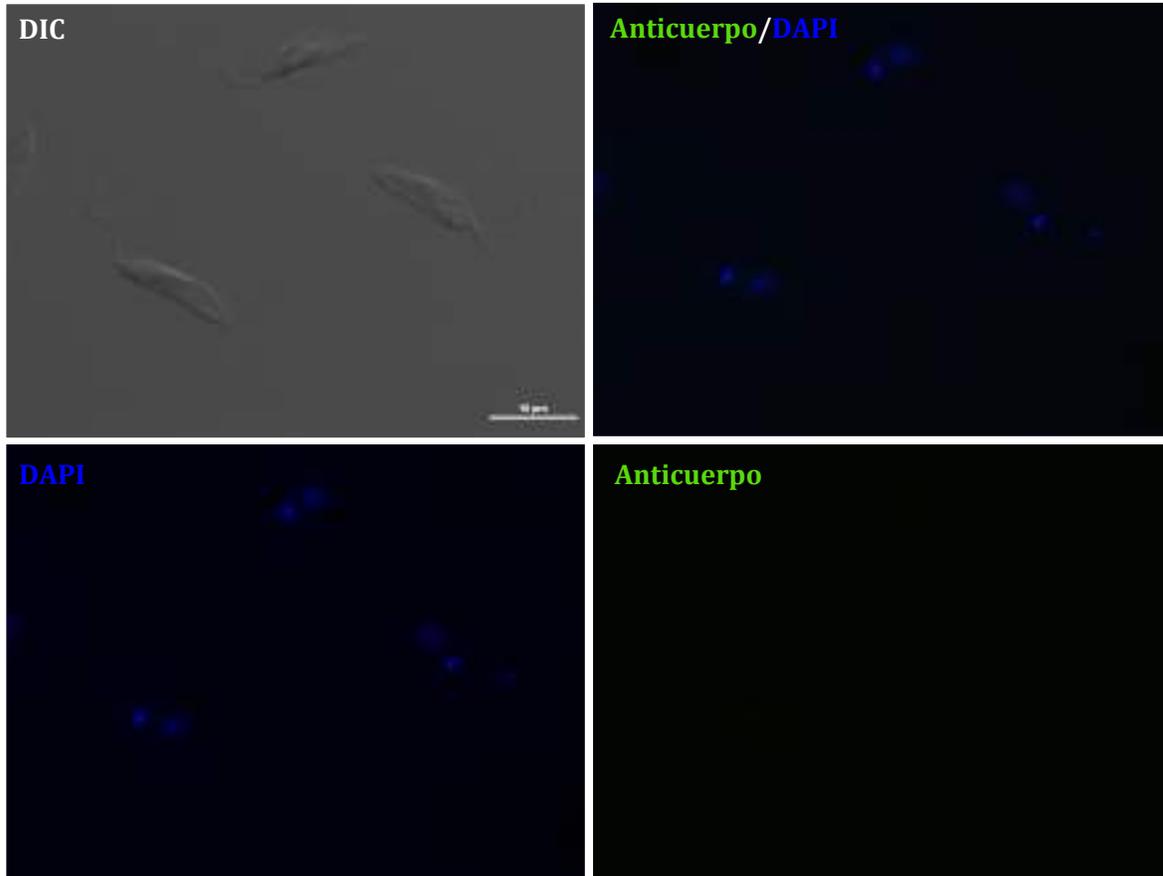


B

Figura 6-36: Ensayo de inmunofluorescencia sobre promastigotes de *L. braziliensis* empleando el suero no relacionado. **A.** Inmunodetección realizada con el suero no relacionado (1:1000) y el anticuerpo secundario anti ratón conjugado a Alexa 488 (1:1000). Se muestran tres campos ópticos diferentes. DAPI indica la localización del ADN en el núcleo y la mitocondria (cinetoplasto). Imágenes DIC, escala= 10 μm . **B.** Campo ampliado de muestras tratadas con el suero no relacionado (1:1000). Las imágenes se obtuvieron empleando el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1.



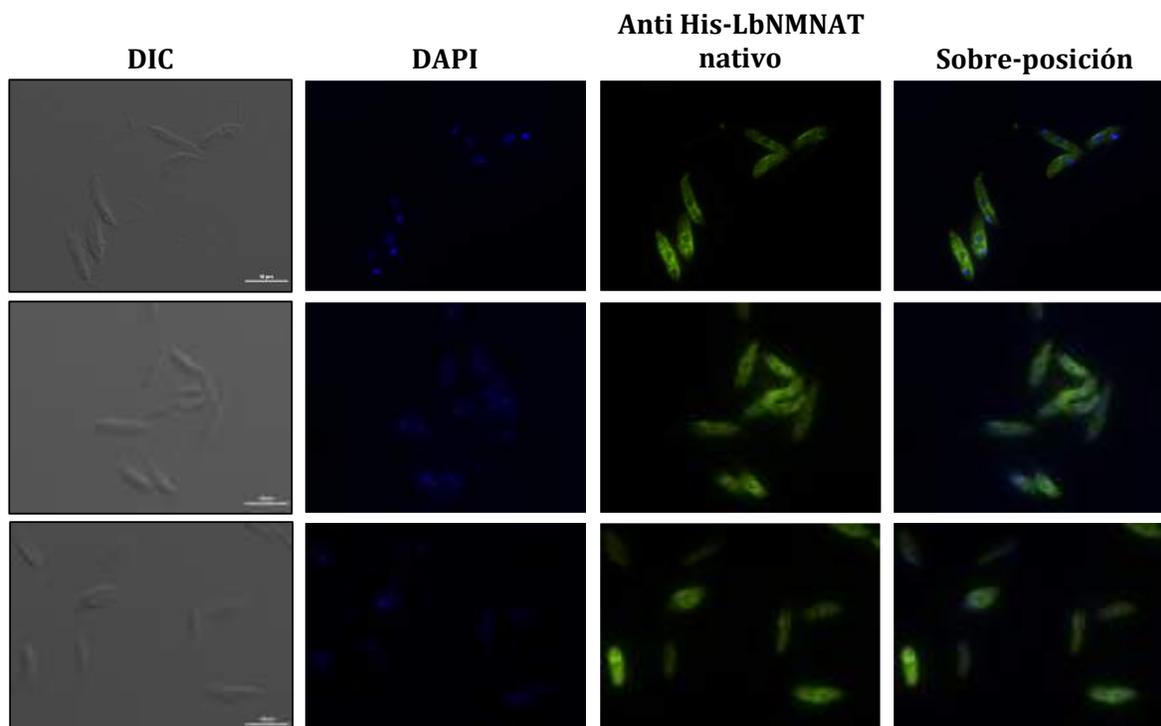
A

**B**

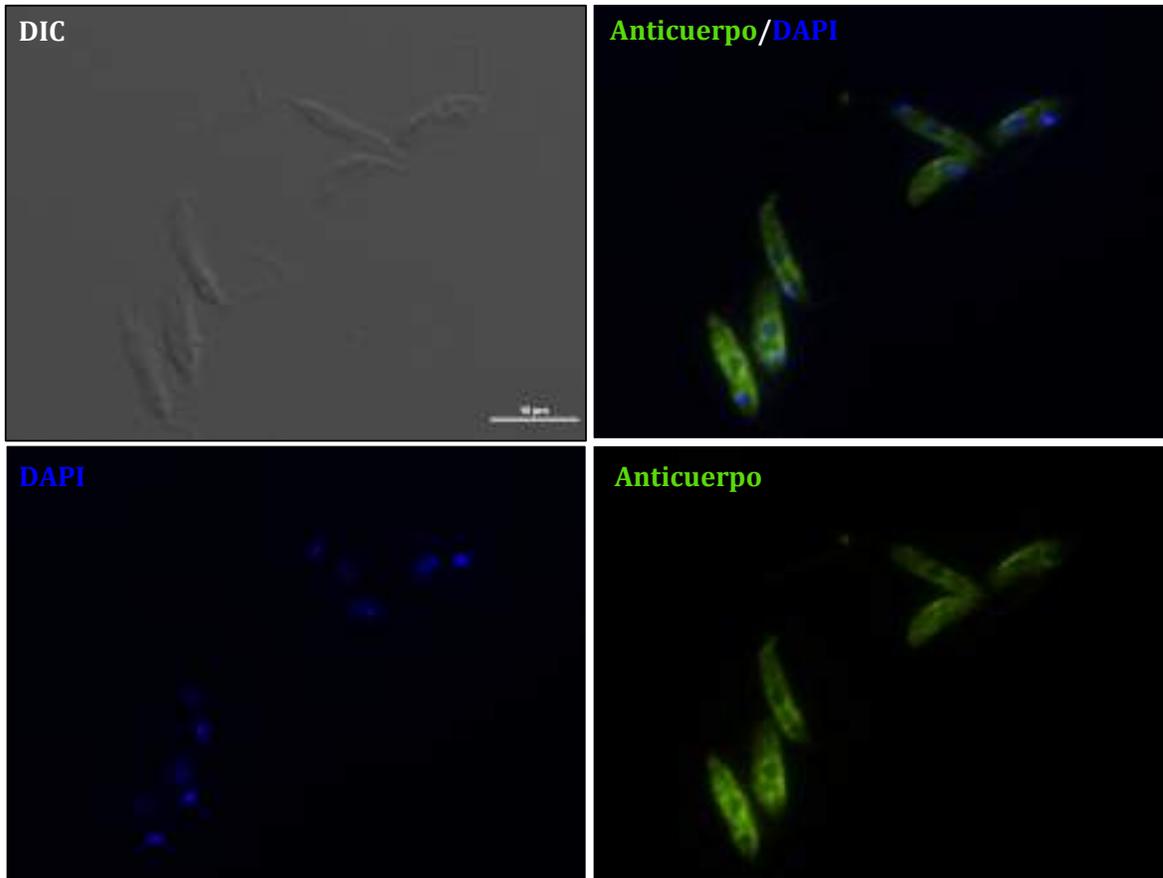
Como se describió con anterioridad, en el presente estudio se produjeron dos tipos de anticuerpos anti His-LbNMNAT. La diferencia entre estos anticuerpos radica en el procesamiento del antígeno empleado para inocular los ratones. Inicialmente, se inoculó la proteína His-LbNMNAT proveniente de CI. Luego, la misma proteína se aisló no sólo desde CI sino desde SDS-PAGE preparativo, lo cual generó un antígeno aún más puro. En ambos casos, la proteína inoculada se encontraba desnaturalizada. Teniendo en cuenta que en los ensayos de inmunofluorescencia se aplica un paso de fijación con paraformaldehído, el cual conserva la estructura molecular de las componentes proteicos celulares, se generó un anticuerpo adicional. Específicamente, se inocularon ratones con la proteína His-LbNMNAT nativa y purificada de manera parcial mediante el protocolo IMAC (Figura 6-5 A).

La implementación de este nuevo anticuerpo (denominado “*anti His-LbNMNAT nativo*”) en ensayos de Western blot sobre extractos de proteínas del parásito, no reveló señal alguna (datos no mostrados). No obstante, al utilizar este anticuerpo en ensayos de inmunofluorescencia indirecta sobre promastigotes de *L. braziliensis*, se observó el mismo patrón de localización citosólica detectado por el anticuerpo anti His-LbNMNAT inicial (Figura 6-37). Este resultado sugiere que los anticuerpos anti His-LbNMNAT nativos reconocen epítopes estructurales presentes en la proteína “LbNMNAT” fijada en el ensayo de inmunofluorescencia, los cuales se desnaturalizan en el ensayo de Western blot.

Figura 6-37: Localización subcelular de la proteína LbNMNAT en promastigotes de *L. braziliensis* empleando los anticuerpos anti His-LbNMNAT nativos. **A.** Para la detección de la proteína LbNMNAT se emplearon los anticuerpos anti His-LbNMNAT nativos (1:250) y el anticuerpo secundario anti ratón conjugado a Alexa 488 (1:1000). Se muestran tres campos ópticos diferentes. DAPI indica la localización del ADN en el núcleo y la mitocondria (cinetoplasto). Imágenes DIC, escala= 10 μ m. **B.** Campo ampliado de muestras tratadas con los anticuerpos anti His-LbNMNAT nativos (1:250). Las imágenes se obtuvieron empleando el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1.

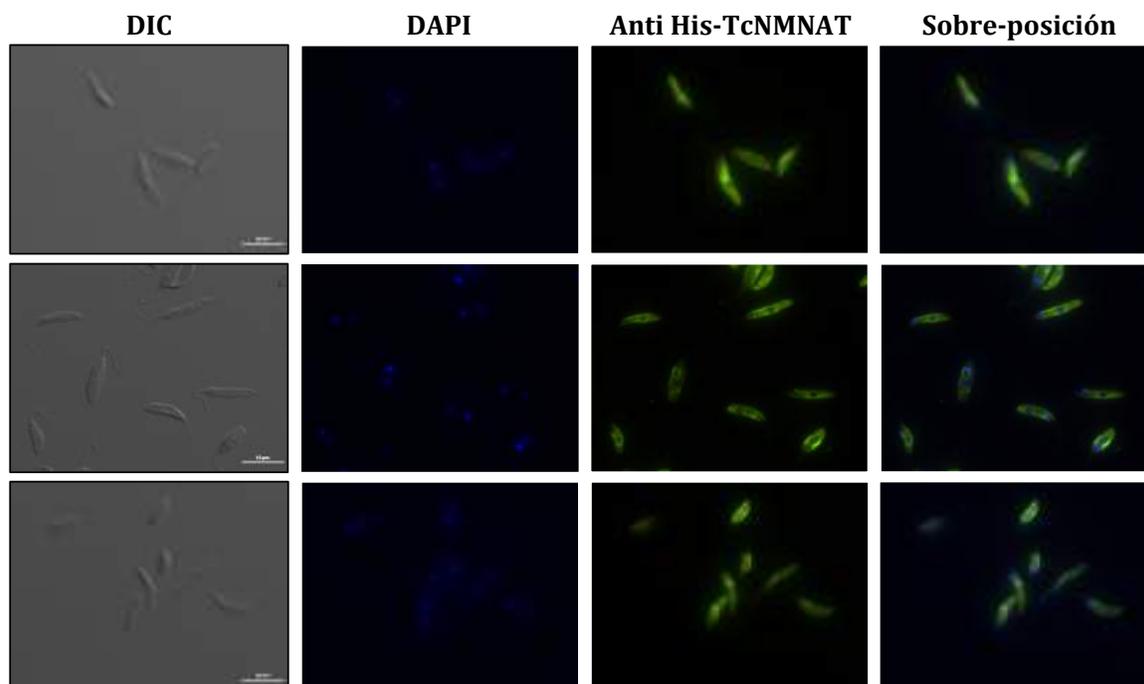


A

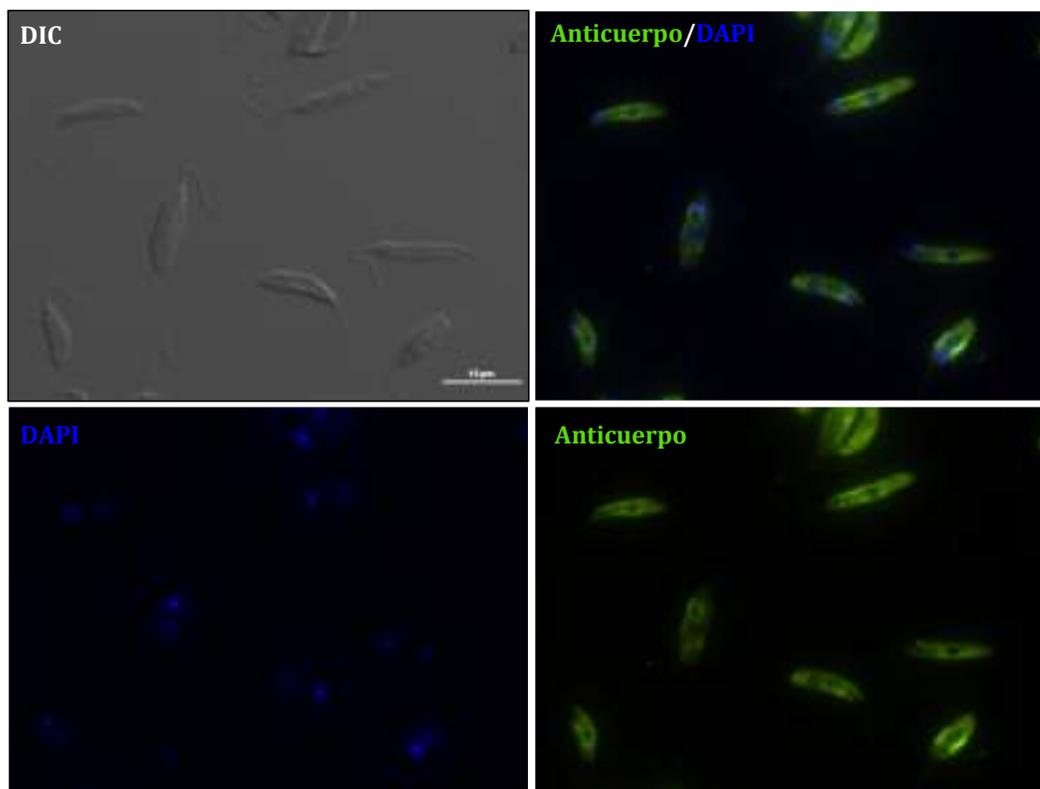
**B**

Por otra parte, los anticuerpos policlonales anti His-TcNMNAT, que detectaron la proteína “LbNMNAT” en ensayos de Western blot, confirmaron la localización citosólica de la proteína bajo estudio (Figura 6-38).

Figura 6-38: Localización subcelular de la proteína LbNMNAT en promastigotes de *L. braziliensis* empleando los anticuerpos anti His-TcNMNAT. **A.** Para la detección de la proteína LbNMNAT se emplearon los anticuerpos anti His-TcNMNAT (1:250) y el anticuerpo secundario anti ratón conjugado a Alexa 488 (1:1000). Se muestran tres campos ópticos diferentes. DAPI indica la localización del ADN en el núcleo y la mitocondria (cinetoplasto). Imágenes DIC, escala= 10 μm . **B.** Campo ampliado de muestras tratadas con los anticuerpos anti His-TcNMNAT nativos (1:250). Las imágenes se obtuvieron empleando el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1.



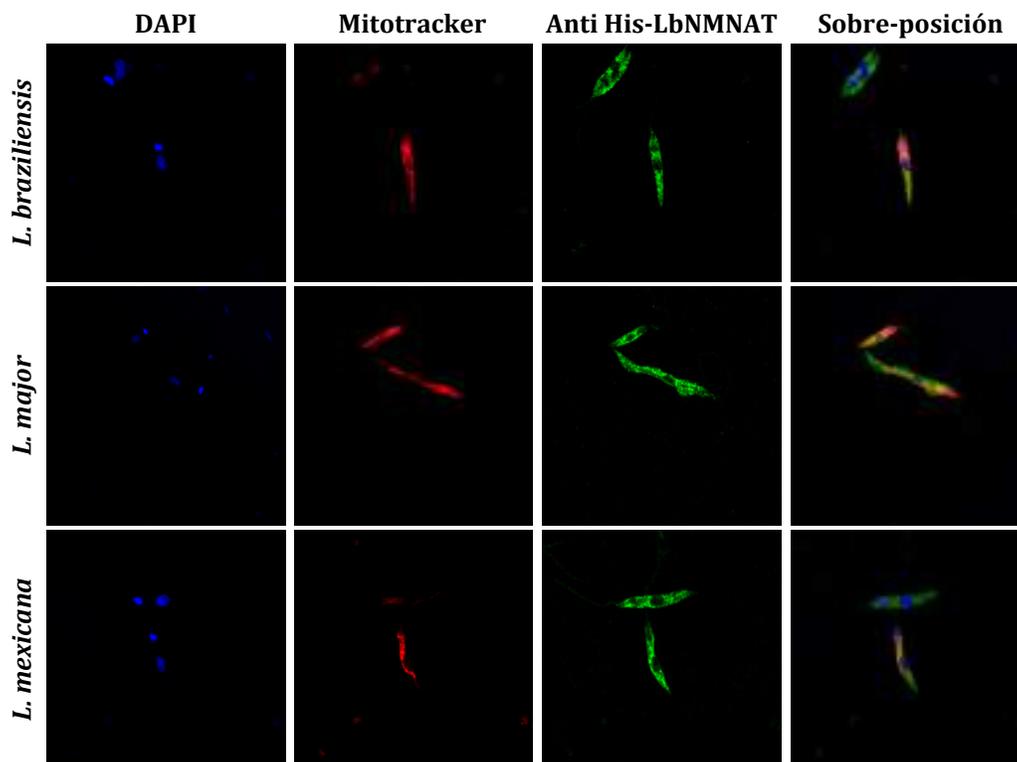
A



B

Como se indicó en la Tabla 6-8, las tres herramientas bioinformáticas utilizadas para predecir la localización subcelular de la proteína LbNMNAT, sugirieron una localización mitocondrial de la misma. Para confirmar estas observaciones computacionales, se realizaron estudios de co-localización empleando la sonda mitocondrial Mitotracker. Dichos estudios no revelaron sobrelapamiento entre la proteína “NMNAT” y la mitocondria en diferentes especies del parásito (Figura 6-39). En resumen, la estrategia experimental implementada para determinar la localización subcelular de la proteína LbNMNAT endógena, reveló una localización citosólica de la proteína bajo estudio en la fase móvil del parásito.

Figura 6-39: Localización subcelular de la proteína LbNMNAT en promastigotes de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo. Para la detección de la proteína LbNMNAT se emplearon los anticuerpos anti His-LbNMNAT (1:1000) y el anticuerpo secundario anti ratón conjugado a Cy2 (1:1000). DAPI indica la localización del ADN en el núcleo y la mitocondria (cinetoplasto). Mitotracker indica la disposición de la mitocondria de los parásitos. Las imágenes se obtuvieron empleando el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1.

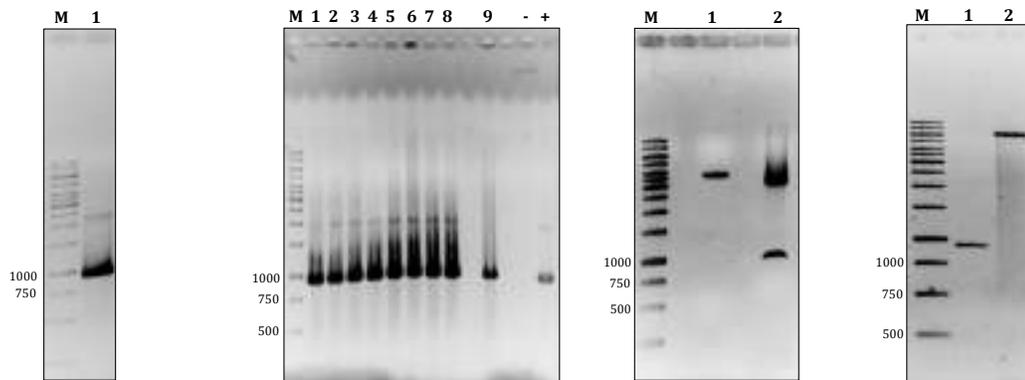


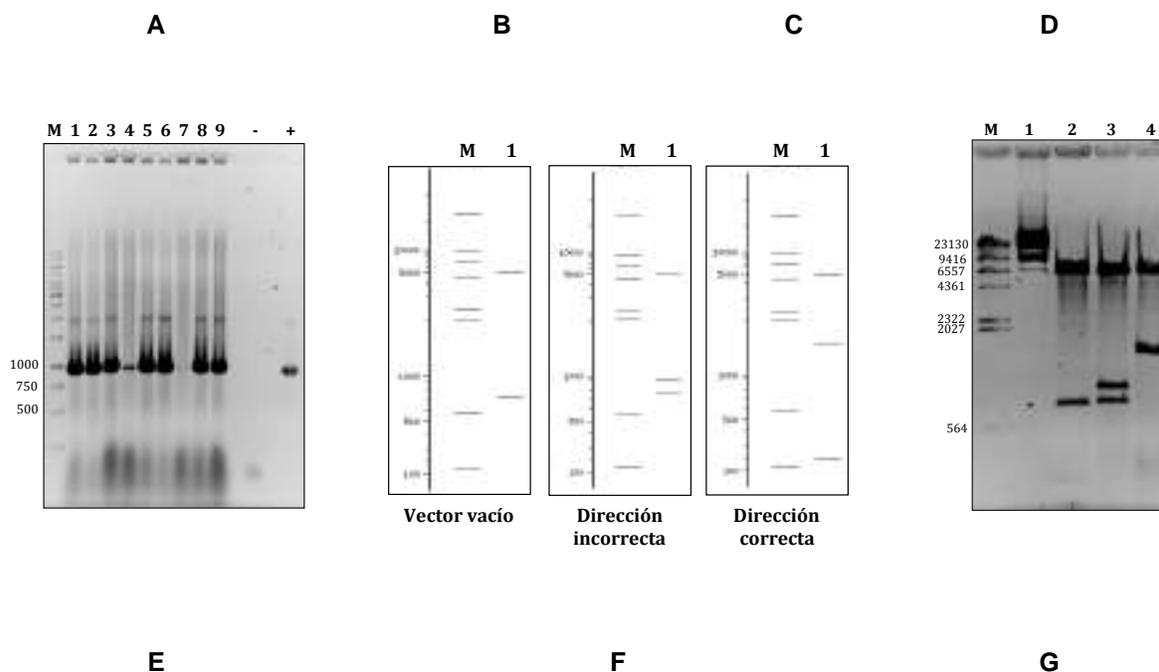
6.5.5. Detección de la proteína recombinante LbNMNAT-GFP en promastigotes

Para confirmar la localización subcelular de la proteína LbNMNAT en el parásito, se realizó la expresión del transgen *lbnmnat-gfp* en promastigotes de *L. braziliensis*. Esta aproximación experimental implicó la construcción de un plásmido recombinante para la expresión del transgen mencionado en el parásito (Figura 6-40). El plásmido construido, denominado pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP (Anexo B), se utilizó para transfectar promastigotes de *L. braziliensis*, los cuales se seleccionaron en medios suplementados con geneticina G418.

Figura 6-40: Construcción del vector recombinante pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP. **A.** Amplificación del fragmento *lbnmnat* (936 pb) (1) mediante PCR empleando el plásmido pQE30-LbNMNAT como plantilla y los oligonucleótidos pSP72 (Tabla 5-1). El producto amplificado se purificó desde el gel y se ligó con el vector de clonación pGEMT-Easy. La reacción de ligación se empleó para transformar células *E. coli* TOP 10. Gel de agarosa 1% (P/V) tratado con bromuro de etidio (Figuras A-E y G). M, marcador de peso molecular

en pares de bases (pb) (Figuras A-G). **B.** Análisis mediante PCR de colonia (9 colonias TOP 10) (1-9). +: control positivo (vector pQE30-LbNMNAT como plantilla), -: control negativo (agua como plantilla). **C.** El plásmido recombinante pGEMT-Easy-LbNMNAT de 1 de las colonias obtenidas se extrajo mediante lisis alcalina y se sometió a ensayos de digestión con la enzima de restricción XbaI. Plásmido sin digerir (1) y digerido (2). El fragmento *lbnmnat* liberado se purificó desde el gel. **D.** Fragmento *lbnmnat* purificado (1) y plásmido pSP72 previamente digerido con la enzima de restricción XbaI (2). Estas muestras se ligaron y la reacción de ligación se empleó para transformar células *E. coli* TOP 10. **E.** Análisis mediante PCR de colonia (9 colonias TOP 10) (1-9). +: control positivo (vector pGEMT-Easy-LbNMNAT como plantilla), -: control negativo (agua como plantilla). **F.** Doble digestión teórica del plásmido recombinante pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP con las enzimas de restricción HinDIII y BamHI (1). Se muestra la digestión teórica del vector pSP72 vacío o con el inserto *lbnmnat* en la dirección incorrecta y correcta (dado que se empleó únicamente la enzima XbaI en la estrategia de clonación, el inserto puede ligarse en cualquiera de las dos posiciones posibles). Simulación generada con el programa NEBcutter V2.0 [124]. **G.** Los plásmidos recombinantes pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP de 2 de las colonias TOP 10 obtenidas se extrajeron mediante lisis alcalina y se sometieron a ensayos de doble digestión con las enzimas de restricción HinDIII y BamHI. Plásmido vacío sin digerir (1) y digerido (2). Plásmido recombinante 1 digerido (3), plásmido recombinante 2 digerido (4). Estos resultados indican que el plásmido recombinante 1 contiene el inserto en la dirección incorrecta a diferencia del plásmido recombinante 2. Este último plásmido se analizó mediante secuenciamiento y su mapa se indica en el Anexo B.



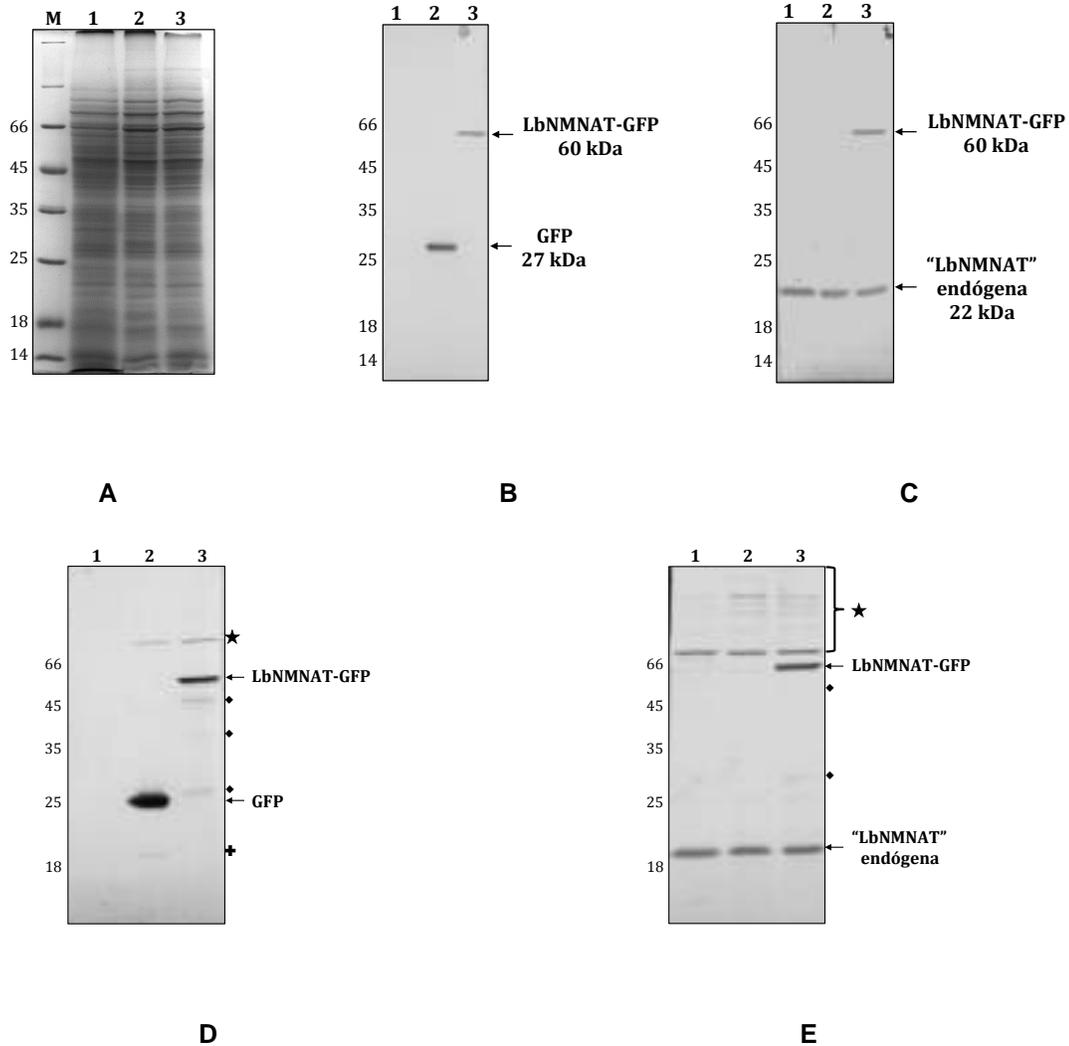


Los extractos de proteínas de los parásitos seleccionados se analizaron mediante Western blot empleando el sistema de revelado con peroxidasa. Estos análisis permitieron verificar la expresión de la proteína recombinante LbNMNAT-GFP en las líneas celulares transfectadas, debido al peso molecular de la banda detectada (60 kDa). La suma de los pesos moleculares de GFP (27 kDa) y LbNMNAT (33,7 kDa) corresponde al peso molecular de la banda observada (Figura 6-41).

Al repetir los análisis anteriores empleando un sistema de revelado más sensible (anticuerpos secundarios conjugados con biotina y estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina), se observó la banda de ~ 22 y 60 kDa en la línea celular transfectada con el vector recombinante, junto con bandas adicionales de menor peso molecular (Figura 6-41 D y E). Probablemente, estas señales proceden de la proteína recombinante LbNMNAT-GFP y GFP, que pueden ser blanco de mecanismos de procesamiento o degradación proteica.

Figura 6-41: Expresión de la proteína LbNMNAT-GFP en promastigotes de *L. braziliensis*. Carriles 1-3: *Fracción soluble* (~120 µg) de promastigotes de *L. braziliensis* no transfectados, transfectados con el vector vacío pSP72 o el vector pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP, respectivamente. **A.** SDS-PAGE 12%. Proteínas visualizadas con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa. Las muestras se transfirieron hacia membranas PVDF y se realizaron inmunodetecciones con los

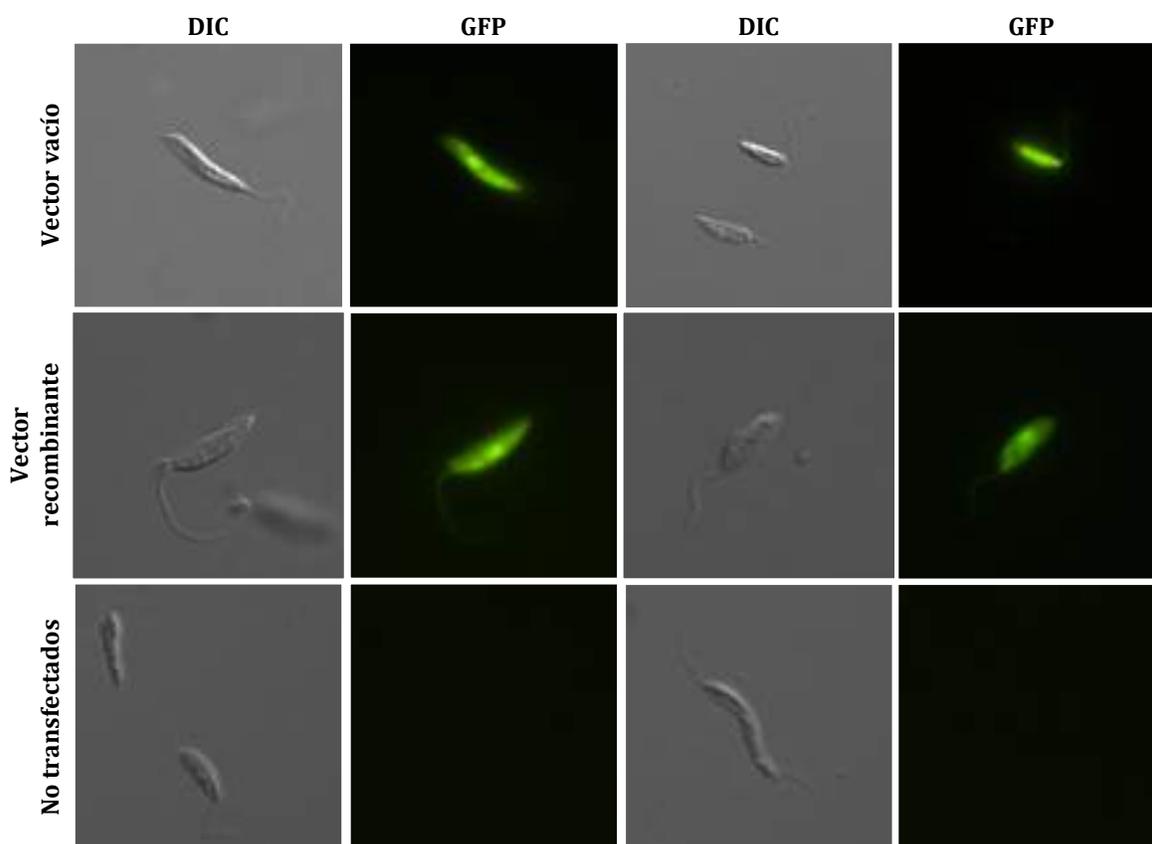
siguientes anticuerpos primarios: **B** y **D**. Anti GFP (1:1000). **C** y **E**. Anti His-LbNMNAT (1:2000). Sistema de revelado con peroxidasa: **B** y **C**. Sistema de revelado con fosfatasa alcalina: **D** y **E**. Los rombos (♦) y la cruz (+) indican posibles productos de procesamiento o degradación de la proteína recombinante LbNMNAT-GFP y GFP, respectivamente. La estrella (★) indica reconocimientos inespecíficos debidos al sistema de detección empleado.

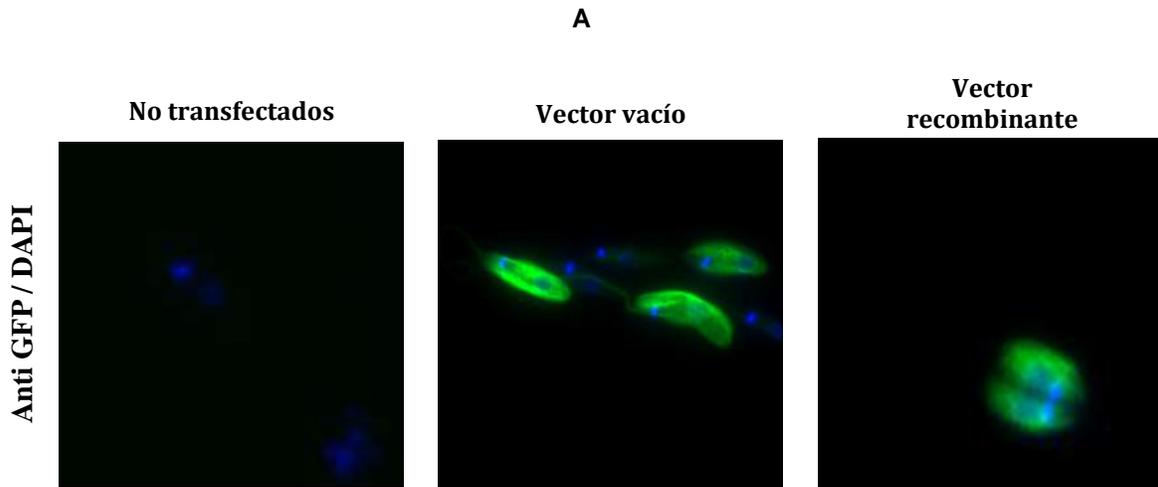


En términos de localización subcelular, la observación directa de la fluorescencia de la proteína recombinante LbNMNAT-GFP en los parásitos transfectados, indicó el mismo patrón de localización citosólico observado para la proteína endógena LbNMNAT (Figura 6-42 A). Sin embargo, la zona correspondiente al núcleo no se distingue con facilidad. Este resultado se debe, posiblemente, a la expresión constitutiva de la proteína recombinante LbNMNAT-GFP desde el vector recombinante empleado.

De manera adicional, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta empleando anticuerpos anti-GFP sobre promastigotes transfectados. Estos ensayos generaron resultados consistentes: una localización citosólica para la proteína LbNMNAT-GFP y una acumulación local de la misma en sitios particulares del citoplasma (Figura 6-42 B).

Figura 6-42: Localización subcelular de la proteína LbNMNAT-GFP en promastigotes de *L. braziliensis*. **A.** La localización de la proteína LbNMNAT-GFP se visualizó observando directamente la fluorescencia de GFP en las distintas líneas celulares. Se muestran dos campos ópticos diferentes por cada línea celular. **B.** Adicionalmente, se realizó inmunofluorescencia indirecta empleando el anticuerpo primario anti GFP (1:250) y el anticuerpo secundario anti conejo conjugado a Alexa 488 (1:1000). DAPI indica la localización del ADN en el núcleo y la mitocondria (cinetoplasto). Las imágenes se obtuvieron empleando el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1.





B

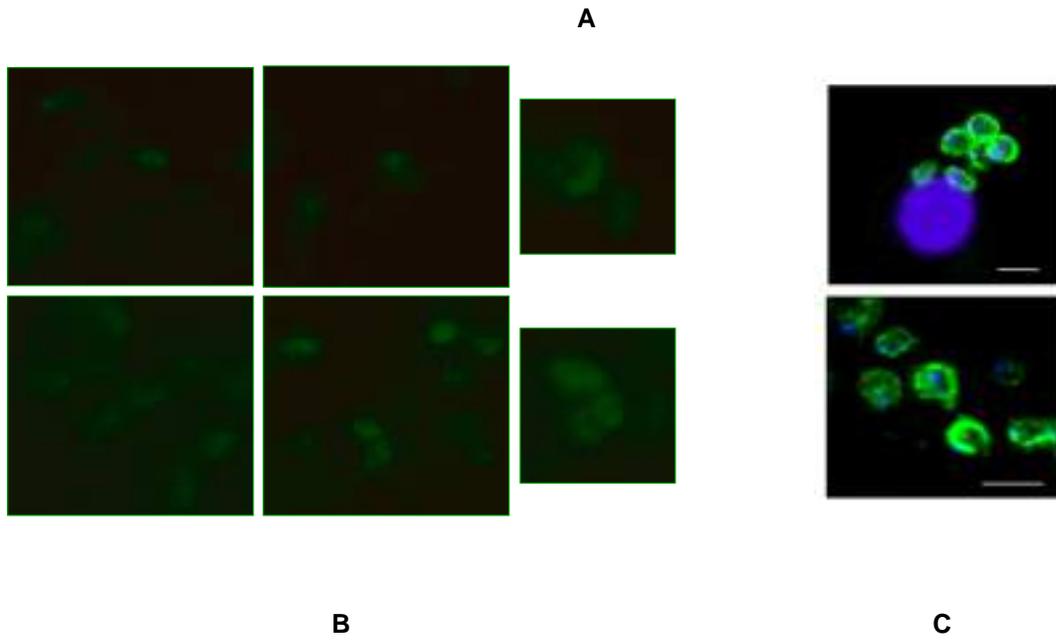
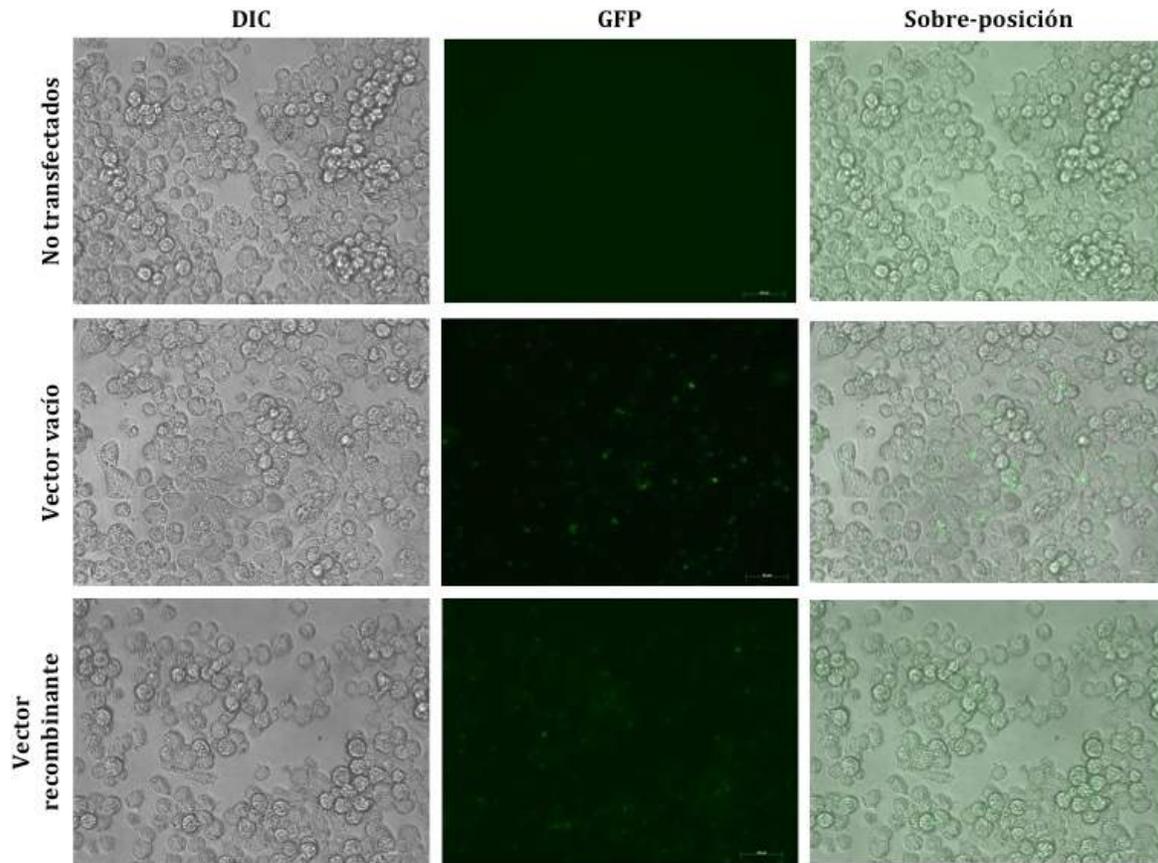
6.5.6. Detección de la proteína recombinante LbNMNAT-GFP en amastigotes

Con el propósito de realizar una aproximación al estudio de la localización subcelular de la proteína LbNMNAT en amastigotes del parásito, se establecieron ensayos de infección *in vitro* de macrófagos murinos (J774) con promastigotes transfectados. La observación directa de la fluorescencia de la proteína recombinante LbNMNAT-GFP en los cultivos celulares indicó lo siguiente:

1. La infección efectiva de los macrófagos debido a que los parásitos se encontraban al interior de los mismos (Figura 6-43 A).
2. La diferenciación morfológica de los parásitos dado que presentaban la morfología típica, redondeada y de flagelo retraído, de amastigotes (Figura 6-43 B).
3. Probablemente, un patrón de localización citosólico de la proteína endógena LbNMNAT, tal como se observó en los promastigotes (Figura 6-43 B).

Tomados en conjunto, los resultados de expresión de la proteína recombinante LbNMNAT-GFP en el parásito, indicaron una localización citosólica de la misma en la fase móvil e intracelular de *L. braziliensis*.

Figura 6-43: Localización subcelular de la proteína LbNMNAT-GFP en amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*. **A.** Se establecieron ensayos de infección *in vitro* de macrófagos murinos con promastigotes de *L. braziliensis*. Se utilizaron parásitos sin transfectar y transfectados con el vector pSP72 vacío o el vector recombinante pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP. La localización de la proteína LbNMNAT-GFP se visualizó observando la fluorescencia directa de GFP en las distintas líneas celulares a las 30 horas post-infección. **B.** Se muestran diferentes campos ampliados de la infección realizada con los parásitos que expresan la proteína LbNMNAT-GFP. Las imágenes se obtuvieron empleando el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus. **C.** Se indica el patrón de localización de proteínas extra-nucleares en amastigotes intracelulares (panel superior) o axénicos (panel inferior) de *L. mexicana*. La ausencia de fluorescencia en el centro de la célula se relaciona con la posición del núcleo. Imagen tomada de [141].



6.6. Efecto deletional de inserciones exclusivas de la proteína LbNMNAT.

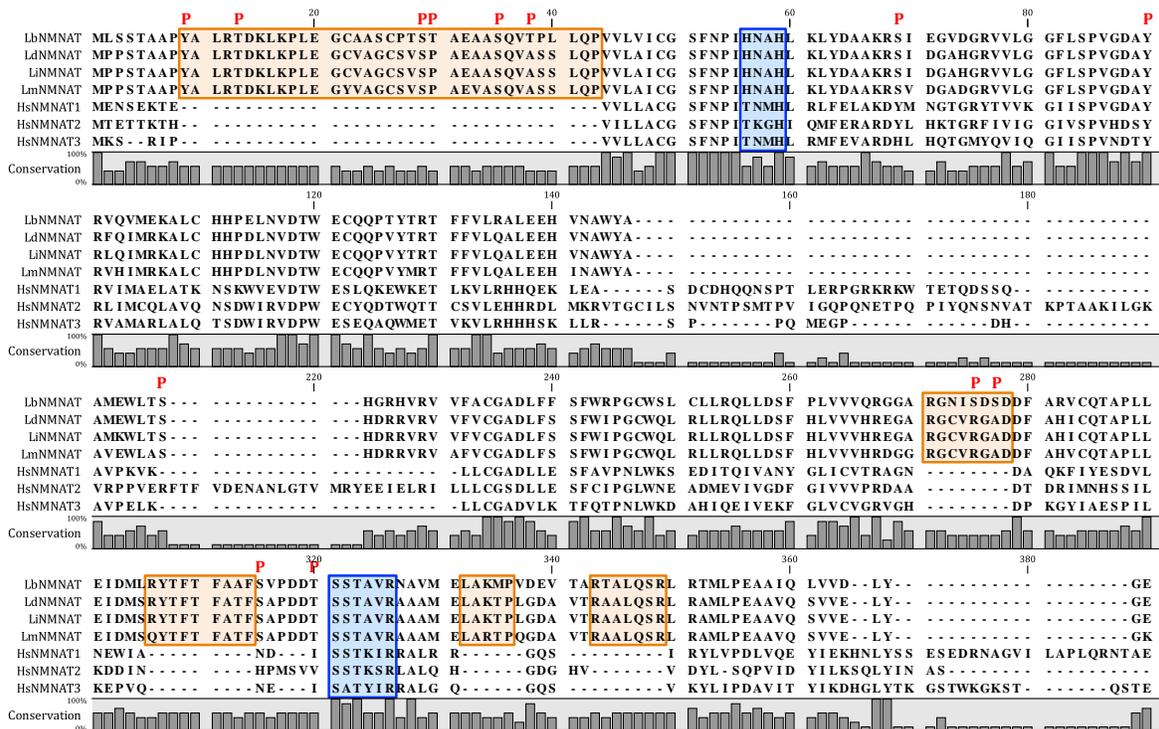
Con el propósito de identificar dominios exclusivos en la proteína LbNMNAT, se analizó su estructura primaria mediante un alineamiento múltiple generado con los ORFs de las NMNATs hipotéticas de diferentes especies de *Leishmania* y de las iso-enzimas humanas (Figura 6-44).

El análisis de este alineamiento múltiple confirmó la presencia de los motivos conservados de unión a ATP y la existencia de 5 inserciones exclusivas en las NMNATs de los parásitos (Inserción 1: residuos 9-43, inserción 2: residuos 206-213, inserción 3: residuos 241-249, inserción 4: residuos 267-271, inserción 5: residuos 278-284). Análisis adicionales empleando la herramienta BLASTP, indicaron que las inserciones exclusivas identificadas, no se encuentran en ninguna de las proteínas humanas depositadas en el GeneBank. Al realizar los alineamientos múltiples con los algoritmos MUSCLE, ClustalW y ClustalO, se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).

La existencia de inserciones exclusivas en las NMNATs de los parásitos, se podría relacionar con procesos de regulación funcional. En concordancia, el análisis bioinformático de dichas inserciones con los predictores de fosforilación NetPhos 2.0 y GPS 2.0 [142, 143], sugirió la posible fosforilación de 13 residuos: tirosinas 9 y 90, serinas 29, 35, 69, 158, 210, 212, 250 y treoninas 13, 30, 38 y 255. De estos residuos, seis (Y9, T13, 30, 30, S29, 35) se encuentran en la inserción 1, dos (S210, 212) en la inserción 2 y uno (S250) adyacente a la inserción 3 de la proteína LbNMNAT (Figura 6-44).

Experimentalmente, se estudió el efecto deletional de las inserciones 1 y 3 sobre la actividad enzimática de las respectivas proteínas recombinantes His-LbNMNAT Δ 1-43 e His-LbNMNAT Δ 241-249. Se eligieron estas inserciones porque presentan la mayor longitud (número de residuos). La obtención de estas proteínas se logró mediante herramientas de biología molecular que permitieron construir los plásmidos de expresión pET100-LbNMNAT Δ 1-43 y pQE30LbNMNAT Δ 241-249 (Anexos C y D).

Figura 6-44: Alineamiento múltiple de proteínas de la NMNAT de diferentes especies de *Leishmania* y las iso-enzimas humanas HsNMNAT1-3. En naranja se indican las 5 inserciones exclusivas en las NMNATs de *Leishmania*. En azul se indican los motivos conservados de unión a ATP previamente reportados [55]. Las P rojas indican posibles residuos sujetos a fosforilación. El porcentaje de identidad entre las secuencias es proporcional a la altura de las barras grises. El alineamiento se generó con el programa CLC Sequence Viewer 7.



A continuación, se describirán los resultados del estudio de las proteínas deletionadas generadas. Con relación a la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 (35,3 kDa), su expresión se indujo en el sistema de co-expresión con chaperonas desde el vector pET100. Este sistema generó la proteína recombinante de interés en la fracción soluble, a partir de la cual se realizó la purificación correspondiente mediante IMAC (Figura 6-45).

De manera interesante, los ensayos enzimáticos acoplados y directos, indicaron una reducción drástica de la actividad catalítica de la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 con respecto a la proteína completa His-LbNMNAT (Figura 6-46). Esta evidencia revela que la

inserción exclusiva de la región amino terminal de la NMNAT de *L. braziliensis* es necesaria para la función enzimática *in vitro* de la misma. Con el propósito de identificar las regiones exactas indispensables para la actividad enzimática de la proteína LbNMNAT en la inserción mencionada, actualmente se están generando deleciones cortas dentro de la misma.

Figura 6-45: Purificación de la proteína recombinante His-LbNMNAT Δ 1-43 mediante IMAC. **A.** Esquema de la proteína His-LbNMNAT completa (Wild Type, WT) e His-LbNMNAT Δ 1-43. **B.** La purificación de la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 se realizó a partir de la fracción soluble del sistema de co-expresión con chaperonas moleculares. Fracción soluble de partida (1), proteínas no enlazadas (2), eluido (3). SDS-PAGE 12%. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa.

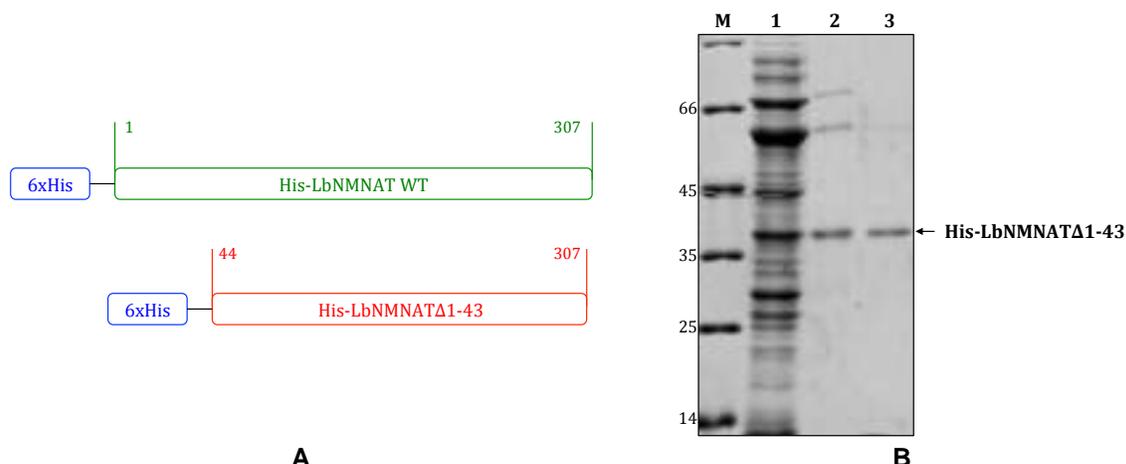
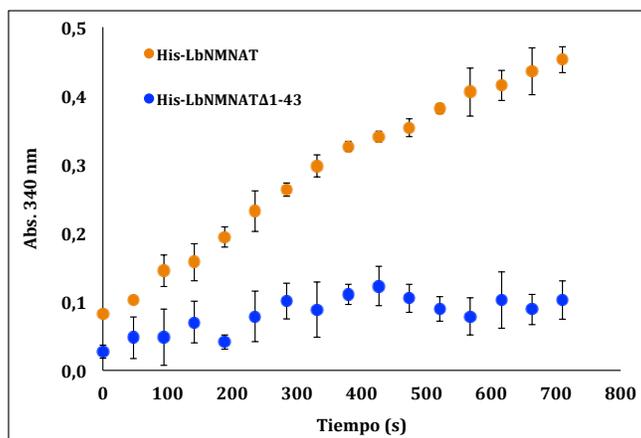
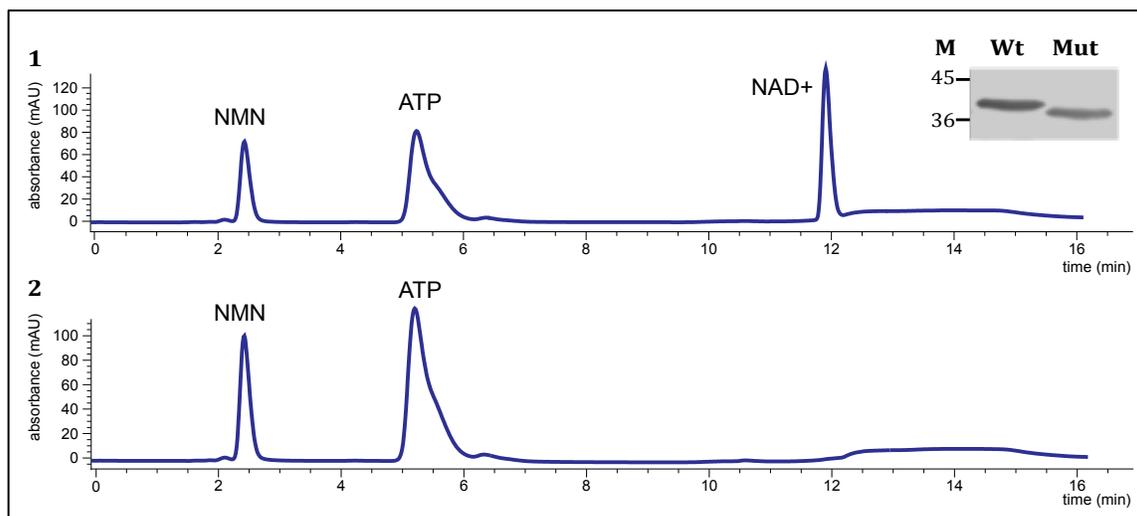


Figura 6-46: La inserción amino terminal de la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 es necesaria para su actividad enzimática *in vitro*. **A.** La síntesis de NAD⁺ por parte de la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 se analizó mediante ensayos enzimáticos acoplados, utilizando como control positivo la proteína completa His-LbNMNAT. Los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$). **B.** Adicionalmente, se ejecutaron ensayos enzimáticos directos cuyos resultados se analizaron mediante RP-HPLC. Los paneles 1 y 2 indican las reacciones respectivas ejecutadas con las proteínas His-LbNMNAT Wt e His-LbNMNAT Δ 1-43. Se utilizaron cantidades similares de las proteínas en los ensayos enzimáticos (Inserto del panel 1). Las proteínas se analizaron mediante Western blot empleando el anticuerpo primario anti-6xHis y el sistema de revelado con peroxidasa. M, marcador de peso molecular en kDa.



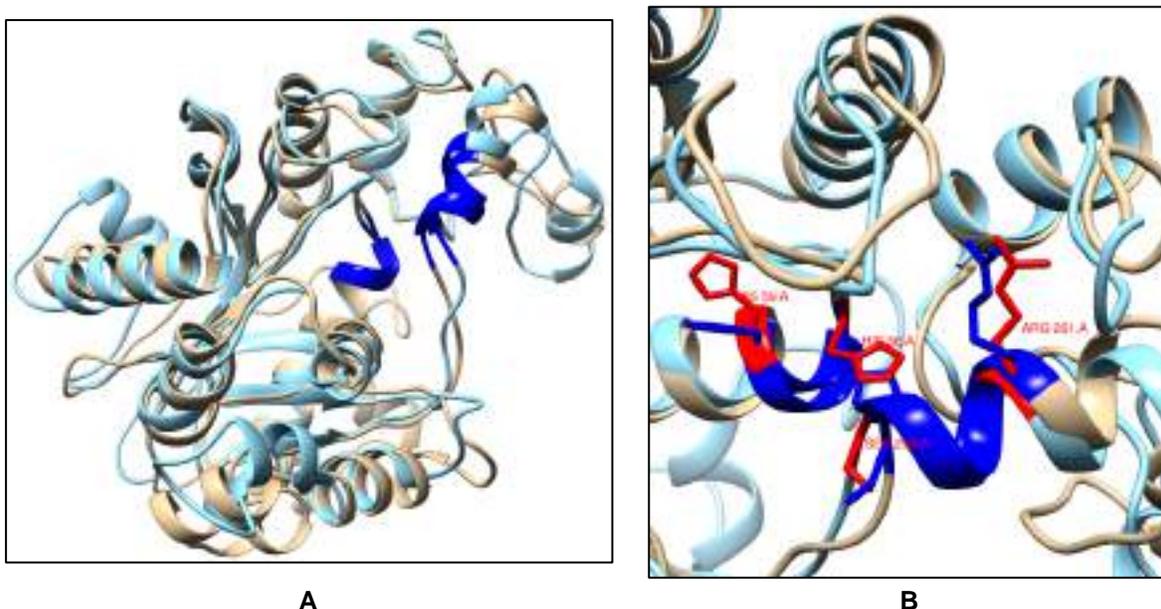
A



B

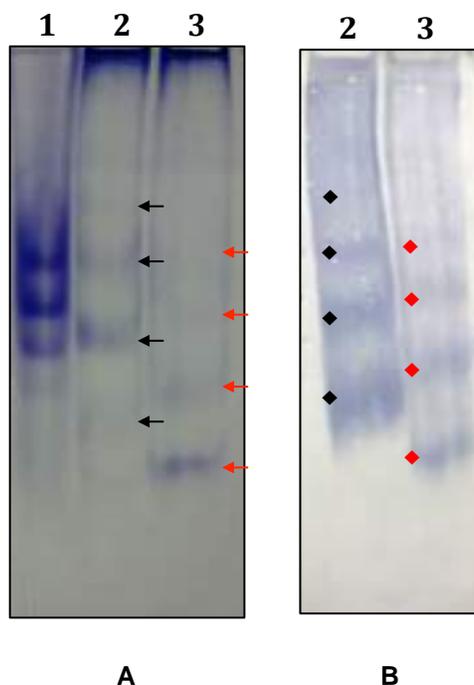
La deleción Δ 1-43 se generó cerca del motivo de unión a ATP localizado en los residuos 56-59 (Figura 6-44). Probablemente, la proximidad de esta deleción afecta el plegamiento de dicho motivo, explicando la reducción de la actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43. Por esta razón, se generaron modelos tridimensionales predictivos de las proteínas LbNMNAT y LbNMNAT Δ 1-43, examinando el efecto de la deleción generada sobre el plegamiento del motivo de unión a ATP. Estos modelos no solo presentan diferencias estructurales entre sí, sino que las cadenas laterales de los residuos involucrados en la interacción con el ATP (H56, 59, S256, R261) varían su disposición espacial con la deleción generada (Figura 6-47).

Figura 6-47: Modelos predictivos generados mediante el método de hilvanado para las proteínas His-LbNMNAT e His-LbNMNAT Δ 1-43. **A.** Sobre-posición de los modelos His-LbNMNAT (ocre) e His-LbNMNAT Δ 1-43 (azul). En azul oscuro se indican los motivos de unión a ATP. **B.** Las cadenas laterales de los residuos involucrados en la interacción con el ATP (H56 y 59, S256 y R261) presentan disposiciones espaciales diferentes entre los modelos. En rojo y azul se indican las cadenas laterales de los residuos en mención de la proteína His-LbNMNAT e His-LbNMNAT Δ 1-43, respectivamente. La nomenclatura de los residuos se realizó tomando como referencia la proteína His-LbNMNAT. Imágenes generadas con el programa UCSF Chimera [73].



Con el objetivo de evaluar el efecto de la delección Δ 1-43 sobre la organización oligomérica de la proteína recombinante respectiva, se realizó una aproximación al estudio de la estructura cuaternaria de la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 por gráficos de Ferguson. Inicialmente, se observaron 4 bandas de diferente peso molecular para la proteína delecionada mediante electroforesis bajo condiciones nativas y Western blot, empleando el anticuerpo primario anti-6xHis (Figura 6-48). La proteína completa His-LbNMNAT también presentó 4 bandas de diferente peso molecular. Al comparar los patrones observados para ambas proteínas (His-LbNMNAT vs His-LbNMNAT Δ 1-43), es evidente que las bandas de la proteína delecionada presentan una mayor migración en el gel, lo que puede relacionarse con el menor número de aminoácidos en esta proteína (43 residuos menos en comparación con la proteína completa).

Figura 6-48: Análisis de las proteínas recombinantes His-LbNMNAT e His-LbNMNAT Δ 1-43 nativas mediante PAGE y Western blot. **A.** Las proteínas His-LbNMNAT (2) e His-LbNMNAT Δ 1-43 (3) provenientes de purificación IMAC se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida nativos 12 %. Como control, se cargó la proteína anhidrasa carbónica que establece estructuras cuaternarias (1). Las flechas negras y rojas indican las 4 bandas observadas para la muestra His-LbNMNAT e His-LbNMNAT Δ 1-43, respectivamente. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. **B.** Adicionalmente, las muestras se analizaron mediante Western blot utilizando el anticuerpo primario anti-6xHis. Membrana PVDF. Los rombos negros y rojos corresponden a las 4 bandas observadas en la Figura A. Sistema de revelado con peroxidasa.



Los gráficos de Ferguson generados para la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 revelaron posibles organizaciones diméricas y triméricas, resultados similares a los observados para la proteína His-LbNMNAT (Figura 6-49 y Tabla 6-11). En general, el estudio de la delección Δ 1-43 indicó que la inserción amino terminal observada en la NMNAT de *L. braziliensis* es necesaria para la actividad catalítica *in vitro* de la misma. Adicionalmente, la delección generada parece no alterar la capacidad de la proteína recombinante His-LbNMNAT Δ 1-43 para establecer organizaciones oligoméricas.

Figura 6-49: Análisis de las proteínas recombinantes His-LbNMNAT e His-LbNMNAT Δ 1-43 nativas mediante PAGE. **A.** Las proteínas patrón lactoalbúmina (1), inhibidor de

tripsina (2), anhidrasa carbónica (3), ovoalbúmina (4), BSA (5) y las proteínas His-LbNMNAT (WT) e His-LbNMNAT Δ 1-43 (MUT) provenientes de la purificación IMAC se separaron en PAGEs de diferentes porcentajes de acrilamida. Se muestra únicamente el gel del 12%. Las flechas indican las 3 bandas estudiadas para la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 junto con su nomenclatura. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. **B.** Determinación de los coeficientes de retardo (K_r) de las 3 bandas de la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43. El valor de K_r se determinó a partir de la ecuación de las rectas indicadas.

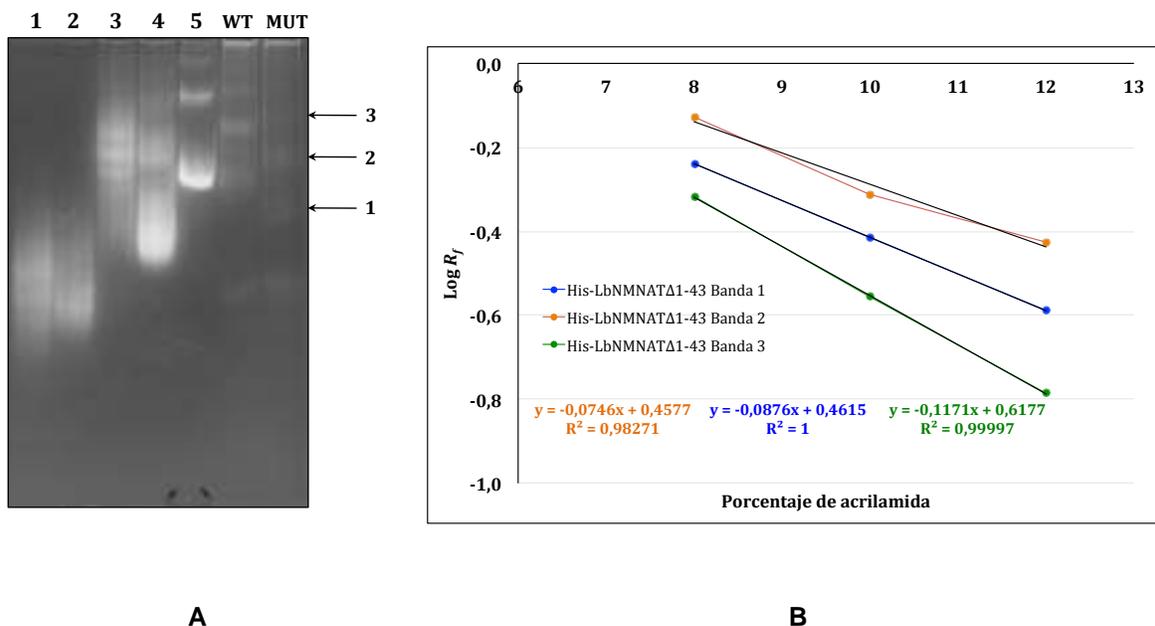


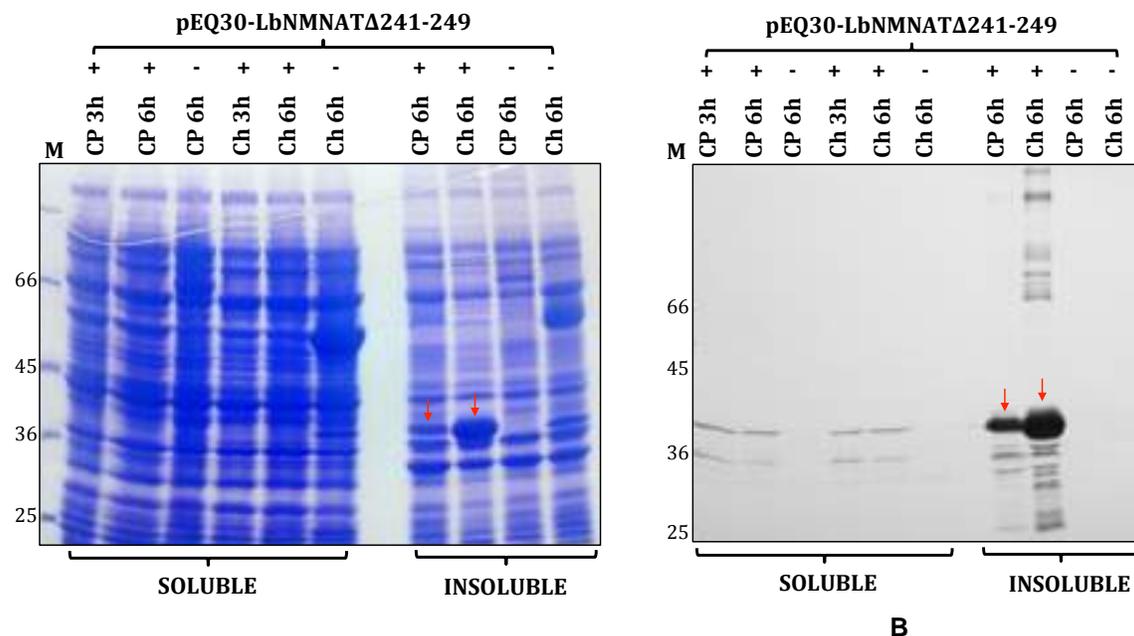
Tabla 6-11: Determinación del tipo de oligómero para la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43 a partir del gráfico de Ferguson (figura 6-15).

Proteína His-LbNMNAT Δ 1-43	K_r	$-\text{Log } K_r$	Log MW	MW	MW/36	OLIGÓMERO
Banda 1	0,0746	1,13	1,72	52,51	1,49	Monómero
Banda 2	0,0876	1,06	1,84	69,01	1,95	Dímero
Banda 3	0,1171	0,93	2,05	113,07	3,20	Trímero

Con relación a la proteína His-LbNMNAT Δ 241-249 (37 kDa), su expresión se indujo en el sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3) desde el vector pQE30. Este sistema promovió la acumulación de la proteína recombinante en la fracción insoluble (datos no mostrados).

La alteración de las condiciones de expresión como temperatura y sistemas bacterianos de expresión (co-expresión con chaperonas moleculares y sistema Codon Plus (DE3) RIL), no aumentaron la solubilidad de la proteína His-LbNMNAT Δ 241-249 (Figura 6-50). Eventualmente, podría evaluarse la solubilidad de la proteína de interés cuando se expresa desde otros vectores, tales como el vector pMAL, el cual genera proteínas recombinantes fusionadas a la proteína soluble de unión a maltosa.

Figura 6-50: Expresión de la proteína recombinante His-LbNMNAT Δ 241-249 bajo distintas condiciones experimentales. **A.** Mediante SDS-PAGE 10%, se analizaron las fracciones solubles e insolubles de diferentes sistemas de expresión no transformados (-) o transformados (+) con el plásmido pQE30-LbNMNAT Δ 241-249 e inducidos con IPTG a 24°C por distintos tiempos. Sistemas de expresión utilizados: Codon Plus (CP), co-expresión con chaperonas (Ch). Las flechas rojas indican la acumulación de la proteína His-LbNMNAT Δ 241-249 en las fracciones insolubles de los distintos sistemas de expresión. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie. **B.** Adicionalmente, las muestras se analizaron mediante Western blot empleando el anticuerpo primario anti-6xHis y el sistema de revelado con peroxidasa. M, marcador de peso molecular en kDa.

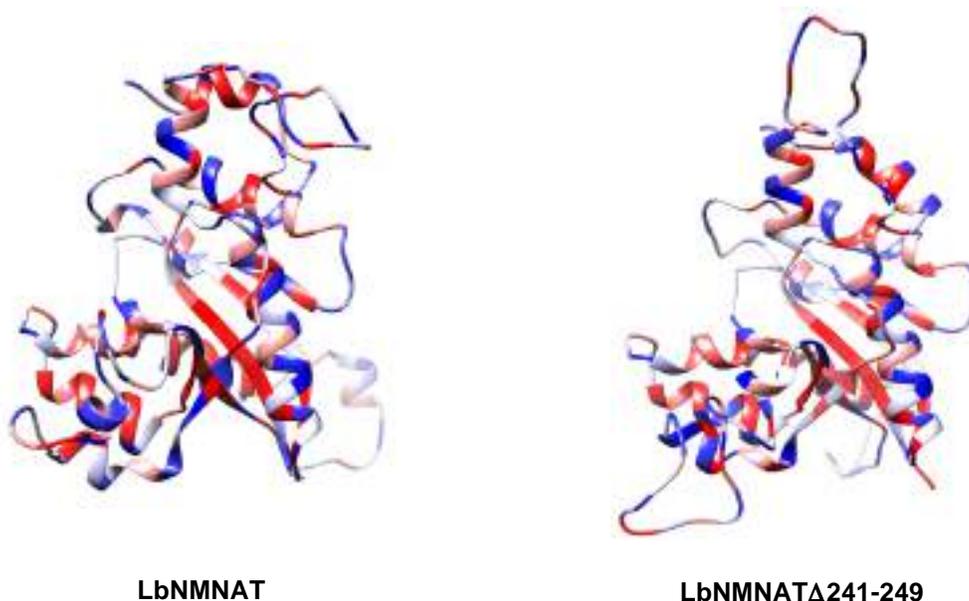


La insolubilidad de la proteína His-LbNMNAT Δ 241-249 observada en el presente estudio, puede relacionarse con cambios en sus perfiles de hidrofobicidad en comparación con la proteína completa His-LbNMNAT. El carácter hidrofóbico de los residuos de los modelos

LbNMNAT y LbNMNAT Δ 241-249 se indica en la Figura 6-51, mientras que los índices de hidrofobicidad calculados con la herramienta ProtParam para ambas proteínas son: His-LbNMNAT Δ 241-249= -0,07 y His-LbNMNAT= -0,15

El valor del índice de hidrofobicidad es directamente proporcional a la hidrofobicidad de la proteína (proteínas hidrofóbicas presentan índices más positivos). Según los valores obtenidos, la proteína deletada es 2 veces más hidrofóbica con relación a la proteína completa. En este punto es necesario recordar que esta última proteína se obtuvo en la fracción soluble del sistema *E. coli* BL21 (DE3) cuando se expresó desde el vector pQE30 a 24°C (Figura 6-2 B). Como referencia, la proteína His-HsNMNAT1 expresada desde el plásmido pQE30 es altamente soluble y su índice de hidrofobicidad es -0.647. Por su parte, una proteína transmembranal insoluble (regulador transmembranal de conductancia, NCBI: NP_000483.3) exhibe un índice de 0.024.

Figura 6-51: Carácter hidrofóbico de los modelos LbNMNAT y LbNMNAT Δ 241-249. La hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos en los modelos se asignó empleando la escala de Kyte-Doolittle, en la cual: Residuos de color azul: residuos hidrofílicos. Residuos de color rojo: residuos hidrofóbicos.



6.7 Análisis de los niveles de expresión genética de la LbNMNAT

Con el ánimo de abordar un aspecto adicional del proceso biosintético del NAD en *Leishmania*, se emprendieron experimentos para cuantificar el ARN mensajero (ARNm) del gen *lbnmnat* y la proteína correspondiente en el parásito. La medición de los niveles de transcripción del ARNm se efectuó implementando protocolos de extracción de ARN total, ensayos de amplificación por PCR acoplados a Transcripción Reversa (RT-PCR) y PCR cuantitativo en Tiempo Real (RT-qPCR).

Por su parte, los niveles de la proteína LbNMNAT se analizaron en extractos proteicos del parásito por SDS-PAGE y Western blot utilizando los anticuerpos anti His-LbNMNAT. Las mediciones se realizaron en promastigotes y amastigotes de *L. braziliensis* como se planteó en los objetivos específicos del presente estudio. Adicionalmente, teniendo en cuenta que el proceso de infección se caracteriza, entre otras cosas, por la exposición continua del parásito a estrés oxidativo, se analizaron los niveles de expresión genética de la NMNAT en promastigotes tratados con peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

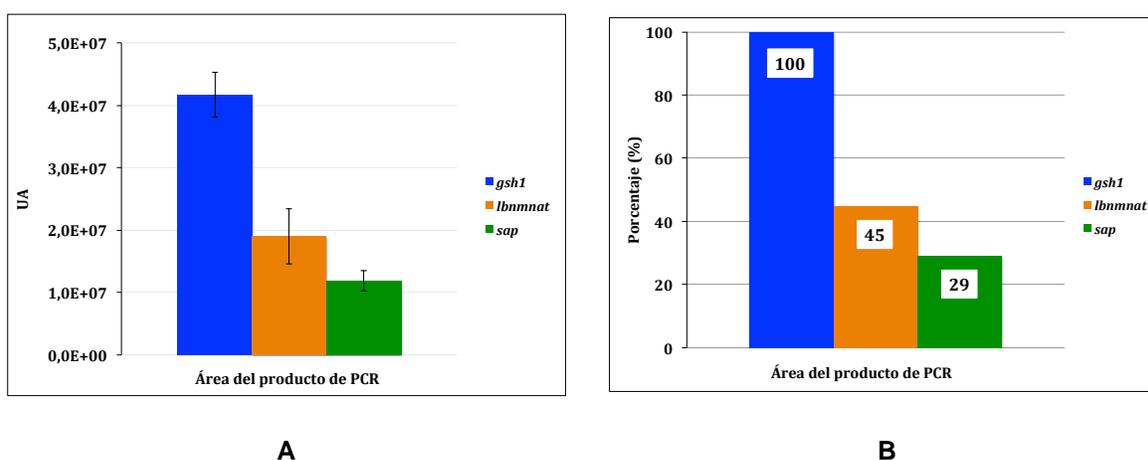
Inicialmente, se realizó una aproximación al estudio de los niveles de ARNm en promastigotes mediante RT-PCR. La estrategia utilizada se basó en la comparación del área del producto de PCR del fragmento *lbnmnat* con respecto al área correspondiente de genes de referencia. Para esto, los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se cuantificaron por densitometría.

Como genes de referencia se utilizaron los genes γ *glutamil cisteina sintetasa* (*gsh1*), de expresión constitutiva a lo largo del ciclo de vida de *L. braziliensis* e involucrado en la síntesis de glutatión, y el gen *proteína antígeno de superficie* (*sap*) que se expresa de manera mayoritaria en amastigotes [144]. Los genes *lbnmnat* y *sap* presentaron valores respectivos de área del producto de PCR del 45 y 29%, en relación con el gen de expresión constitutiva *gsh1* (Tabla 6-12 y Figura 6-52).

Tabla 6-12: Cuantificación por densitometría de los productos de PCR de diferentes genes en promastigotes de *L. braziliensis*.

TRANSCRITO	TRIPLICADO BIOLÓGICO	ÁREA (UA*)	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
<i>gamma glutamil cisteina sintetasa (gsh1)</i>	1	42083560	41725486	3603087
	2	45136167		
	3	37956731		
<i>proteína antígeno de superficie (sap)</i>	1	10850468	11895087	1633265
	2	13777225		
	3	11057569		
<i>lbnmnat</i>	1	21745125	18968620	4372020
	2	21231782		
	3	13928953		

Figura 6-52: Expresión relativa del gen *lbnmnat* con respecto a genes de referencia en promastigotes de *L. braziliensis*. **A.** Los valores de área del producto de PCR registrados en la Tabla 6-12 se graficaron para cada uno de los genes evaluados. Los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$). **B.** Porcentaje relativo del área del producto de PCR de cada gen con respecto al gen *gsh1*, cuya área se fijó en 100%.

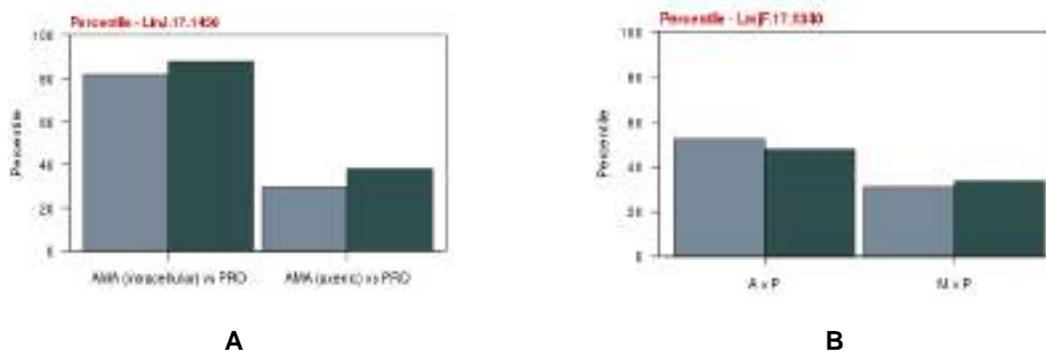


Extendiendo el análisis de expresión a amastigotes de *L. braziliensis*, se realizaron ensayos de infección *in vitro*, empleando el modelo de macrófagos murinos J744. El ARN

total de los macrófagos infectados se utilizó para sintetizar ADNc y ejecutar experimentos de RT-PCR. Los genes bajo estudio (*gsh1*, *sap* y *lbnmnat*) no se lograron amplificar mediante esta estrategia. Por este motivo se implementó una técnica más sensible, RT-qPCR, para cuantificar el transcrito *lbnmnat*. Como gen referencia se empleó el gen de expresión constitutiva *40s*. Esta aproximación permitió amplificar únicamente el gen de referencia (Anexo H). De modo consecuente, se modificaron las condiciones del ensayo para favorecer la amplificación del fragmento de interés. Específicamente, se cambió la cantidad de plantilla, la temperatura de anillamiento, la enzima de retro-transcripción y el tiempo post-infección en que se extrae el ARN total de los macrófagos infectados. A pesar de estas variaciones, no se logró amplificar el fragmento *lbnmnat* por la técnica RT-qPCR.

Probablemente, la estrategia experimental implementada en el presente trabajo para cuantificar el transcrito *lbnmnat* en amastigotes de *L. braziliensis*, presenta baja sensibilidad. En otros estudios se han utilizado plataformas tecnológicas como RNA-Seq y microarreglos de ADN para determinar el nivel de expresión transcripcional del gen *nmnat* en diferentes especies del parásito tales como *L. donovani*, *L. infantum* y *L. major* [145, 146]. En dichos estudios, se han empleado amastigotes axénicos y amastigotes derivados de lesiones generadas en ratones, en contraste con el modelo de infección *in vitro* implementado en el presente trabajo. En todos los casos estudiados, se observaron niveles de expresión similares del gen *nmnat* entre amastigotes (axénicos o derivados de lesiones) y promastigotes (Figura 6-53).

Figura 6-53: Expresión del transcrito *nmnat* en *L. infantum* y *L. major* a través de sus ciclos de vida. Comparación mediante microarreglos de ADN de los perfiles de expresión del ARNm de la *nmnat* entre: **A.** Amastigotes (AMA) intracelulares o axénicos vs promastigotes (PRO) de *L. infantum*. **B.** Promastigotes procíclicos (P) vs amastigotes derivados de lesiones de ratón (A) o promastigotes metacíclicos (M) de *L. major*. ($n=3$). Figuras tomadas de la base de datos TriTrypDB para los genes LinJ.17.1450 y LmjF.17.1314.



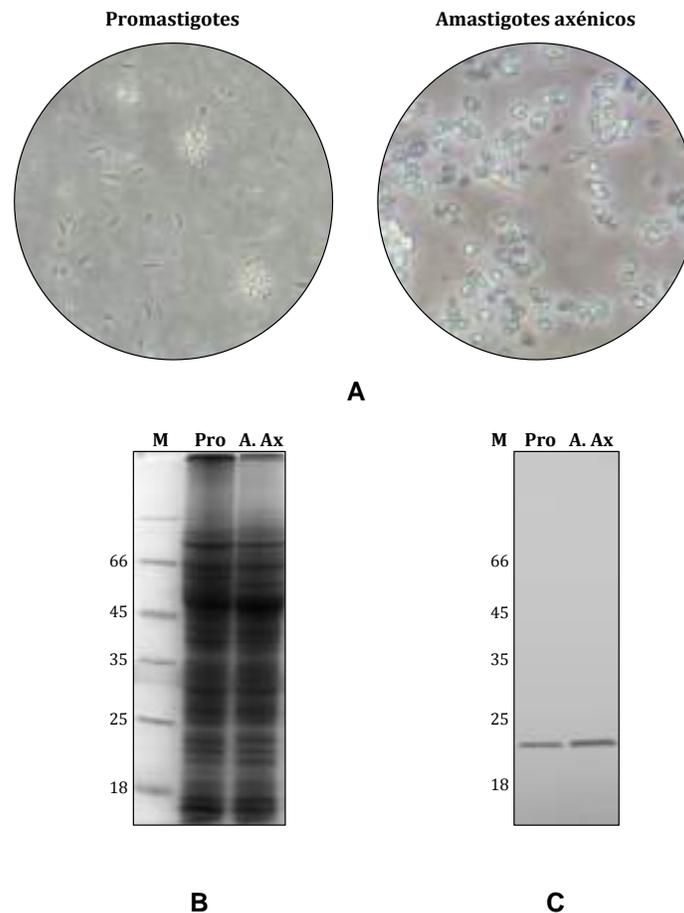
Por otra parte, el estudio de los niveles de expresión de la proteína LbNMNAT se realizó en promastigotes y amastigotes axénicos [113] de *L. braziliensis*. La obtención de los amastigotes axénicos se logró modificando las condiciones de temperatura y pH del cultivo celular de los promastigotes. Estas modificaciones promovieron la diferenciación *in vitro* de los parásitos, generando formas celulares redondeadas y de flagelo retraído, morfología típica del amastigote (Figura 6-54 A) [112].

El análisis de extractos proteicos totales por Western blot utilizando los anticuerpos anti His-LbNMNAT, no reveló cambios drásticos en los niveles de la proteína LbNMNAT (señal de ~ 22 kDa) entre los promastigotes y los amastigotes axénicos analizados (Figura 6-54 B y C). Este resultado es congruente con aquellos reportados a nivel del transcrito *nmnat*, el cual es similar entre amastigotes axénicos y promastigotes de *L. infantum* (Figura 6-53 A).

Aunque *Leishmania* es un modelo de investigación estudiado por numerosos grupos alrededor del mundo, no existe un consenso acerca de las proteínas que puedan ser empleadas como control de carga en las distintas especies y estadios del parásito. Adicionalmente, no se dispone de anticuerpos comerciales para tal fin. Por esta razón, la tinción del SDS-PAGE con azul Coomassie, se utilizó como control de carga para las muestras evaluadas (amastigotes axénicos y promastigotes) en el presente trabajo. Este método ha sido empleado en otros estudios [6, 141]. Algunos autores utilizan como control de carga, la tinción de las membranas para Western blot con Ponceau S [147].

Figura 6-54: Los niveles de expresión de la proteína LbNMNAT no varía drásticamente entre promastigotes y amastigotes axénicos de *L. braziliensis*. **A.** Morfología celular de los promastigotes y amastigotes axénicos empleados en el experimento. Las imágenes se

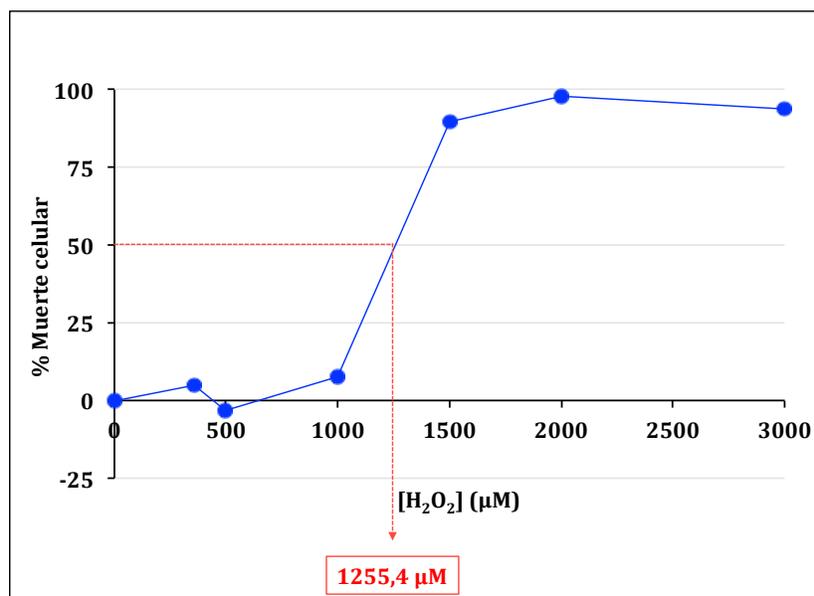
obtuvieron empleando el celular Samsung Galaxy S4. **B.** Extractos totales de proteínas de $\sim 1 \times 10^7$ promastigotes (Pro) y amastigotes axénicos (A. Ax) de *L. braziliensis* se analizaron por SDS-PAGE 12%. Proteínas visualizadas con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa. **C.** Las inmunodetecciones se realizaron sobre membranas PVDF empleando el anticuerpo primario anti His-LbNMNAT (1:1000) y el anticuerpo secundario anti ratón acoplado a HRP (1:1000). Sistema de revelado con peroxidasa.



proceso de infección celular supone condiciones adversas, hostiles o desfavorables para el desarrollo de *Leishmania* al interior de la vacuola parasitófora de la célula infectada [97]. Estas condiciones incluyen un pH ligeramente ácido (4.7-5.2), un aumento de la temperatura (37°C) y la presencia de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [148]. Ante estas condiciones el parásito despliega diversos mecanismos de defensa como la regulación del pH, la expresión de proteínas de choque térmico (Hsp70 y Hsp83) [149] y la sobre-expresión de enzimas anti-oxidantes como la triparedoxina peroxidasa [150] y la tripanotiona reductasa [151].

Con el objetivo de evaluar el efecto del estrés oxidativo sobre la expresión de la proteína LbNMNAT, se expusieron promastigotes de *L. braziliensis* a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Para esto, en primer lugar, se determinó el IC_{50} del H_2O_2 en promastigotes de *L. braziliensis*, obteniéndose un valor de 1,3 mM (Figura 6-55). Una vez determinada dicha concentración de H_2O_2 , se cultivaron los promastigotes bajo esta condición de estrés oxidativo por 2h y se evaluaron los niveles de expresión de la NMNAT en el parásito.

Figura 6-55: Determinación del IC_{50} para H_2O_2 sobre promastigotes de *L. braziliensis*. 1×10^6 parásitos se inocularon en medio Schneider completo suplementado con diferentes concentraciones de H_2O_2 por 2h a $25^\circ C$. Luego, las células de cada tratamiento se cuantificaron empleando cámaras de Neubauer y se determinó el % de muerte celular con respecto al control.



Las mediciones registradas por RT-qPCR no evidenciaron variaciones del gen *lbnmnat* entre los parásitos cultivados bajo estrés oxidativo y aquellos cultivados en condiciones normales (Figura 6-56). Al evaluar el nivel de expresión de la proteína LbNMNAT mediante Western blot, se observó una disminución drástica en la cantidad de proteína en los promastigotes expuestos a H_2O_2 (Figura 6-57). En resumen, el estrés oxidativo promovió cambios en los perfiles de expresión de la NMNAT únicamente a nivel traduccional en la fase móvil del parásito.

Figura 6-56: El estrés oxidativo no altera los niveles transcripcionales de expresión del gen *lbnmnat* en promastigotes de *L. braziliensis*. Los niveles de ARNm del gen *lbnmnat* se

midieron mediante RT-qPCR en parásitos no tratados y tratados con concentraciones IC_{50} (1,3 mM) de H_2O_2 . Los valores corresponden a la razón entre los niveles de expresión del gen de interés *lbnmnat* y el gen de referencia *40s*. Los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$).

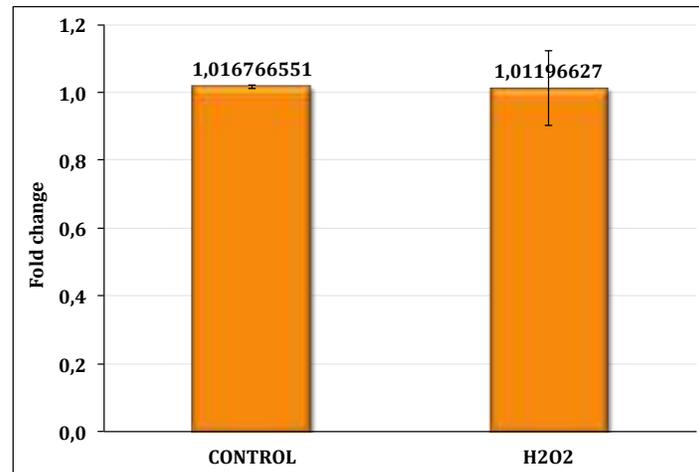
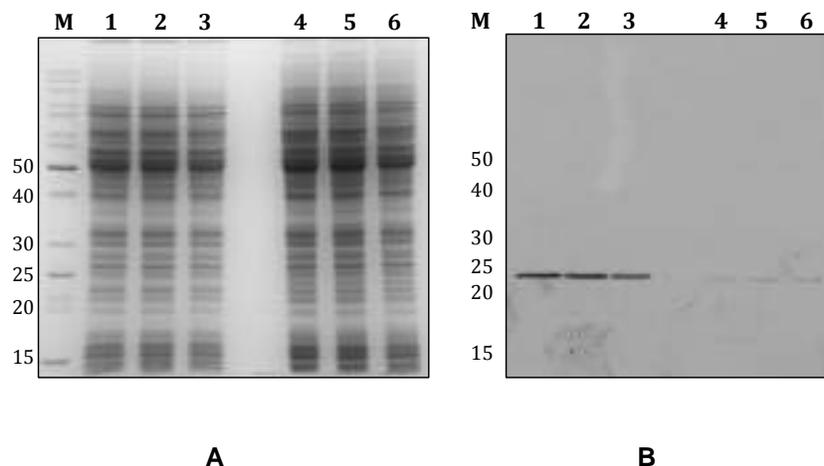


Figura 6-57: El estrés oxidativo altera los niveles de expresión de la proteína LbNMNAT en promastigotes de *L. braziliensis*. Extracto total de proteínas de promastigotes de *L. braziliensis* no tratados (1-3) y tratados (4-6) con concentraciones IC_{50} (1,3 mM) de H_2O_2 . **A.** SDS-PAGE 12%. Proteínas visualizadas con azul Coomassie. M, marcador de peso molecular en kDa. **B.** Las inmunodetecciones se realizaron sobre membranas PVDF empleando el anticuerpo primario anti His-LbNMNAT (1:1000) y el anticuerpo secundario anti ratón acoplado a HRP (1:2500). Revelado con SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific).



6.8 Reconstrucción del metabolismo del NAD en *Leishmania*

La Enciclopedia de Genes y Genomas Kyoto (KEGG) ha propuesto una misma red para el metabolismo del NAD en 5 especies de *Leishmania*: *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* y *L. mexicana*. Esta red ha esquematizado tan sólo 7 enzimas con base en datos experimentales o bioinformáticos. Dos de las 7 proteínas han sido caracterizadas de manera experimental (sirtuina y nicotinamidasas), mientras que las 5 proteínas restantes han sido anotadas como hipotéticas o putativas. Dichas enzimas son: NMNAT, NAD sintasa, NAD quinasa, quinureninasa (Qasa) y adenosina nucleósido hidrolasa (A.Nasa).

Con el propósito de ampliar la red metabólica mencionada, se analizaron las rutas de síntesis, degradación y modificación del NAD y sus precursores en otros organismos. Estos análisis permitieron identificar enzimas de las vías *de novo* y de reciclaje, junto con enzimas que emplean el NAD como sustrato. Específicamente, se analizaron las rutas metabólicas de arqueobacterias (*M. jannaschii*, *S. solfataricus*, *Pyrococcus furiosus*), eubacterias (*E. coli*, *Salmonella enterica*, *Mycoplasma pneumonia*) y eucariotas (*H. sapiens*, *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae*). A partir de las rutas analizadas de estos organismos, se eligieron las enzimas relacionadas con el metabolismo del NAD que se indican en la Tabla 6-13.

De manera adicional, se han reportado 5 genes que codifican para transportadores de NA o NAD en humanos, plantas y levaduras (SLC22A13, SLC5A8, SLC25A17, atNDT1-2, scNDT2) [4, 152–154]. Estos transportadores y las enzimas presentadas en la Tabla 6-13, se buscaron en el genoma de *L. braziliensis* empleando la herramienta bioinformática (TBLASTN). En total, se encontraron 13 de las 24 proteínas investigadas. Los candidatos hallados, a excepción de los candidatos para PARPs, presentaron valores estadísticos (*e-value* y *score*) confiables y porcentajes de identidad variables con las secuencias empleadas en su búsqueda (Tabla 6-14). El análisis de dominios conservados y ontología genética (GO) para cada uno de los candidatos, corroboró la función correspondiente para los mismos (Tabla 6-15).

Tabla 6-13: Enzimas del metabolismo del NAD.

PROCESO	ENZIMA	*E.C.	COMENTARIO
SÍNTESIS	NamPRT, visfatina	2.4.2.12	Sintetiza NMN a partir de Nam
	NaPRT	2.4.2.11	Sintetiza NAMN a partir de NA
	QAPRT	2.4.2.19	o QA
	NRK1	2.7.1.22	Sintetiza NMN a partir de NR
	NRK2	2.7.1.22	Sintetiza NAMN a partir de NaR
	N/NAMNAT	2.7.7.1/18	Sintetiza NAD/NAAD
	NAD sintasa (hidroliza glutamina)	6.3.5.1	Sintetiza NAD a partir de NAAD
	TDO	1.13.11.11	Primer paso en la síntesis de QA (<i>vía de novo</i>)
	IDO	1.13.11.17	
	Quinurenina formamidasa	3.5.1.9	Pasos intermedios en la síntesis de QA (<i>vía de novo</i>)
	Quinurenina 3-hidroxilasa (Q3H)	1.14.13.9	
	Quinureninasa (Qasa)	3.7.1.3	
3-Hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa	1.13.11.6		
DEGRADACIÓN	PARPs	2.4.2.30	Poli ADP ribosilación
	ARTs	2.4.2.31	Mono ADP ribosilación
	ADPRcyc, NAD glicohidrolasa	3.2.2.5	Síntesis de segundos mensajeros
	CD38, NADP nucleosidasa	3.2.2.6	
	Sirtuinas (adicionalmente exhibe actividad ART [7])	3.5.1-	Deacetilación de proteínas

	NAD pirofosfatasa (NUDIX)	3.6.1.22	Degrada NAD en AMP y NMN
MODIFICACION	NAD quinasa (NADK)	2.7.1.23	Fosforila NAD
	Adenosina nucleósido hidrolasa (A.Nasa)	3.2.2.1	Sintetiza Nam a partir de NR
	Nicotinamidasa [6]	3.5.1.19	Hidroliza Nam a NA

* E.C.: número de clasificación de enzimas.

En azul se indican enzimas que se han caracterizado experimentalmente en *Leishmania*.

En verde se indican enzimas propuestas en KEGG para el metabolismo del NAD en *Leishmania*.

En negro se indican las enzimas elegidas a partir del análisis del metabolismo del NAD en otros organismos.

Tabla 6-14: Proteínas candidato del metabolismo del NAD de *L. braziliensis*.

PROCESO	PROTEÍNA	NÚMERO DE ACCESO		PARÁMETROS ESTADÍSTICOS			
		TriTrypDB	Proteínas de referencia (refseq)	e-value	score	*% de identidad	*% de cobertura
SÍNTESIS	NaPRT	LbrM.33.1160	XP_001567885.1	4e-156	451	56 (<i>E. coli</i> , WP_021550551.1)	98
	NAD sintasa	LbrM.32.1840	XP_001567539.1	4e-06	46.2	24 (<i>S. cerevisiae</i> , NP_011941.1)	78
	Quinurenina 3-hidroxilasa (Q3H)	LbrM2903_330020900	XP_001567928.1	9e-89	284	39 (<i>D. melanogaster</i> , NP_650121.1)	98
	Quinureninasa (Qasa)	LbrM.26.2160	XP_001562446.1	5e-81	266	35 (<i>H. sapiens</i> , NP_003928.1)	95
DEGRADACIÓN	NAD pirofosfatasa (NUDIX)	LbrM.31.3320	XP_001567321.1	1e-24	104	29 (<i>H. sapiens</i> , NP_001287670.1)	73
	PARPs	LbrM.35.1460	XP_001568767.1	0.022	37.7	39 (<i>H. sapiens</i> , NP_001609.2)	19
		LbrM2903_350020600		0.018			21
MODIFICACION	NADK	LbrM.06.0470	XP_001561981.2	6e-05	52.8	22 (<i>S. cerevisiae</i> , NP_010873.1)	13
	Adenosina nucleósido hidrolasa (A.Nasa)	LbrM.29.2850	XP_001566627.2	4e-11	67.8	28 (<i>Enterobacteriaceae</i> e WP_032608859.1)	67
TRANSPORTE	Transportador de NA (LbNATr)	LbrM2903_240012600	XP_001565336.1	2e-81	268	34 (<i>H. sapiens</i> , XP_011536149.1)	80
	Transportador de NAD (LbNADTr1-3)	LbrM2903_340041100	XP_001568430.1	5e-24	102	26 (<i>H. sapiens</i> , NP_006349.1)	77
		LbrM.32.1220	XP_001567479.1	4e-21	90.5	25 (<i>S. cerevisiae</i> , NP_010910.1)	96
		LbrM2903_320017900	XP_001567478.2	1e-24	100	26 (<i>S. cerevisiae</i> , NP_012132.3)	77

* Porcentaje de identidad y cobertura con la secuencia empleada para la búsqueda bioinformática. La procedencia y código de identificación de dicha secuencia en el NCBI se indica entre paréntesis.

Tabla 6-15: Características funcionales de las proteínas candidato del metabolismo del NAD de *L. braziliensis*.

			ONTOLOGÍA GENÉTICA (GO)	
PROCESO	PROTEÍNA	DOMINIO CONSERVADO	Proceso biológico	Función molecular
SÍNTESIS	NaPRT	Nicotinato fosforibosiltransferasa	Biosíntesis del nucleótido de nicotinato	Actividad nicotinato fosforibosiltransferasa
	NAD sintasa	NAD sintasa	Biosíntesis de NAD	Actividad NAD sintasa (hidroliza glutamina), unión a ATP
	Quinurenina 3-hidroxilasa	Aminotransferasa	Biosíntesis	Unión a piridoxal fosfato
	Quinureninasa	Quinureninasa	Catabolismo del triptófano, biosíntesis de NAD	Actividad quinureninasa
DEGRADACIÓN	NAD pirofosfatasa (NUDIX)	Superfamilia Nudix_hidrolasa, NADH pirofosfatasa	Actividad hidrolasa	
	PARPs	Poli(ADP-ribosa) polimerasa y ADN ligasa (dedo de Zinc)		Unión a ADN, unión al ión zinc
MODIFICACION	NADK	Dominio catalítico diacilglicerol quinasa	Biosíntesis de NADP	Actividad NAD quinasa
	Adenosina nucleósido hidrolasa	Nucleósido hidrolasa	Reciclaje ribonucleósido de purina	Actividad hidrolasa de enlace carbono-nitrógeno (no enlace peptídico)
TRANSPORTE	Transportador de NA	Transportador de la Superfamilia Facilitadora Mayor (MFS)	Transporte transmembranal	Actividad transporte transmebranal sustrato específico
	Transportador de NAD	Proteína transportadora mitocondrial	Transporte transmembranal	
		Proteína transportadora mitocondrial	Transporte transmembranal	

Las proteínas candidato del metabolismo del NAD de *L. braziliensis* y aquellas caracterizadas de manera experimental (incluida la enzima LbNMNAT estudiada en el presente trabajo), se emplearon para proponer la red metabólica del NAD para el parásito en mención (Figura 6-58). El análisis de la red construida, indica que la síntesis del NAD en *Leishmania* puede ser efectuada a través de las vías *de novo* y de reciclaje. Esta observación se soporta en la existencia de los genes codificantes para las enzimas Q3H, Qasa, NaPRT y NAD sintasa en el genoma del parásito. Experimentalmente, se demostró la capacidad catalítica de la proteína His-LbNMNAT para sintetizar NAD y NAAD (Figuras 6-8 y 6-21). La síntesis de NAAD por parte de la proteína His-LbNMNAT respalda la presencia de la enzima NAD sintasa en el parásito, la cual podría sintetizar NAD a partir de NAAD. La identificación de un candidato para la enzima A.Nasa, permite suponer que el parásito emplea NR para sintetizar Nam, que gracias a la actividad de la nicotinamidasa entra en la vía Preiss-Handler [6].

En relación con las enzimas que podrían utilizar el NAD como sustrato, la presencia de genes codificantes para PARPs y NAD pirofosfatasa en *Leishmania*, sugiere la participación del NAD en diversos procesos biológicos esenciales. Por ejemplo, las enzimas PARPs regulan procesos de reparación de ADN, muerte y división celular en mamíferos, aves, anfibios, insectos y bacterias mediante procesos de poli ADP ribosilación [155]. Por su parte, la enzima NAD pirofosfatasa perteneciente a la familia de proteínas denominada hidrolasas NUDIX (hidrolasas de **N**ucleósidos **D**ifosfatos enlazados a otras moléculas (**X**)) [156], controla la disponibilidad de numerosos intermediarios metabólicos relacionados con el procesamiento del ARN y la apertura de canales de calcio [157].

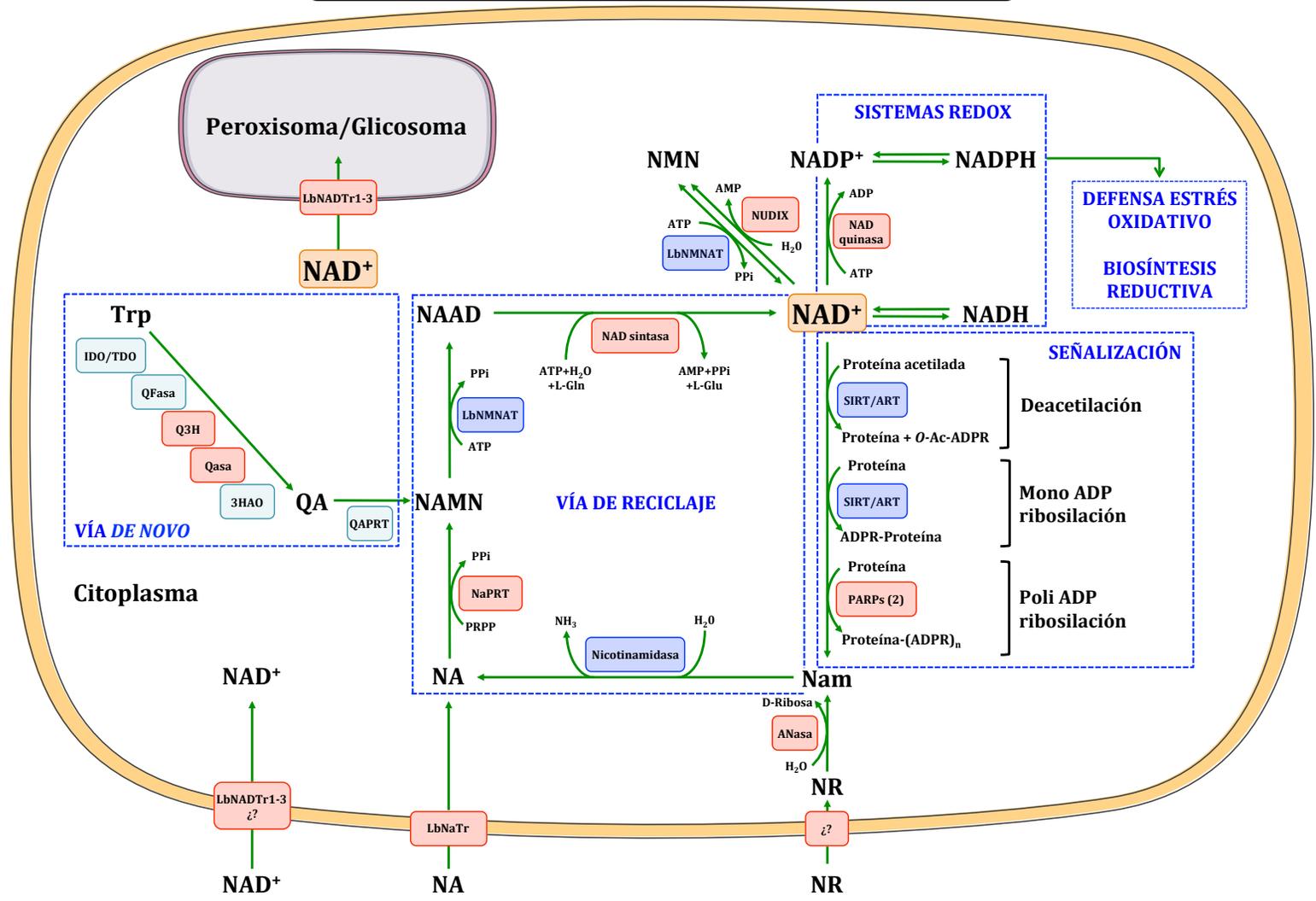
La identificación de los genes codificantes para transportadores de NA (LbNATr) y NAD (LbNADTr1-3) en el genoma de *L. braziliensis*, aportan información sobre el tránsito o circulación del NAD y sus precursores en el parásito. Los transportadores de NA y NAD identificados presentan una localización respectiva en la membrana celular y peroxisomal, de acuerdo con el servidor Euk-mPLoc 2.0. En términos estructurales el peroxisoma es un organelo similar a los glicosomas [85]. Por esta razón, es posible que algunos de los transportadores de NAD identificados se localicen en la membrana de estos últimos organelos. De manera adicional, cabe mencionar que *Leishmania* podría aprovechar su condición de parásito, importando NAD desde la célula hospedera mediante la expresión de los transportadores LbNADTr1-3 en su membrana plasmática.

Diversas reacciones propias de la oxidación de ácidos grasos, son catalizadas por enzimas NAD-dependientes al interior del peroxisoma. Por su parte, el glicosoma es un organelo especializado en metabolismo glucolítico en el que participa la enzima NAD-dependiente gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Como se demostró en este estudio, la proteína LbNMNAT exhibe una localización citosólica en *Leishmania*. Por esta razón, es probable que el NAD sintetizado en el citosol sea transportado hacia diferentes organelos del parásito como el peroxisoma y/o glicosoma. Adicionalmente, la presencia de transportadores de NA en la membrana celular de *Leishmania*, apunta a la capacidad de este parásito para emplear precursores provenientes de la célula hospedera.

Con relación a la enzima NAD quinasa, su existencia en el parásito se sustenta indirectamente, por los sistemas de defensa ante estrés oxidativo que despliegan los

Trypanosomátidos. Se han descrito sistemas basados en glutatión y tripanotión en *Leishmania* [96], los cuales dependen en última instancia del NADP, producto de la actividad catalítica de la enzima NAD quinasa. De manera similar, todas las enzimas de la ruta de las pentosas fosfato, la cual depende del NADP, han sido identificadas y caracterizadas en *Leishmania* [158]. Desde una perspectiva global, el metabolismo del NAD en *Leishmania* es un proceso complejo en el que participan numerosas enzimas e intermediarios químicos, todos ellos implicados en eventos celulares esenciales. En este sentido, el metabolismo del NAD y las enzimas involucradas con su síntesis, constituyen blancos farmacológicos promisorios contra este agente patogénico. Las diferencias estructurales reportadas en el presente trabajo entre la proteína LbNMNAT y las isoenzimas humanas HsNMNAT1-3 fortalecen esta observación.

Figura 6-58: Reconstrucción del metabolismo del NAD en *Leishmania*. Todas las enzimas involucradas en la vía de reciclaje de síntesis del NAD, se han identificado de manera experimental o bioinformática en *L. braziliensis*. En relación con la vía *de novo*, hasta el momento se han identificado 2 posibles candidatos (Q3H y Qasa). Una vez sintetizado, el NAD participa en eventos de señalización mediados por proteínas sirtuina, ART y PARPs. La Nam resultante de estas reacciones de deacetilación, mono y poli ADP ribosilación, entra en la vía de reciclaje por acción de la enzima nicotinamidasas. El NA generado es modificado por las enzimas NaPRT y LbNMNAT, dando lugar al NAAD, el cual es convertido a NAD⁺ por la enzima NAD sintasa. La fosforilación del NAD⁺ en NADP⁺ por la enzima NAD quinasa permite establecer el par REDOX NADP⁺/NADPH, implicado en procesos de defensa ante estrés oxidativo y rutas de biosíntesis reductivas. La concentración intracelular del NAD⁺ se ajusta mediante degradación enzimática hacia NMN y AMP por la actividad de hidrolasas de la familia NUDIX, las cuales regulan negativamente las enzimas que emplean el NAD como sustrato (sirtuina/ART, PARPs). Respecto a procesos de transporte, el NA extracelular puede ingresar al parásito a través de la proteína LbNaTr, integrándose a la vía de reciclaje. Aunque no se han identificado transportadores de NR en *Leishmania*, dicho precursor es metabolizado en Nam por acción de la enzima A.Nasa. Por su parte, el NAD ingresa en el peroxisoma/glicosoma por medio de las proteínas de membrana LbNADTr1-3, las cuales se sugiere que también podrían localizarse en la membrana plasmática. **Abreviaciones:** NA: ácido nicotínico, NR: nicotinamida ribósido, Nam: nicotinamida, Trp: triptófano, QA: ácido quinolínico.



7. Discusión

El NAD es una molécula indispensable para todos los seres vivos cuyo descubrimiento y caracterización involucró el trabajo de numerosos investigadores, algunos de ellos laureados con el premio Nobel (Sir Arthur Harden, Hans von Euler-Chelpin, Otto Warburg y Arthur Kornberg) [26, 30]. Dadas sus propiedades de óxido-reducción, el NAD participa como co-enzima en el metabolismo energético y en la defensa ante el estrés oxidativo. Adicionalmente, el NAD es utilizado como sustrato por enzimas involucradas en procesos de regulación celular fundamentales [5, 46, 159].

La trascendencia funcional del NAD sugiere que su biosíntesis es indispensable. De este modo, la enzima NMNAT resulta esencial dado que en ella convergen todas las vías de síntesis del NAD [8, 45, 56, 160]. En la actualidad, la biosíntesis del NAD se enfoca como blanco terapéutico contra el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y organismos patogénicos [49–51, 79, 161, 162]. En este contexto, la importancia de la proteína NMNAT ha impulsado el desarrollo e implementación de inhibidores enzimáticos específicos, capaces de afectar negativamente el crecimiento *in vivo* de otros parásitos de importancia mundial como *P. falciparum* [92].

Orientados en comprender el metabolismo del NAD en el parásito *L. braziliensis* e identificar posibles dianas farmacológicas, en el presente estudio se emprendió la caracterización bioquímica *in vitro* e *in vivo* de la enzima LbNMNAT. Los resultados derivados de dicha caracterización, se discutirán en seguida.

7.1 Solubilización de la proteína recombinante His-LbNMNAT

Numerosos grupos de investigación especializados en producción y purificación de proteínas recombinantes, han sugerido que los principales factores que afectan la solubilidad de estas proteínas incluyen: los sistemas de expresión, los promotores presentes en los vectores de expresión, las etiquetas de fusión y las condiciones de cultivo e inducción de la proteína recombinante [98, 163–165].

Atendiendo estas observaciones, en el presente estudio se implementaron diferentes estrategias experimentales para solubilizar la proteína recombinante His-LbNMNAT. Estas estrategias se eligieron con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes sistemas bacterianos disponibles en el laboratorio, condiciones de co-expresión con chaperonas moleculares y promotores tales como el T5, sobre la solubilidad de la proteína recombinante de interés.

En relación con los sistemas de expresión bacterianos, se utilizaron las cepas de *E. coli* Codon Plus (DE3) RIL, BL21 (DE3) pLysS y Rosetta (DE3) pLysS. Todas estas cepas presentan diversas características como ARN de transferencia únicos que optimizan la traducción de codones raros (Codon Plus y Rosetta) e inactivación de la ARN polimerasa T7 encargada de transcribir el gen de interés que se encuentra bajo el control del promotor T7 (pLysS). En este último caso, la probabilidad de solubilizar la proteína de interés aumenta, al reducir su tasa de transcripción/traducción, permitiendo su plegamiento lento y correcto [165].

En el caso de la proteína His-LbNMNAT expresada desde el vector pET100, ninguna de las tres cepas de expresión evaluadas favorecieron su solubilidad (Anexo E). Al analizar la composición de aminoácidos de la proteína en mención, se verificó la presencia de 10 residuos de cisteína. Esta evidencia permite suponer que la proteína His-LbNMNAT establece puentes disulfuro, principalmente entre la cisteína 22 y 26 que se encuentran próximas en el modelo 3D de la proteína LbNMNAT. Cuando las proteínas recombinantes a sobre-expresar contienen uno o más puentes disulfuro, es posible favorecer su plegamiento correcto y solubilidad, empleando cepas de expresión con ambientes citoplasmáticos oxidantes. Estas cepas, tales como *Origami* y *AD494* (ambas

de Novagen), exhiben mutaciones en los genes codificantes para las enzimas tioredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*), inhibiendo reacciones reductivas [166]. Teóricamente, estas cepas favorecerían la solubilidad de la proteína His-LbNMNAT en comparación con las cepas empleadas en el presente trabajo.

Por otra parte, el uso de chaperonas moleculares favorece el correcto plegamiento de las proteínas recombinantes, permitiendo su acumulación en la fracción soluble de sistemas de expresión bacterianos. Esta estrategia experimental ha sido utilizada para la obtención de proteínas recombinantes solubles [167]. En nuestro caso, la co-expresión de la proteína His-LbNMNAT desde el vector pET100 junto con las chaperonas moleculares DnaK, DnaE, GrpE, GroES y GroEL, aumentó su solubilidad en comparación con el sistema libre de chaperonas (Figura 6-2 A). Sin embargo, esta estrategia de co-expresión presenta una desventaja: la contaminación de la proteína de interés en los eluidos con la chaperona GroEL cuando se aplican protocolos de purificación por IMAC, tal como se observó en este (Figura 6-4 A) y en otros trabajos [127].

La expresión de la proteína His-LbNMNAT desde el plásmido pQE30 favoreció su acumulación en la fracción soluble del sistema *E. coli* BL21 (DE3). Este plásmido se caracteriza por presentar el promotor T5. Por su parte, el vector pET100 contiene el promotor T7 al cual se une la polimerasa T7, una proteína muy activa que transcribe el gen de interés de manera abundante. Esta propiedad genera una alta tasa de transcripción/traducción de la proteína recombinante correspondiente, afectando su plegamiento y promoviendo su precipitación como cuerpos de inclusión [139]. La utilización del plásmido pQE30 cuyo promotor T5 es débil en comparación con el promotor T7, podría relacionarse con la solubilidad de la proteína His-LbNMNAT. Otras NMNATs se han expresado de manera soluble desde el plásmido pQE30, como es el caso de las proteínas His-HsNMNAT1 y 3 [108].

Aunque la proteína His-LbNMNAT se logró solubilizar parcialmente implementando diferentes estrategias experimentales, en todos los casos se observó la formación de cuerpos de inclusión (Figura 6-2 y Anexo E). Estos agregados de la proteína His-LbNMNAT, representaron un producto útil que se utilizó para la generación de anticuerpos policlonales anti His-LbNMNAT, como se discutirá más adelante.

La proteína His-LbNMNAT se purificó de manera parcial mediante IMAC. Aunque dicho método ofrece numerosas ventajas (bajo costo, fácil manipulación, alta afinidad y escalabilidad), también presenta desventajas como la co-purificación de proteínas no deseadas. Para el caso particular de proteínas recombinantes fusionadas a la etiqueta 6xHis expresadas en *E. coli*, se han descrito 4 grupos de proteínas que la pueden contaminar: 1. Proteínas con motivos de unión a metales (como el níquel). 2. Proteínas con agrupaciones de residuos de histidina en su superficie. 3. Proteínas capaces de unirse a la proteína recombinante de interés. 4. Proteínas capaces de unirse a las perlas de agarosa que soportan la resina Ni-NTA [125].

Con el propósito de asegurar que la actividad enzimática registrada con los eluidos de la proteína His-LbNMNAT provenía de dicha proteína y no de los contaminantes presentes en la muestra, se realizó un ensayo de purificación por IMAC empleando la fracción soluble de *E. coli* sin transformar. Los eluidos obtenidos se utilizaron para ejecutar ensayos enzimáticos acoplados, los cuales confirmaron que la síntesis de NAD observada proviene de la proteína His-LbNMNAT purificada.

7.2 Organización oligomérica de la proteína recombinante His-LbNMNAT

La estructura cuaternaria de la proteína His-LbNMNAT se analizó mediante experimentos estructurales y funcionales implementando dos técnicas: construcción de gráficos de Ferguson y SEC. El primer método indicó que la proteína His-LbNMNAT puede establecer diferentes oligómeros (2-mer, 3-mer y 6-mer) (Tabla 6-5). Por su parte, el ensayo SEC reveló que la proteína de interés eluye como un monómero activo desde la columna de exclusión (Figura 6-11). Las propiedades relacionadas con los sistemas amortiguadores, las matrices (poliacrilamida o Sephadex) y el principio de separación (electroforesis o filtración) de las técnicas utilizadas, pueden explicar las diferencias en los resultados obtenidos. De acuerdo con esta idea, se ha observado que la proteína HsNMNAT1, tanto endógena como recombinante, se comporta como un tetrámero en ensayos SEC [128, 129]. Sin embargo, todos los estudios estructurales realizados mediante cristalografía de rayos X indican que dicha proteína establece un ensamblaje hexamérico [70–72]. De este modo, diferentes condiciones experimentales pueden generar diferentes organizaciones oligoméricas.

La estructura cuaternaria de las NMNATs de otros organismos se ha evaluado por SEC y/o cristalografía de rayos X. De este modo, los resultados derivados de los gráficos de Ferguson reportados en este trabajo, constituyen una aproximación metodológica adicional para el estudio del ensamblaje oligomérico de este tipo de proteínas.

Los gráficos de Ferguson y la SEC ofrecen información estructural. Adicionalmente, esta última técnica brinda información funcional dada la posibilidad de evaluar la actividad enzimática de las proteínas eluidas. Para el caso de los gráficos de Ferguson, no es posible concluir con certeza que todas las organizaciones oligoméricas observadas para la proteína His-LbNMNAT son activas. En este punto, podemos suponer dos escenarios: los ensamblajes oligoméricos observados para la proteína His-LbNMNAT en los geles nativos son enzimáticamente activos o inactivos.

La validez de estas suposiciones se soporta por diversas evidencias experimentales. En el primer caso (oligómeros activos), se han reportado numerosos estudios de NMNATs diméricas, tetraméricas y hexaméricas catalíticamente activas. Las revisiones sobre estructura/función escritas por autores especializados en NMNATs resultan ilustrativas [55, 56]. En el segundo caso (oligómeros inactivos), existe la posibilidad de que la proteína LbNMNAT ejerza otras funciones independientes de su actividad NMNAT. En concordancia con esta posibilidad, se ha reportado que la NMNAT de *D. melanogaster* desempeña funciones de chaperona molecular independiente de su actividad de síntesis de NAD [81, 168].

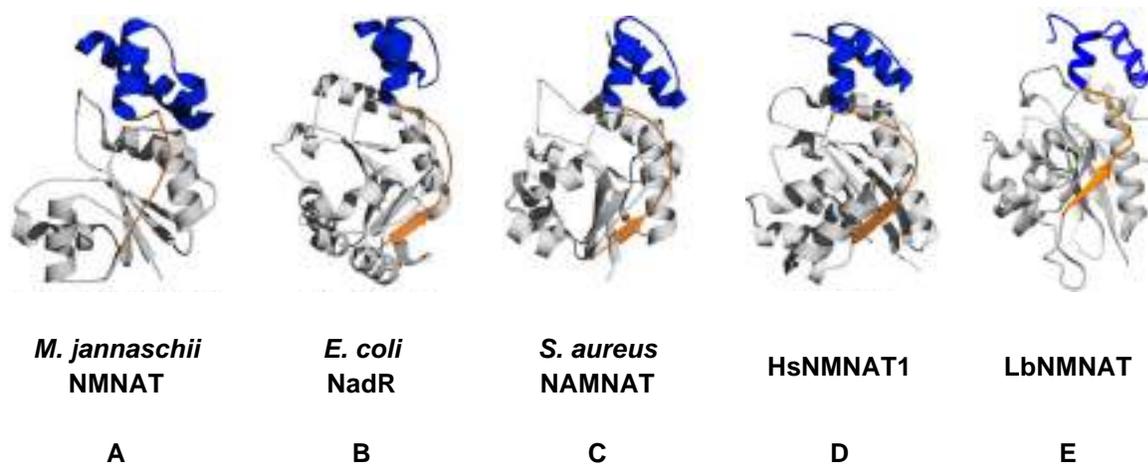
La proteína His-LbNMNAT eluyó como un monómero catalíticamente activo desde la columna SEC. Este resultado coincide con observaciones realizadas para las NMNATs de *E. coli* (NadD) y *P. aeruginosa*, las cuales son monómeros capaces de sintetizar NAD [74, 75]. Nuestros resultados junto con los reportes mencionados, permiten concluir que la estructura cuaternaria no es un requerimiento obligatorio para el funcionamiento enzimático de la NMNATs.

El ensayo SEC de la proteína His-LbNMNAT se efectuó en ausencia de los sustratos y cofactores de la enzima. Por esta razón, sería apropiado repetir el ensayo en presencia de dichas moléculas y evaluar posibles cambios en la organización oligomérica de la proteína. Otros investigadores han observado, mediante cristalografía de rayos X, que la

NMNAT de *B. subtilis* establece tetrámeros en ausencia de sustratos y dímeros cuando esta unida a NAAD [130].

Todas las NMNATs que establecen estructuras cuaternarias presentan un elemento estructural implicado en la interacción entre las subunidades que constituyen los oligómeros. Dicho elemento estructural, constituido por un giro o un giro unido a una hoja β , conecta el plegamiento Rossmann con el dominio carboxilo terminal de estas NMNATs. El análisis estructural del modelo tridimensional de la proteína LbNMNAT, reveló la presencia de un elemento estructural similar al mencionado (Figura 7-1). Esta evidencia bioinformática fortalece los resultados obtenidos con los gráficos de Ferguson que indicaron posibles formas oligoméricas de la proteína His-LbNMNAT.

Figura 7-1: El modelo tridimensional de la proteína LbNMNAT contiene el elemento estructural necesario para establecer oligómeros. Las NMNATs que presentan estructura cuaternaria, sea 2-mer, 4-mer o 6-mer, exhiben un elemento estructural común (naranja) que conecta el plegamiento Rossmann (gris) con el dominio carboxilo terminal (azul). Se indican las NMNATs que exhiben estructura cuaternaria en diferentes organismos. **A-D.** Estructuras resueltas por cristalografía de rayos X. Figuras tomadas de [55]. **E.** Modelo predictivo de la proteína LbNMNAT generado por el método de homología. Imagen generada con el programa UCSF Chimera [73].



7.3 Propiedades enzimáticas de la proteína recombinante His-LbNMNAT

Todas las vías de síntesis del NAD convergen en el paso catalizado por la enzima NMNAT. Por esta razón y enfocados en identificar diferencias entre la proteína LbNMNAT y los homólogos humanos (HsNMNAT1-3), se realizó la caracterización enzimática de la proteína recombinante His-LbNMNAT.

Inicialmente, se analizaron diferentes sistemas de amortiguación, condiciones de almacenamiento y termo-estabilidad. Entre estos aspectos, resultó interesante el requerimiento de DTT en el medio de almacenamiento para preservar la actividad de la proteína His-LbNMNAT (Figura 6-18 C). La proteína His-LbNMNAT contiene 10 residuos de cisteína cuyos grupos tiol pueden ser oxidados, conllevando a la inactivación de la enzima. La presencia de DTT ofrece un ambiente reductor que protege los grupos tiol de procesos de oxidación. En este sentido, la proteína His-LbNMNAT es similar a la iso-enzima humana HsNMNAT2 que contiene 9 residuos de cisteína y que requiere DTT para su funcionamiento. En contraste, la proteína HsNMNAT1 posee 4 cisteínas y no requiere DTT [76].

En cuanto a los datos de termo-estabilidad y temperatura óptima, se observó que la proteína His-LbNMNAT se inactiva a partir de 40°C, exhibiendo un rango óptimo de actividad entre 36-37.5°C (Figuras 6-18 E y 6-19 A). A través de su ciclo biológico, *Leishmania* soporta cambios de temperatura drásticos. Al interior del vector, el parásito experimenta temperaturas entre 22-28°C, mientras que en el hospedero vertebrado la temperatura varía entre 31-35°C (lesiones cutáneas) hasta 37°C (invasión visceral). Ante estos cambios, *Leishmania* ha generado sistemas de termo-tolerancia basados en proteínas de choque térmico. Dichos sistemas fallan por encima de 39°C, temperatura que resulta mortal para diferentes especies del parásito [149]. Esta observación concuerda con lo observado para la proteína His-LbNMNAT, que pierde su actividad enzimática a partir de 40°C.

El rango de pH óptimo de reacción de la proteína His-LbNMNAT presenta valores cercanos (6.5-7.5) (Figura 6-19 B) al pH intracelular medido tanto en amastigotes como

en promastigotes de *L. mexicana*, 6.4 y 6.8, respectivamente [169]. El pH óptimo reportado para las NMNATs humanas (Tabla 1-2) son similares a los determinados en el presente trabajo para la proteína His-LbNMNAT.

Todas las NMNATs caracterizadas hasta el momento requieren cationes divalentes para su actividad catalítica, tal como se observó para la proteína His-LbNMNAT. Las especies iónicas evaluadas (Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+}), a excepción de Ca^{2+} y Cu^{2+} , estimularon la actividad de la enzima en mención (Figura 6-19 C), siendo el magnesio y el níquel los cationes más efectivos.

En comparación con otras NMNATs, como la enzima NadR de *E. coli*, se ha observado que el níquel y el cobalto incrementan hasta 4 veces la actividad catalítica de esta enzima con respecto al magnesio [170]. Por su parte, la iso-enzima HsNMNAT1 prefiere el zinc, a diferencia de las iso-enzimas HsNMNAT2 y 3 que prefieren el magnesio. En presencia de zinc estas dos iso-enzimas exhiben tan solo 21 y 5.4% de actividad [62]. Resultados similares se observaron para la proteína His-LbNMNAT, la cual registra apenas 9% de actividad en presencia de zinc. Notablemente, en presencia de níquel la proteína His-LbNMNAT exhibe 87% de actividad en relación con el magnesio.

En *Leishmania*, el níquel es un elemento de relevancia biológica involucrado en sistemas de defensa ante agentes tóxicos como el metilglioxal. En *L. major* el primer paso en la detoxificación de este agente es catalizado por la enzima glioxalasa I (GLO1) que emplea níquel como cofactor [171, 172]. El empleo de níquel en *Leishmania* es excepcional, dado que las glioxalosas de todos los demás organismos eucariotas utilizan zinc. La selectividad exhibida por la enzima GLO1 la constituye como un blanco terapéutico potencial contra este agente patogénico [173].

Otro aspecto relevante de la proteína His-LbNMNAT se relaciona con sus constantes cinéticas, especialmente con el K_m determinado para el ATP ($\sim 3 \mu M$) (Tabla 6-6). Dicha constante es hasta 3 ordenes de magnitud menor con respecto al resto de NMNATs caracterizadas hasta el momento a excepción de las NMNATs de organismos procariontes como *E. coli* (NadR) y *S. solfataricus* que también exhiben una alta afinidad por el ATP (K_m : 1.7 y 0,08 μM , respectivamente) [60, 170].

Respecto al K_m de la enzima His-LbNMNAT para el NAD y el PPI, se observaron diferencias con aquellas constantes reportadas para las iso-enzimas HsNMNAT1-3. Por ejemplo, la afinidad por el NAD es mayor en las tres iso-enzimas humanas (K_m : 59, 70 y 130 vs 470 μM para el parásito) mientras que la afinidad por el PPI es mayor en *L. braziliensis* (K_m : 196 vs 937, 1119 y 309 μM para el humano) (Tabla 6-6). En términos generales, las constantes de afinidad para NMN, ATP, NAD y PPI de la proteína His-LbNMNAT y las iso-enzimas humanas, presentan diferencias notables.

Suponiendo una disponibilidad limitada de ATP en el parásito, la alta afinidad de la proteína His-LbNMNAT por este sustrato resultaría razonable. Sin embargo, el metabolismo energético de los Trypanosomátidos emplea diversas rutas y procesos para producir ATP (glicólisis, oxidación de ácidos grasos, ciclo de los TCA, fosforilación oxidativa y fosforilación a nivel de sustrato) [82, 97, 174]. Adicionalmente, diferentes enzimas de *Leishmania* que emplean ATP como sustrato exhiben valores variables de K_m para dicha molécula (hexoquinasa 300 μM , fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 54 μM , ecto-ATPasa 980 μM y adenilato quinasa 2 104 μM) [175–178]. De este modo, una alta afinidad por el ATP no es una tendencia entre las enzimas de *Leishmania*.

Las afinidades de la proteína His-LbNMNAT por diferentes sustratos podría aprovecharse para el desarrollo de inhibidores o activadores potenciales. La alta afinidad observada por el ATP se puede aprovechar como punto de partida para desarrollar moléculas basadas en su estructura. En la actualidad, se usan inhibidores basados en la estructura del ATP dirigidos contra tirosina quinasa para el tratamiento de leucemia mieloide crónica (CML) en humanos [179, 180]. Contra *Leishmania*, aún no se han reportado este tipo de inhibidores [181].

El análisis de la velocidad máxima, los números de recambio (K_{cat}) y la constante de equilibrio de la proteína His-LbNMNAT, indicaron que la proteína en mención es más rápida, eficiente y favorece la catálisis de la reacción reversa en condiciones *in vitro* (Tablas 6-6 y 6-7). Es decir, la síntesis de ATP y NMN a partir de NAD^+ y PPI, es la reacción que prevalece bajo las condiciones experimentales reportadas en el presente trabajo. En términos fisiológicos, es difícil sugerir una explicación racional para este resultado debido al requerimiento esencial de NAD^+ . Sin embargo, es tentativo suponer

que la reacción reversa podría ser catalizada en condiciones de estrés energético para obtener ATP.

Dependiendo del organismo, las NMNATs presentan selectividad diferencial por los sustratos NMN o NAMN para sintetizar NAD o NAAD, respectivamente. Mientras que las arqueobacterias prefieren NMN, las eubacterias utilizan NAMN [45, 56]. Por su parte, las iso-enzimas humanas HsNMNAT1-3 pueden sintetizar tanto NAD como NAAD [108], tal como se observó para la proteína His-LbNMNAT (Figuras 6-8 y 6-21).

En concordancia con este último resultado, la síntesis de NAD en el parásito se puede explicar del siguiente modo:

1. La enzima nicotinamidasas, cuya caracterización experimental ha sido reportada, sintetiza ácido nicotínico (Na) a partir de nicotinamida (Nam) [6]. La Nam puede obtenerse por dos rutas: 1. Gracias a la acción de las enzimas que utilizan el NAD como sustrato (sirtuinas/ARTs, PARPs). 2. Mediante la degradación del ribósido de Nam por la enzima adenosina nucleósido hidrolasa.
2. El Na obtenido es transformado en el mononucleótido correspondiente (NAMN) por acción de la enzima NaPRT, cuyo candidato se identificó en el presente estudio (Tabla 6-14).
3. El NAMN es convertido en el dinucleótido NAAD por la enzima LbNMNAT, tal como lo demostraron nuestros resultados.
4. Finalmente, gracias a la acción de la enzima NAD sintasa, el NAAD es transformado en NAD.

La síntesis de NAD a partir del precursor Na, vía conocida como ruta Preiss-Handler, también ha sido descrita en el parásito intracelular *P. falciparum* [92].

7.4. Detección de la proteína LbNMNAT

El presente trabajo señala, por primera vez, la localización intracelular de la proteína NMNAT en promastigotes de distintas especies del género *Leishmania*. Empleando anticuerpos anti His-LbNMNAT generados en modelos murinos y aviares, se detectó una banda de ~ 22 kDa en diferentes tipos de extractos proteicos de promastigotes de

Leishmania del Nuevo y Viejo Mundo. Los resultados observados se validaron utilizando anticuerpos generados contra otras NMNATs. Específicamente, se usó el anticuerpo anti His-TcNMNAT debido al alto porcentaje de identidad (40%) entre las proteínas LbNMNAT y TcNMNAT.

El peso molecular de la señal detectada (~ 22 kDa) es menor al peso molecular teórico de la proteína LbNMNAT (33.7 kDa). En estudios previos, realizados en nuestro grupo, se amplificó el fragmento codificante para la proteína en mención a partir de ADNc, obteniéndose un transcrito completo de 924 pb, el cual codifica una proteína de 33.7 kDa [132]. Por tal razón, sugerimos que el bajo peso molecular observado para la proteína LbNMNAT se debe a procesos de regulación postranscripcional. Bajo esta perspectiva, el peso molecular de la proteína LbNMNAT puede relacionarse con dos procesos: 1. Modificaciones postraduccionales (PTM). 2. Inicio alternativo de la traducción.

En el primer caso, se han reportado diversas PTM en otras NMNATs como palmitoilación (HsNMNAT-2) [53, 182], fosforilación (HsNMNAT-1) [183] y ADP-ribosilación (*S. cerevisiae* NMNAT) [184]. Sin embargo, ninguna de estas PTM genera un menor peso molecular en las proteínas modificadas cuando son analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot. Adicionalmente, no se han reportado mecanismos de procesamiento postraduccionales para las NMNATs.

La existencia de sitios de clivaje proteolítico potenciales en la proteína LbNMNAT, se verificó con la herramienta bioinformática PROSPER [185]. Se identificaron sitios de corte para metalo, aspártico, serina y cisteína proteasas, capaces de generar productos entre 20-25 kDa. A nivel experimental, se observó de manera recurrente un producto de degradación de la proteína His-LbNMNAT expresada en *E. coli* (Figuras 6-5 y 6-22). Adicionalmente, se detectaron productos de degradación de la proteína LbNMNAT-GFP expresada en *L. braziliensis* (Figura 6-41). Estas observaciones, permiten sugerir que la proteína LbNMNAT endógena del parásito sufre algún tipo de procesamiento postraduccionales. El punto de fragmentación exacto y el mecanismo asociado a este proceso debe ser determinado.

El reconocimiento de la estructura *cap* ubicada en el extremo 5' de la mayoría de los ARNm, es la piedra angular del mecanismo molecular que inicia la traducción. Sin

embargo, se han descrito ARNm que carecen de la estructura *cap* y que emplean mecanismos alternativos de inicio de la traducción. Entre estos mecanismos, se destacan los Sitios de Entrada Ribosomales Internos (IRES), localizados en las regiones 5'UTR que generan la traducción de distintos polipéptidos desde una única unidad transcripcional o ARNm [186]. Este mecanismo podría explicar el bajo peso molecular de la proteína LbNMNAT, no obstante, no se han descrito elementos IRES en los ARNm de *Leishmania*.

Un mecanismo adicional que podría explicar el bajo peso molecular de la proteína LbNMNAT, proviene de los resultados generados mediante perfil ribosomal (ribosome profiling). Esta técnica (descrita en el 2009) se basa en métodos de secuenciación de ARN y permite analizar exactamente el proceso de traducción [187]. Mediante perfiles ribosomales se han identificado isoformas truncadas de proteínas provenientes de procesos independientes de splicing. Dichas isoformas resultan al iniciar la traducción corriente abajo del sitio canónico de iniciación, lo cual genera “deleciones en marco” que dan lugar a proteínas funcionales [188]. Recientemente, se ha comenzado el estudio de perfiles ribosomales en Trypanosomátidos [189, 190]. El análisis mediante MS de la banda de 22 kDa (experimento en curso), podría generar información adicional para explicar el peso molecular de la proteína LbNMNAT.

7.5 Localización intracelular de la proteína LbNMNAT

La utilización de los anticuerpos anti His-LbNMNAT en ensayos de inmunodetección *in situ* y la expresión de la proteína LbNMNAT-GFP en *L. braziliensis*, permitieron observar un patrón de localización primordialmente citosólico de la NMNAT en promastigotes y amastigotes del parásito. Este patrón de localización se ha reportado para las NMNATs de otros organismos eucariotas como el ratón [162], la levadura [191] y para una de las isoformas de la NMNAT de *D. melanogaster* [80]. El NAD y el NADP sintetizados en el citoplasma pueden ser modificados para generar los agentes movilizadores de calcio ADP ribosa cíclica (cADPR) y dinucleótido de adenina y ácido nicotínico fosfato (NAADP), respectivamente, por acción de la enzima NAD glicohidrolasa [30].

Es importante mencionar que el NAD no solo participa en el metabolismo energético, sino también en eventos de regulación celular mediados por diversas clases de proteínas

como sirtuinas, ARTs y PARPs [45]. Previas investigaciones han reportado ortólogos de sirtuinas distribuidos en el citoplasma de promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* [86], *L. infantum* [7] y *L. major* [88]. Adicionalmente, la nicotinamidasas, enzima de la vía de reciclaje del NAD, se localiza en el citoplasma del parásito [6]. Las anteriores evidencias, aunadas al hecho de que no se han reportado enzimas capaces de emplear el NAD como sustrato en el núcleo del parásito, se ajustan con la distribución reportada para la NMNAT de *Leishmania*. Sin embargo, es necesario mencionar que los 2 candidatos identificados en el presente trabajo para proteínas PARPs de *L. braziliensis* (Tabla 6-14), presentan una localización nuclear según las predicciones realizadas con la herramienta Euk-mPLOC 2.0.

Esta observación sugiere que el NAD sintetizado en el citoplasma por la proteína LbNMNAT debería ser transportado hacia otros compartimentos celulares. Los Trypanosomátidos presentan distintos organelos donde se efectúan procesos metabólicos que requieren NAD. Tal es el caso de la mitocondria en la que se realiza la fosforilación oxidativa y el glicosoma, organelo relacionado con la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y la oxidación de ácidos grasos [84, 85]. Para suplir las necesidades del NAD en estos organelos, deben existir mecanismos para transportarlo desde el citoplasma. En *S. cerevisiae* y *A. thaliana* se han descrito transportadores de NAD, a través de los cuales el NAD es transportado hacia la matriz mitocondrial y del cloroplasto [152, 153].

Mediante la estrategia computacional implementada en este estudio, se identificaron 3 candidatos para transportadores de NAD en *L. braziliensis* (Tabla 6-14), cuya localización peroxisomal/glicosomal predicha debe confirmarse experimentalmente. El estudio de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), la cual oxida el NADH a NAD⁺, demostró una localización glicosomal para la misma en *L. mexicana*, reforzando la hipótesis sobre la existencia de transportadores de NAD en dicho organelo [192]. De manera adicional, se ha demostrado la existencia de transportadores de nucleótidos (NSTs) en las membranas del aparato de Golgi de *L. donovani* [193] y *L. major* [194].

El poder reductor del NAD generado en el citoplasma, puede transferirse hacia la matriz mitocondrial empleando sistemas lanzadera como la lanzadera malato-aspartato. La localización mitocondrial de las enzimas esenciales de esta lanzadera, malato

deshidrogenasa [195] y aspartato aminotransferasa, ha sido demostrada en *L. major* [82]. Con respecto a la localización nuclear del NAD, se ha sugerido que la concentración nuclear y citosólica de NAD se encuentra en equilibrio por mecanismos de difusión entre estos dos compartimentos celulares [108].

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren una localización citosólica de la proteína LbNMNAT, indicando el sitio de síntesis del NAD en el parásito *L. braziliensis*. Una vez sintetizado, el NAD puede transportarse hacia diferentes organelos del parásito empleando diversos mecanismos.

7.6 Relevancia funcional de las inserciones exclusivas de la proteína LbNMNAT

El análisis de la estructura primaria de las NMNATs de eucariotas superiores, ha revelado que estas proteínas han adquirido inserciones específicas relacionadas con su regulación funcional mediante PTM y localización intracelular. Este tipo de inserciones se han identificado y estudiado en las iso-enzimas humanas HsNMNAT1-3 [53].

Con el ánimo de identificar este tipo de elementos en la proteína LbNMNAT, se analizó su estructura primaria generando alineamientos múltiples. Dicho análisis reveló la existencia de 5 inserciones exclusivas y de tamaño variable a lo largo de la proteína LbNMNAT. Estas inserciones son altamente conservadas entre las NMNATs del género *Leishmania* y algunas de ellas podrían experimentar fosforilación (Figura 6-44).

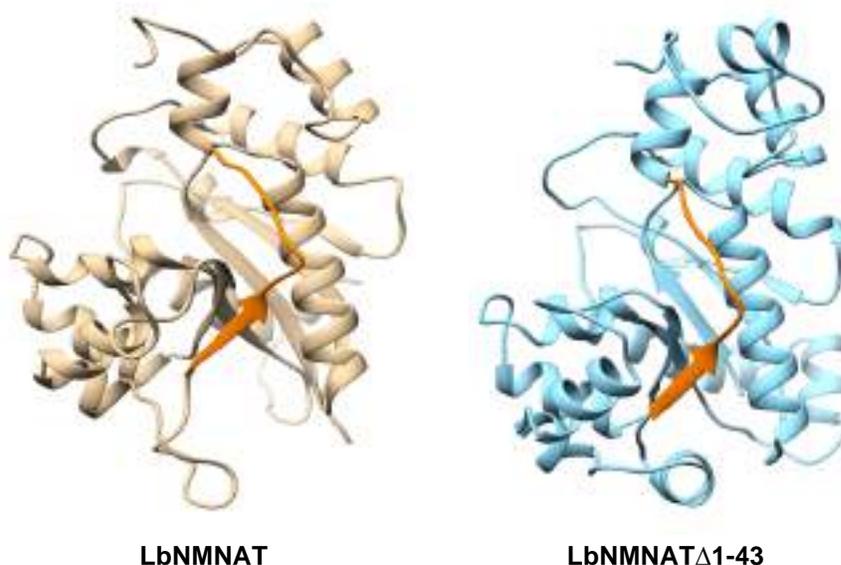
Entre las inserciones identificadas se destacó aquella localizada hacia el extremo amino terminal, la cual presenta 35 residuos de longitud. El impacto funcional que ejerce dicha inserción sobre la actividad catalítica de la proteína LbNMNAT, se investigó mediante la producción de una proteína recombinante truncada en el extremo amino terminal (His-LbNMNAT Δ 1-43). La actividad catalítica de dicha proteína se evaluó por ensayos enzimáticos acoplados y directos, los cuales revelaron que la inserción amino terminal es indispensable para la síntesis de NAD (Figura 6-46).

El efecto funcional generado por la inserción amino terminal de la proteína LbNMNAT es diferente del efecto generado por las inserciones propias de las iso-enzimas humanas

HsNMNAT1-3. En estas últimas proteínas, la remoción de sus inserciones exclusivas no afecta la actividad catalítica sino la localización de las mismas [53, 196].

La deleción $\Delta 1-43$ afectó la disposición espacial de las cadenas laterales de los residuos de la proteína LbNMNAT involucrados en la interacción con el ATP (Figura 6-47). Este cambio estructural explicaría la pérdida de la actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT $\Delta 1-43$. Debido a que el elemento estructural requerido para el establecimiento de estructuras cuaternarias no se afectó en dicha proteína (Figura 7-2), su capacidad para establecer ensamblajes oligoméricos se conservó.

Figura 7-2: El modelo tridimensional de la proteína LbNMNAT $\Delta 1-43$ conserva el elemento estructural necesario para establecer oligómeros. En naranja se indica el elemento estructural requerido para establecer estructuras cuaternarias en los modelos predictivos de la proteína LbNMNAT y LbNMNAT $\Delta 1-43$ generados por el método de homología. Imágenes generadas con el programa UCSF Chimera [73].



La relevancia funcional de la inserción amino terminal de la proteína LbNMNAT, permite sugerirla como un potencial blanco farmacológico. En este sentido, podrían diseñarse inhibidores específicos capaces de afectar la actividad enzimática de la proteína LbNMNAT sin interferir con la actividad de las iso-enzimas humanas HsNMNAT1-3. Por

otro lado, las inserciones exclusivas de la proteína LbNMNAT permiten su implementación como marcador molecular.

La participación de las 5 inserciones exclusivas de la proteína LbNMNAT en procesos de localización intracelular y PTM, se puede investigar aprovechando el plásmido de expresión pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP construido en este trabajo. Puntualmente, se podrían deletar las inserciones exclusivas de la LbNMNAT contenida en dicho plásmido, evaluando el efecto *in vivo* de las mismas en el parásito.

7.7 Expresión genética de la NMNAT en *L. braziliensis*

Los organismos pertenecientes al género *Leishmania* exhiben complejos ciclos de vida en los que el parásito experimenta procesos de diferenciación celular regulados por cambios en sus perfiles de expresión genética [197]. A diferencia de la mayoría de organismos, los mecanismos que regulan la expresión genética en Trypanosomátidos no operan a nivel transcripcional.

Estos organismos transcriben, gracias a la acción de la ARN polimerasa II, los genes codificantes para proteínas en unidades poli-cistrónicas, desde las cuales se obtienen ARNm independientes mediante procesos de trans-splicing. Este proceso se realiza entre los genes del policistrón y un mini-exón, denominado “*splice leader*”, que conlleva la estructura *cap*. Por su parte, la ARN polimerasa I transcribe mayoritariamente ARNs ribosomales, mientras que la ARN polimerasa III sintetiza ARNs nucleares pequeños (ARNsn) y ARNs de transferencia (ARNt) [198].

La maquinaria de transcripción de los Trypanosomátidos es reducida, siendo la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y el complejo proteico activador nuclear pequeño (SNAPc), los únicos factores de transcripción caracterizados en detalle. Aunque no se han identificado promotores clásicos como los elementos iniciadores (Inr) o la caja TATA, se ha observado que los factores de transcripción TBP y SNAPc se asocian a regiones cromosómicas donde la histona 3 (H3) se encuentra acetilada. Usualmente, la H3 acetilada se localiza en todas las regiones de cambio de hebra (strand-switch), justo donde comienza la transcripción policistronica en los Trypanosomátidos [198, 199].

La acetilación de histonas es una reacción catalizada por histona acetil transferasas (HAT), enzimas que se han descrito en *T. cruzi* [200–202]. Por el contrario, la deacetilación de estas proteínas es una reacción catalizada por histona acetil deacetilasas (HDAC) como las sirtuinas, enzimas que se han descrito en diversas especies de Trypanosomátidos [7, 40, 44, 88]. Teniendo en cuenta que los estados de acetilación de H3 dependen de la actividad de las enzimas HAT y HDAC, se ha propuesto que la remodelación de la cromatina representa un mecanismo de regulación transcripcional de la expresión genética en estos organismos.

Adicionalmente, se han descrito mecanismos de regulación post-transcripcional que modifican la estabilidad de los ARNm y, por lo tanto, los niveles proteicos correspondientes en Trypanosomátidos [198]. De este modo, es posible detectar cantidades variables de un ARNm específico y de la proteína codificante respectiva, entre diferentes condiciones fisiológicas del parásito [203].

Los mecanismos que determinan la estabilidad de los ARNm en los Trypanosomátidos son similares a los que poseen levaduras y mamíferos. Estos mecanismos comienzan en las regiones 3'UTR, en donde proteínas reguladoras promueven la deadenilación de los transcritos. La transición de una cola poli A larga hacia una cola oligo A corta, promueve la remoción de la estructura *cap*. Luego, los ARNm son degradados en sentido 5'-3' y 3'-5' por exonucleasas citoplasmáticas y el exosoma, respectivamente [204]. La intervención de ARNs no codificantes (ncRNAs) es un mecanismo de regulación post-transcripcional adicional que regula la abundancia de diferentes ARNm a lo largo del ciclo de vida de los Trypanosomátidos [205, 206].

Con el objetivo de estudiar los niveles de expresión genética de la LbNMNAT a lo largo del ciclo de vida de *L. braziliensis*, se usaron diferentes técnicas experimentales. Inicialmente, se analizó el transcrito *lbnmnat* mediante RT-PCR en promastigotes, comparando su nivel de expresión con aquellos de genes estudiados con anterioridad (*gsh1* y *sap*). A nivel de ARNm y en comparación con los genes *gsh1* y *sap*, el gen de interés *lbnmnat* exhibió diferencias (Figura 6-52). La aproximación por RT-PCR para el estudio del transcrito *lbnmnat*, también se implementó en amastigotes derivados de macrófagos murinos infectados *in vitro*. Sin embargo, no se logró la amplificación de los genes del amastigote. Por esta razón, se intentó cuantificar el transcrito *lbnmnat*

mediante una técnica más sensible: RT-qPCR, estrategia que resultó igualmente infructuosa. Porcentajes bajos de infección podrían explicar estos resultados.

El modelo de infección *in vitro* impone una dificultad técnica que impide obtener el ARNm del macrófago y del amastigote por separado. Aunque este modelo permite la cuantificación confiable de transcritos propios del macrófago, resulta difícil para la cuantificación de los ARNm del parásito. Por esta razón, numerosos autores han empleado amastigotes axénicos y/o amastigotes provenientes de lesiones generadas en modelos mamíferos para cuantificar transcritos del parásito [145].

Aunque en nuestro caso resultaría apropiado cuantificar el transcrito *lbnmnat* en este tipo de amastigotes, en la actualidad se dispone de datos de expresión transcripcional para dicho gen en los distintos estadios de diferenciación del parásito (Figura 6-53). Los datos reportados para varias especies de *Leishmania*, indican que los niveles del transcrito *nmnat* son similares entre promastigotes y amastigotes (axénicos y/o derivados de lesiones). Estos resultados, congruentes con aquellos observados en el presente estudio a nivel de proteína (Figura 6-54), reflejan la importancia de la NMNAT a lo largo del ciclo de vida del parásito.

El empleo de azúcares, aminoácidos y ácidos grasos como fuente de carbono por parte de *Leishmania*, independientemente de su estadio de diferenciación, requiere la activación de diversas rutas bioquímicas como la glucólisis, el ciclo de los TCA y la β -oxidación, en las cuales participa el NAD [97]. Adicionalmente, el estrés oxidativo al que se somete el parásito a lo largo de su ciclo de vida, requiere la regeneración continua del tripanotión, proceso que depende del NADP [96].

Los Trypanosomátidos emplean mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo. Estos sistemas, basados en la oxido-reducción continua del tripanotión, se caracterizan por ser NADP-dependientes. Teniendo en cuenta esta evidencia, planteamos la siguiente hipótesis: el estrés oxidativo genera una alta demanda de NAD en el parásito. Para comprobar esta idea, analizamos la expresión de la NMNAT en promastigotes de *L. braziliensis* expuestos a concentraciones IC_{50} de H_2O_2 (1.3 mM). Los experimentos efectuados demostraron que los niveles de expresión del transcrito *lbnmnat* no varían

ante el estrés oxidativo. No obstante, a nivel traduccional se observó una reducción de la cantidad de proteína LbNMNAT ante el tratamiento con H₂O₂ (Figuras 6-56 y 6-57).

De acuerdo con estos resultados, no es posible rechazar o aceptar la hipótesis planteada. En este sentido el NAD requerido por el parásito sometido a estrés oxidativo, podría obtenerse por vías diferentes a la sobre-expresión de la proteína LbNMNAT, por ejemplo, importándolo desde la célula hospedera. Adicionalmente, dado que los sistemas de defensa ante el estrés oxidativo dependen del NADP, sería interesante analizar los niveles de expresión de la enzima NAD quinasa en los parásitos tratados con H₂O₂. En la actualidad se emplean diversos métodos para cuantificar el NAD(P) intracelular, como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) [29], técnica que podría implementarse para cuantificar el NAD(P) en *Leishmania* bajo distintas condiciones experimentales.

Finalmente, con el propósito de evaluar el efecto que genera la sobre-expresión de la proteína LbNMNAT sobre la viabilidad celular del parásito ante el estrés oxidativo, se podrían utilizar las líneas celulares de *L. braziliensis* transfectadas con el plásmido de expresión pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP, obtenidas en el presente trabajo.

7.8 Reconstrucción del metabolismo del NAD en *Leishmania*

Las rutas de síntesis, degradación y transporte del NAD y sus precursores en *Leishmania*, se reconstruyeron empleando herramientas bioinformáticas (BLASTP y TBLASTN). Esta aproximación permitió identificar proteínas involucradas en las vías de reciclaje y *de novo* de síntesis del NAD, junto con proteínas implicadas en su degradación, modificación y transporte. Sin embargo, algunas de las proteínas buscadas no pudieron ser identificadas. Con respecto a este resultado, se pueden sugerir dos posibilidades: 1. El parásito realmente no posee las proteínas en mención. 2. La aproximación bioinformática aplicada es incapaz de identificar dichas proteínas. En este último caso podrían implementarse búsquedas minuciosas empleando herramientas de identificación más sofisticadas [207].

La red metabólica propuesta en el presente estudio, reveló que la biosíntesis del NAD en *Leishmania* es un proceso complejo que ofrece múltiples puntos de regulación (Figura 6-58). La alteración del metabolismo del NAD en otros organismos patogénicos, afecta de manera negativa diversos aspectos del proceso de infección. Por ejemplo, bacterias del género *Brucella* mutantes en el gen codificante para la nicotinamidasasa, son incapaces de replicarse intracelularmente [208]. Por su parte, la levadura *Candida glabrata* depende de la utilización de NR como precursor de NAD para establecer infecciones sistémicas [209]. Estas evidencias junto con las múltiples funciones descritas para el NAD [5], han constituido su proceso biosintético como un potencial blanco farmacológico [50, 51, 181].

Mediante el análisis de la estructura primaria de la proteína NMNAT de diversas especies del género *Leishmania*, se identificaron inserciones altamente conservadas que no se encuentran en las iso-enzimas humanas HsNMNAT1-3. La delección de la inserción ubicada en el extremo amino terminal de la proteína LbNMNAT, afectó negativamente su capacidad catalítica (Figura 6-46). Dos observaciones adicionales fortalecen la idea de enfocar la biosíntesis del NAD como un blanco potencial en *Leishmania*: 1. Hasta el momento hemos identificado una única NMNAT, razón por la que se atacaría un solo blanco molecular. 2. La proteína LbNMNAT se expresa tanto en promastigotes como amastigotes (Figura 6-53), siendo un blanco vulnerable en cualquier momento del ciclo biológico del parásito.

Igualmente, en otros parásitos eucariotas intracelulares como *T. cruzi* y *P. falciparum* se ha reportado la existencia de una única NMNAT [92, 93]. En este último caso, la inhibición de la NMNAT reduce la capacidad del parásito para multiplicarse y proseguir con su ciclo biológico, reforzando la noción sobre la NMNAT como un excelente blanco farmacológico.

8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusiones

Se estudió el metabolismo del NAD en el parásito *L. braziliensis*, enfocando nuestra atención en la enzima central implicada en su biosíntesis, la proteína NMNAT. Las evidencias bioinformáticas y experimentales obtenidas, indicaron diferencias notables entre la NMNAT del parásito y los homólogos humanos HsNMNAT1-3. Dichas diferencias se relacionan con la organización oligomérica, los parámetros cinéticos, las inserciones exclusivas y la localización intracelular de las proteínas en mención. En conjunto, nuestros resultados revelaron que el proceso de biosíntesis del NAD en *Leishmania* es un blanco farmacológico promisorio.

8.1.2 Conclusiones específicas

Se implementaron 3 estrategias experimentales para favorecer la solubilidad de la proteína His-LbNMNAT:

- A. Expresión en diferentes sistemas bacterianos.
- B. Co-expresión con chaperonas moleculares.
- C. Expresión desde el plásmido pQE30.

Las dos últimas estrategias resultaron exitosas.

Se purificó la proteína His-LbNMNAT mediante diversas técnicas bajo condiciones nativas o desnaturalizantes: Purificación parcial por IMAC.

- A. Purificación a homogeneidad por acople IMAC/SEC.
- B. Purificación parcial por solubilización de Cl.
- C. Purificación por acople solubilización de Cl/SDS-PAGE preparativo.

Se determinó la organización estructural de la proteína His-LbNMNAT utilizando diferentes métodos:

- A. Organización monomérica según SEC.
- B. Organización oligomérica según gráficos de Ferguson (2, 3 y 6-mer).

Se caracterizó enzimáticamente la proteína His-LbNMNAT, incluyendo diversos aspectos:

- A. Concentración de trabajo, almacenamiento y termo-estabilidad.
- B. Sistemas de amortiguación, pH óptimo y temperatura óptima de actividad.
- C. Cofactores enzimáticos requeridos para la catálisis.
- D. Constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidad máxima (V_{max}), número de recambio (K_{cat}) y constante de equilibrio (K_D).
- E. Síntesis de NAAD a partir de los sustratos NAMN y ATP.

Se inmunodetectó la proteína LbNMNAT en diferentes extractos proteicos preparados con promastigotes de diversas especies de *Leishmania*. En todos los casos se observó una banda de menor peso molecular al esperado (~22 vs 33,7 kDa).

Se estableció la localización intracelular de la proteína LbNMNAT (proteína de ~22 kDa) en parásitos de *L. braziliensis*:

- A. Localización citosólica de la proteína endógena LbNMNAT en promastigotes.
- B. Localización citosólica de la proteína recombinante LbNMNAT-GFP en promastigotes y amastigotes intracelulares.

Se identificaron 5 inserciones exclusivas y conservadas en la proteína NMNAT del género *Leishmania*. La inserción amino terminal es indispensable para la actividad enzimática de la proteína recombinante His-LbNMNAT.

Se observó que la abundancia del transcrito *lbnmnat* y la proteína correspondiente, no varían a lo largo del ciclo biológico del parásito. En contraste, la cantidad de proteína LbNMNAT disminuye en promastigotes sometidos a estrés oxidativo.

Se reconstruyó la red metabólica del NAD en *Leishmania*, la cual indicó que la síntesis, degradación y transporte del NAD y sus precursores, son procesos complejos en los que participan numerosas enzimas e intermediarios químicos.

8.2 Recomendaciones

Indudablemente, los resultados presentados en esta disertación no solo ampliaron el conocimiento sobre el metabolismo del NAD en el contexto del parásito *L. braziliensis*, sino que también generaron preguntas interesantes que guiarán futuros estudios.

En términos estructurales, se observó que la proteína His-LbNMNAT establece diferentes organizaciones oligoméricas según PAGE y gráficos de Ferguson. Con el objetivo de corroborar la funcionalidad catalítica de dichas organizaciones, sería interesante implementar otras técnicas analíticas. Por esto, se iniciaron ensayos de dispersión dinámica de la luz (DLS) empleando la proteína His-LbNMNAT en ausencia o presencia de los sustratos ATP y NMN. Resultados preliminares han mostrado que el radio hidrodinámico de la proteína recombinante varía cuando es analizada en presencia de ATP. Experimentos de cromatografía de exclusión molecular en presencia de dicho sustrato, complementarían el estudio de la estructura cuaternaria de la proteína His-LbNMNAT.

En cuanto a las propiedades cinéticas de la proteína His-LbNMNAT, se requerirá trabajo adicional para determinar sus parámetros enzimáticos por el sustrato NAMN, realizando comparaciones con aquellos obtenidos para el NMN. El diseño y evaluación de inhibidores de la proteína His-LbNMNAT basados en la estructura del ATP (dada la alta afinidad que exhibe la proteína por el mismo), será el mayor desafío que dará inicio al desarrollo de posibles nuevas estrategias de control del patógeno.

De acuerdo con las observaciones realizadas en el presente trabajo, la proteína LbNMNAT endógena exhibe un peso molecular menor al esperado (~ 22 vs 33,7 kDa) en especies de *Leishmania* del Nuevo como del Viejo Mundo. Comprobar la identidad de dicha proteína mediante espectrometría de masas (huella peptídica), representa el primer paso para comprender los mecanismos de procesamiento que operan sobre la proteína de interés. Actualmente, se están adelantando los análisis correspondientes de la proteína de ~ 22 kDa inmunoprecipitada desde el extracto proteico soluble del parásito.

El análisis de la estructura primaria de la proteína LbNMNAT reveló la existencia de 5 inserciones exclusivas. La delección completa de la inserción amino terminal abolió la

actividad enzimática de la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43. La generación de deleciones cortas al interior de dicha inserción permitirá la identificación de la secuencia exacta necesaria para la actividad catalítica de la proteína LbNMNAT. Adicionalmente, el vector de expresión pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP construido en este trabajo servirá como material de partida para generar deleciones de las inserciones exclusivas mencionadas y estudiar su relevancia funcional *in vivo* en líneas celulares transfectadas del parásito. Similarmente, el efecto que ofrece la sobre-expresión de la proteína LbNMNAT-GFP en las líneas celulares transfectadas, puede ser investigado en promastigotes sometidos a estrés oxidativo.

La identificación de las proteínas candidato involucradas en diversos procesos del metabolismo del NAD de *Leishmania*, tales como transporte, biosíntesis, degradación y modificación, indica numerosas rutas de exploración científica a recorrer.

A modo de recomendación, se sugiere la utilización de amastigotes axénicos para la cuantificación de transcritos del parásito mediante las técnicas RT-PCR y RT-qPCR.

Anexo A: Mapa, análisis y secuencia del plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT (LC 1).

LC: Luis Contreras. Figura generada con el programa SnapGene Viewer.



En seguida se presenta el análisis de la secuencia del plásmido pQE30-LbNMNAT (LC 1):

Letras azules: codón de inicio, **Letras rosadas:** etiqueta 6xHis, **Letras rojas:** sitio de múltiple clonación, **Letras naranjadas:** fragmento *lbnmnat*, **Resaltado en verde:** en la base de datos del NCBI se reportó una G en esta posición, **Subrayado:** secuencia verificada mediante secuenciamiento de ADN.

CTCGAGAAATCATAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTC
AATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTA**ACTATG**
AGAGGATCG**CATCACCATCACCATCACGGATCCATGTTATCCTCTACTGCTGCCCC**
CTATGCATTGAGGACGGACAAGCTAAAGCCACTTGAGGGCTGCGCAGCTAGTTGC
CCCACCTCAACTGCAGAAGCGGCATCACAAGTTACACCCTTACTGCAGCCGGTGC
TTCTCGTCATCTGCGGCAGTTTTAACCCCATCCACAACGCGCATCTAAAGCTTTAC
GACGCCGCGAAACGATCCATAGAGGGCGTTGATGGCCGTGTGGTTCTTGGCGGCT
TCCTTTCACCTGTCGGTGACGCCTACGGCAAACCGGGATTGCGCTGTGCGGCTGA
TCGTGTGCAGGTCATGGAGAAGGCACTTTGTCACCACCCTGAACTCAATGTCGACA
CGTGGGAGTGCCAGCAGCCCACGTACACGCGCACCTTCTTTGTGCTGCGCGCGCT
GGAGGAGCACGTCAACGCTTGGTATGCTCAATCGGAGCCAGCGGCCATGGAGTG
GCTTACCTCGCATGGACGCCACGTGCGCGTTGTTTTCGCATGTGGCGCCGATCTCT
TCTTCTCCTTTTGGCGCCAGGCTGCTGGTTCGCTGTGCCTGCTGCGACAACCTCCTC
GACTCCTTCCCGCTGGTTGTTGTCCAACGCGGGCGGTGCTCGAGGCAACATCAGCG
ACTCCGATGACTTCGCGCGTGTGTGCCAGACGGCTCCGCTTCTGTGGGAGACGGC
GGAGGATGGAGAGAGAATTGAGATCGACATGTTGCGATATACCTTTACTTTTCGCGG
CCTTTTCCGTGCCCGACGACATCCTCGACAGCAGTGCGGAATGCGGTGATGGA
ACTTGCAAAGATGCCGGTAGACGAAGTGACGGCGCGCACAGCGCTGCAGTCGCG
TCTCCGCACCATGCTCCCCGAGGCG**A****CAATCCAGCTGGTGGTGGATCTCTACGGA**
GAGGGGCTTCCGTCCTGAGGTACCCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGC
TGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTT
GTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGCT
TGCGGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATA
CCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGT
TGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACC
GTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCTTGCCCCGCTGA
TGAATGCTCATCCGGAATTTTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGTATGGG
ATAGTGTTACCCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCT
CTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTGCAAGATGT
GGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTT
TTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATA
TGGAACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACA
AGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAGGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATG
TCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCG
TAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGGGTAATGACTCTCTAGC
TTGAGGCATCAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATC
TGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCCTCTAGAGCTGCC
TCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACG

GTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGGCGCGT
CAGCGGGTGTGGCGGGTGTCTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAG
CGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCAC
CATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCG
CTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGTTCGGGCTGCGGCGAG
CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACG
CAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCC
GCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGA
CGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCC
CCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACC
TGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGT
ATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC
GTTACAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA
AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAG
GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGT
TGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTG
CAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCT
ACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAG
ATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAA
TCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC
ACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGCTG
TAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACC
GCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAA
GGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATT
GTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTG
CCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTTGGTATGGCTTCATTACAGCT
CCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG
GTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGTATCA
CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCT
TTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCACTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC
CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAACT
TTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTAC
CGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCAT
CTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAA
AAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATA
TTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTT
AGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACG
TCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCC
CTTTCGTCTTAC

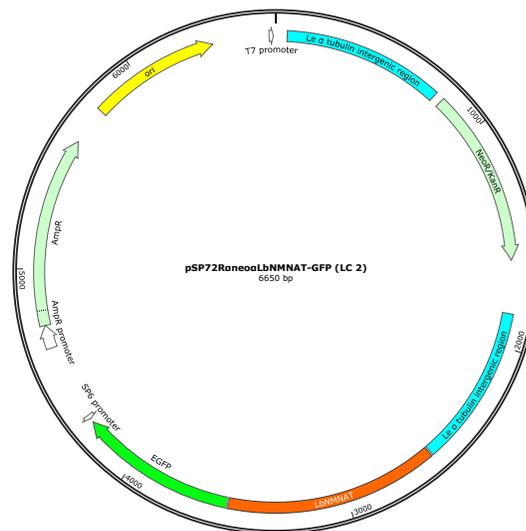
Peso molecular teórico de la proteína His-LbNMNAT: 37007.9 Da

Letra azul: primer aminoácido, Letras rosadas: etiqueta 6xHis, Letras naranjadas: proteína LbNMNAT, Letras negras: residuos adicionales resultantes de la estrategia de clonación.

**MRGSHHHH HHGSM LSS TAAPYALRTD KLKPLEGCAA SCPTSTAEAA
SQVTPLLQPV VLVICGSFNP IHNAHLKLYD AAKRSIEGVD GRVVLGGFLS
PVGDAYGKPG LRCAADRVQV MEKALCHH PELNVDTWEC QQPTYTRTFF
VLRAL EEHV N AWYAQSE PAA MEWLTSHG RHVRVVFACG ADLFFSFWRP
GCWSLCLLRQ LLDSFPLVVV QRGGARGNIS DSDDFARVCQ TAPLLWETAE
DGERIEIDMLRYTFTFAA FSVPDDTSST AVRNAVME LAKMPVDE VTARTALQSR
LRTMLPEA TIQLVVDLYG EGLPS***

Anexo B: Mapa del plásmido recombinante pSP72R α neo α LbNMNAT-GFP (LC 2).

LC: Luis Contreras. Figura generada con el programa SnapGene Viewer.



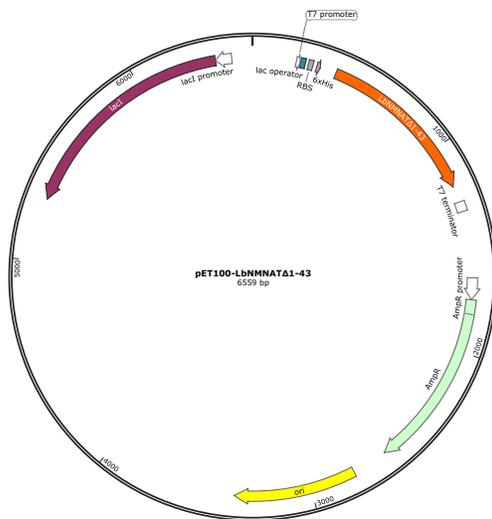
Peso molecular teórico de la proteína LbNMNAT-GFP: 60938.3 Da

Letras azules: primer aminoácido, Letras naranjadas: proteína LbNMNAT, Letras verdes: proteína GFP.

MLSSTAAPYALRTDKLKPLEGCAASCPTSTAEAAASQVTPLLQPVVLVICGSFNPIHNAHLKLYDA
 AKRSIEGVDGRVVLGGFLSPVGDAYGKPLRCAADRVQVMEKALCHHPELNVDTWECQQPTY
 TRTFVLRALEEHVNAWYAQSEPAAMEWLTSHGRHVRVVFACGADLFFSFWRPGCWSLCLLR
 QLLDSFPLVVVQRGGARGNISDSDDFARVCQTAPLLWETAEDGERIEIDMLRYTFTFAAFSVPDD
 TSSTAVRNAVMELAKMPVDEVTARTALQSRLRTMLPEAAIQLVVDLYGEGLPSSRMVSKGEELF
 TGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFTYGVQCFSR
 YPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILG
 HKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLST
 QSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK*

Anexo C: Mapa del plásmido recombinante pET100-LbNMNAT Δ 1-43.

Figura generada con el programa SnapGene Viewer.



Peso molecular teórico de la proteína His-LbNMNAT Δ 1-43: 33490.0 Da

Letra azul: primer aminoácido, Letras naranjadas: proteína LbNMNAT Δ 1-43, Letras negras: aminoácidos adicionales resultantes de la estrategia de clonación.

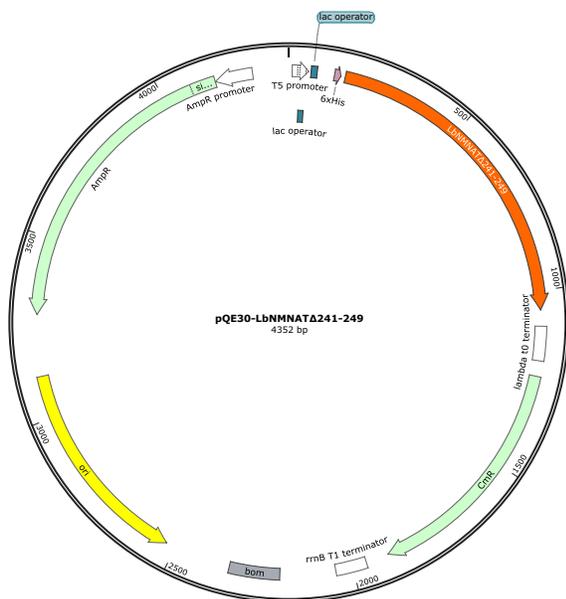
HHHHHH: etiqueta 6xHis

V: primer aminoácido proteína LbNMNAT Δ 1-43

MRGSHHHHHHGMASMTGGQMGRDLYDDDDKDHPFTVVLVICGSFNPIHNAHLKLYD
AAKRSIEGVDGRVVLGGFLSPVGDAYGKPLRCAADRQVMEKALCHHPELNVDTWE
CQQPTYTRTFFVLRAL EHVNAWYAQSEPAAMEWLTSHGRHVRVVFACGADLFFSF
RPGCWSLCLLRQLLDSFPLVVVQRGGARGNISDSDDFARVCQTAPLLWETAEDGERIE
IDMLRYTFTFAAFSVPDDTSSTAVRNAVMELAKMPVDEVTARTALQSRLRTMLPEAAIQ
LVVDLYGEGPLS*

Anexo D: Mapa del plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT Δ 241-249.

Figura generada con el programa SnapGene Viewer.



Peso molecular teórico de la proteína His-LbNMNAT Δ 241-249: 34261.0Da

Letra azul: primer aminoácido, Letras naranjadas: proteína LbNMNAT Δ 306-43, Letras negras: aminoácidos adicionales resultantes de la estrategia de clonación.

HHHHHH: etiqueta 6xHis

M: primer aminoácido proteína LbNMNAT Δ 241-249

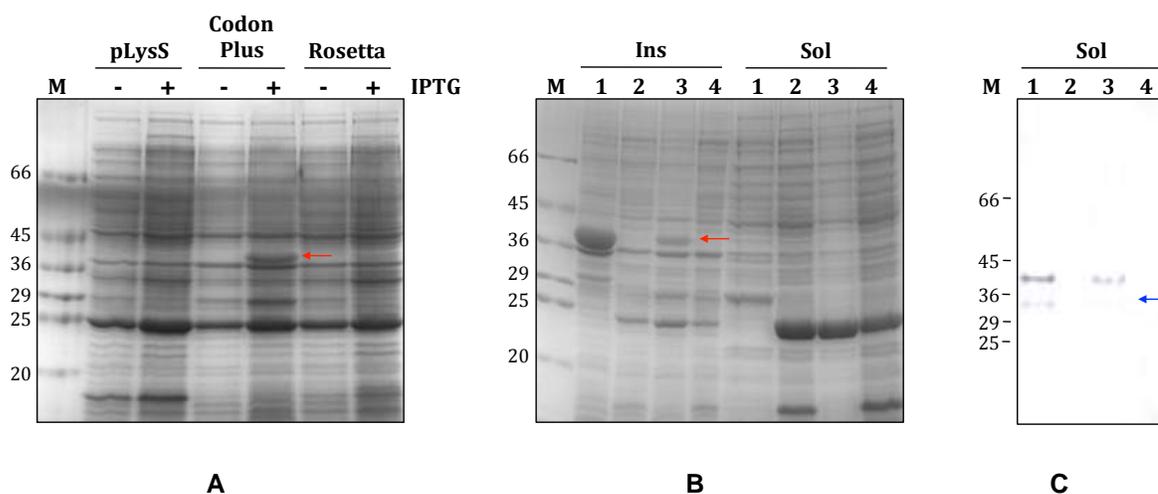
MRGS**HHHHHH**G**S**M**L**SSTAAPYALRTDKLKP**L**EGCAASCPTSTAEASQVTP**L**LQP**V**V
LVICGSFNPIHNAHLKLYDAAKRSIEGVDGRV**V**LGGFLSPVGD**A**YGK**P**GLRCAAD**R**VQ
VMEKALCHHP**E**LNVD**T**WECQ**Q**PTY**T**RTFFV**L**RA**L**EEHV**N**AWYAQSEPA**A**MEW**L**TS**H**
GRHVR**V**VFACGAD**L**FFS**F**WRPGC**W**SL**C**LLR**Q**LLDS**F**PL**V**V**V**Q**R**GGARG**N**ISD**S**DD**F**A
RVCQTAP**L**LWETAEDGERIEID**M**LSVPDD**T**SSTAV**R**NAV**M**ELAK**M**PVDE**V**TARTAL**Q**S
RLRT**M**L**P**EAA**I**QL**V**VD**L**YGE**G**L**P**S*

Anexo E: Expresión de la proteína recombinante His-LbNMNAT en diferentes sistemas de expresión bacterianos.

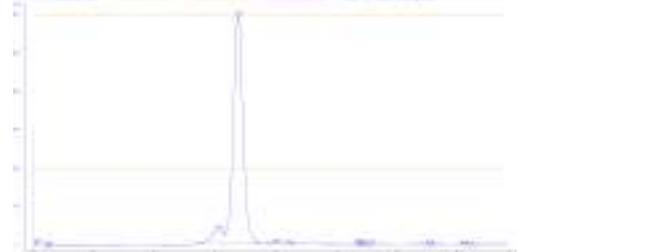
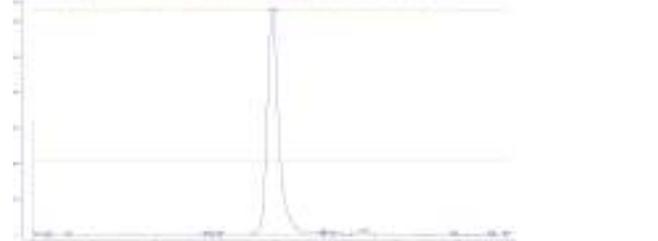
A. El plásmido recombinante pET100-LbNMNAT se utilizó para transformar distintas cepas de expresión. Las fracciones no inducidas (-) e inducidas (+) de los clones obtenidos se analizaron mediante SDS-PAGE 12%. Las flechas rojas indican la expresión de la proteína His-LbNMNAT en el sistema Codon Plus. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie.

B. Las fracciones insolubles (Ins) y solubles (Sol) provenientes de las cepas *E. coli* BL21 (DE3) (1), pLysS (2), Codon Plus (3) y Rosetta (4), transformadas con el plásmido recombinante pET100-LbNMNAT e inducidas se analizaron mediante SDS-PAGE 12%. Las proteínas se visualizaron con azul Coomassie.

C. Adicionalmente, las fracciones solubles mencionadas se analizaron mediante Western blot utilizando el anticuerpo primario anti-6xHis. Membrana PVDF. La flecha azul indica un producto de degradación de la proteína His-LbNMNAT. Sistema de revelado con fosfatasa alcalina. M, marcador de peso molecular en kDa.



Anexo F: Cromatogramas de proteínas patrón, inyectadas por separado, en la columna de exclusión molecular.

	<p>His-HsNMNAT-1 (33 kDa, 6-mer: 198 kDa)</p> <p>Cantidad inyectada: 200 µg</p> <p>Volumen de elución: 12,31 ml</p>
	<p>BSA (66 kDa)</p> <p>Cantidad inyectada: 550 µg</p> <p>Volumen de elución: 14,68 ml</p>
	<p>Anhidrasa carbónica (29 kDa)</p> <p>Cantidad inyectada: 122 µg</p> <p>Volumen de elución: 16,85 ml</p>
	<p>Lisozima (14 kDa)</p> <p>Cantidad inyectada: 500 µg</p> <p>Volumen de elución: 19,69 ml</p>
	<p>Azul dextrán</p> <p>Cantidad inyectada: 500 µg</p> <p>Volumen de elución: 8,22 ml</p>

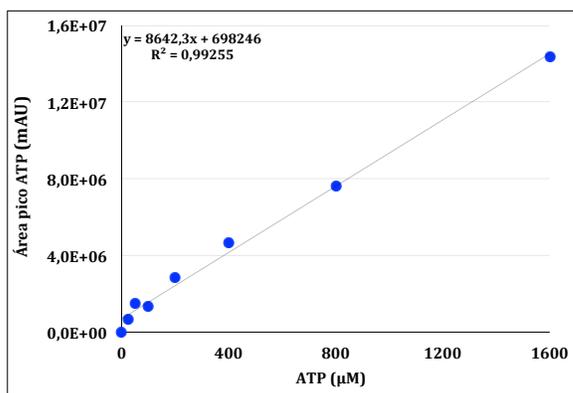
Anexo G: Curvas de calibración de ATP y NAD.

Estas curvas se utilizaron para cuantificar el ATP y el NAD producidos en los ensayos enzimáticos ejecutados para determinar los parámetros cinéticos y la constante de equilibrio de la proteína His-LbNMNAT.

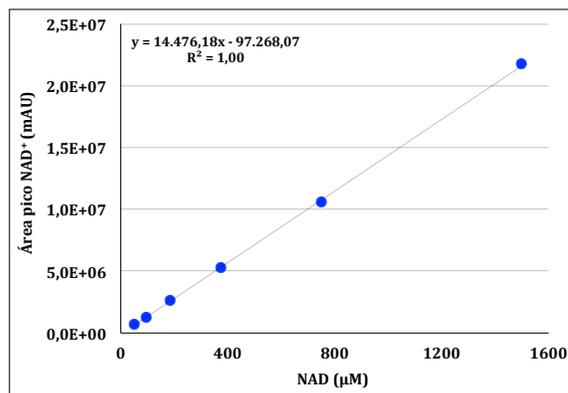
Las curvas de calibración se construyeron analizando por RP-HPLC diferentes cantidades de:

A. ATP.

B. NAD.



A



B

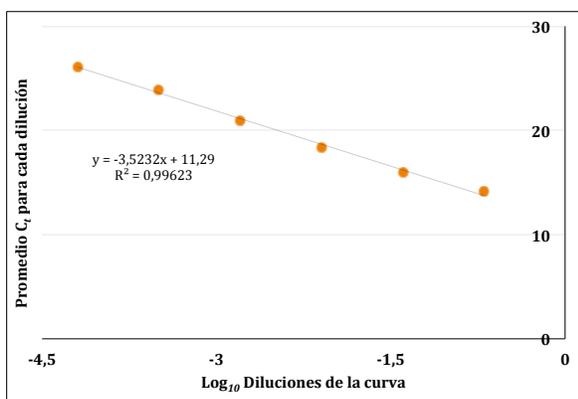
Anexo H: Curvas de calibración para los genes *40s* y *lbnmnat*.

Estas curvas se utilizaron para cuantificar en las muestras de promastigotes sin tratar y tratados con concentraciones IC₅₀ (1,3 mM) de H₂O₂, los transcritos de los siguientes genes :

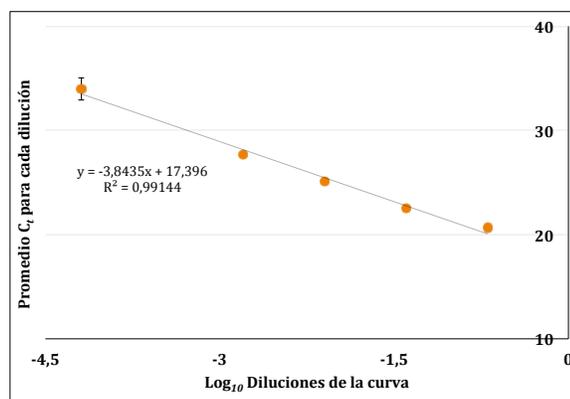
A. *40s*

B. *lbnmnat*

Los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$).



A



B

Bibliografía

1. Handman E (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 14:229–243. doi: 10.1128/CMR.14.2.229
2. Maes L, da Luz RAI, Cos P, Yardley V (2013) Classical versus novel treatment regimens. In: Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M (eds) *Drug Resist. Leishmania parasites, First*. Springer-Verlag, pp 301–319
3. Kumar A (2013) *Leishmania and Leishmaniasis, first*. Leishmania and Leishmaniasis. doi: 10.1007/978-1-4614-8869-9
4. Nikiforov A, Kulikova V, Ziegler M (2015) The human NAD metabolome: functions, metabolism and compartmentalization. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 50:284–297. doi: 10.3109/10409238.2015.1028612
5. Houtkooper RH, Cantó C, Wanders RJ, Auwerx J (2010) The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev* 31:194–223. doi: 10.1210/er.2009-0026
6. Gazanion E, Garcia D, Silvestre R, et al (2011) The *Leishmania* nicotinamidase is essential for NAD⁺ production and parasite proliferation. *Mol Microbiol* 82:21–38. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07799.x
7. Tavares J, Ouaiissi A, Santarém N, et al (2008) The *Leishmania infantum* cytosolic SIR2-related protein 1 (LiSIR2RP1) is an NAD⁺-dependent deacetylase and ADP-ribosyltransferase. *Biochem J* 415:377–386. doi: 10.1042/BJ20080666
8. Dolle C, Skoge RH, Vanlinden MR, Ziegler M (2013) NAD biosynthesis in humans - enzymes, metabolites and therapeutic aspects. *Curr Top Med Chem* 13:2907–2917.
9. Contreras LE, Neme R, Ramírez-Hernández MH (2010) Aproximación al metabolismo del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) en *Leishmania*. *Rev Asoc Colomb Ciencias Biológicas* 22:97–112.

10. Magill AJ (2015) Leishmania species: visceral (Kala-Azar), cutaneous, and mucosal Leishmaniasis. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds) Mand. Douglas, Bennett's Princ. Pract. Infect. Dis., eighth. Elsevier Saunders, pp 3091–3107
11. de Toledo JS, Vasconcelos EJR, Ferreira TR, Cruz AK (2010) Using genomic information to understand Leishmania biology. *Open Parasitol J* 4:156–166.
12. Mannaert A, Downing T, Imamura H, Dujardin J (2012) Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in Leishmania. *Trends Parasitol* 28:370–376. doi: 10.1016/j.pt.2012.06.003
13. Real F, Oliveira Vidal R, Falsarella Carazzolle M, et al (2013) The genome sequence of Leishmania (*Leishmania*) amazonensis: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Res* 20:567–581.
14. Peacock CS, Seeger K, Harris D, et al (2007) Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39:839–847. doi: 10.1038/ng2053
15. Llanes A, Restrepo CM, Del Vecchio G, et al (2015) The genome of Leishmania panamensis: insights into genomics of the L. (*Viannia*) subgenus. *Sci Rep* 5:8550. doi: 10.1038/srep08550
16. Cantacessi C, Dantas-Torres F, Nolan MJ, Otranto D (2015) The past, present, and future of Leishmania genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol* 31:100–108. doi: 10.1016/j.pt.2014.12.012
17. Ready PD (2013) Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol* 58:227–250. doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153557
18. McCall L-I, Mckerrow JH (2014) Determinants of disease phenotype in trypanosomatid parasites. *Trends Parasitol* 30:342–349. doi: 10.1016/j.pt.2014.05.001
19. Goto H, Lauletta Lindoso JA (2012) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* 26:293–307. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.001
20. Pigott DM, Bhatt S, Golding N, et al (2014) Global distribution maps of the leishmaniasis. *Elife* 2010:1–21. doi: 10.7554/eLife.02851
21. Croft SL, Coombs GH (2003) Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19:502–508. doi: 10.1016/j.pt.2003.09.008
22. Späth GF, Lye L-F, Segawa H, et al (2003) Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient Leishmania major. *Science* (80-) 301:1241–1243. doi:

10.1126/science.1087499

23. Späth GF, Garraway L a, Turco SJ, Beverley SM (2003) The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9536–9541. doi: 10.1073/pnas.1530604100
24. Cuervo P, Domont GB, De Jesus JB (2010) Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J Proteomics* 73:845–867. doi: 10.1016/j.jprot.2009.12.012
25. Martinez Cuesta S (2014) The chemistry and evolution of enzyme function: isomerases as a case study. University of Cambridge
26. Cantó C, Menzies KJ, Auwerx J (2015) NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metab* 22:31–53. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.023
27. Yamada K, Hara N, Shibata T, et al (2006) The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 352:282–285. doi: 10.1016/j.ab.2006.02.017
28. Yang H, Yang T, Baur J a., et al (2007) Nutrient-Sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. *Cell* 130:1095–1107. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.035
29. Trammell SA, Brenner C (2013) Targeted, LCMS-based metabolomics for quantitative measurement of NAD(+) metabolites. *Comput Struct Biotechnol J* 4:e201301012. doi: 10.5936/csbj.201301012
30. Berger F, Ramírez-Hernández MH, Ziegler M (2004) The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci* 29:111–118. doi: 10.1016/j.tibs.2004.01.007
31. Aredia F, Scovassi AI (2014) Poly(ADP-ribose): a signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochem Pharmacol* 92:157–163. doi: 10.1016/j.bcp.2014.06.021
32. David KK, Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL (2009) Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci* 14:1116–1128.
33. North BJ, Verdin E (2004) Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol* 5:224. doi: 10.1186/gb-2004-5-5-224
34. Schwer B, Verdin E (2008) Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell Metab* 7:104–112. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.006

35. Guse AH (2014) Calcium mobilizing second messengers derived from NAD. *Biochim Biophys Acta* 1854:1132–1137. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.015
36. Imai SI (2010) “Clocks” in the NAD World: NAD as a metabolic oscillator for the regulation of metabolism and aging. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1804:1584–1590. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.10.024
37. Belden WJ, Dunlap JC (2008) SIRT1 is a circadian deacetylase for core Clock components. *Cell* 134:212–214. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.010
38. Tonkin CJ, Carret CK, Duraisingh MT, et al (2009) Sir2 paralogue cooperate to regulate virulence genes and antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* 7:0771–0788. doi: 10.1371/journal.pbio.1000084
39. Guizetti J, Scherf A (2013) Silence, activate, poise and switch! Mechanisms of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Cell Microbiol* 15:718–26. doi: 10.1111/cmi.12115
40. Vergnes B, Sereno D, Tavares J, et al (2005) Targeted disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in *Leishmania* survival and proliferation. *Gene* 363:85–96. doi: 10.1016/j.gene.2005.06.047
41. Vergnes B, Sereno D, Madjidian-Sereno N, et al (2002) Cytoplasmic SIR2 homologue overexpression promotes survival of *Leishmania* parasites by preventing programmed cell death. *Gene* 296:139–150.
42. Ritagliati C, Alonso VL, Manarin R, et al (2015) Overexpression of cytoplasmic TcSIR2RP1 and mitochondrial TcSIR2RP3 impacts on *Trypanosoma cruzi* growth and cell invasion. *PLoS Negl Trop Dis* 9:1–22. doi: 10.1371/journal.pntd.0003725
43. Garcia-Salcedo JA, Gijon P, Nolan DP, et al (2003) A chromosomal SIR2 homologue with both histone NAD-dependent ADP-ribosyltransferase and deacetylase activities is involved in DNA repair in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 22:5851–5862. doi: 10.1093/emboj/cdg553
44. Alsford S, Kawahara T, Isamah C, Horn D (2007) A sirtuin in the african trypanosome is involved in both DNA repair and telomeric gene silencing but is not required for antigenic variation. *Mol Microbiol* 63:724–736. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05553.x
45. Magni G, Amici A, Emanuelli M, et al (2004) Enzymology of NAD⁺ homeostasis in man. *Cell Mol Life Sci* 61:19–34. doi: 10.1007/s00018-003-3161-1
46. Agledal L, Niere M, Ziegler M (2010) The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox Rep* 15:2–10. doi: 10.1179/174329210X12650506623122

47. Conforti L, Janeckova L, Wagner D, et al (2011) Reducing expression of NAD⁺ synthesizing enzyme NMNAT1 does not affect the rate of Wallerian degeneration. *FEBS J* 278:2666–2679. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08193.x
48. Hashida SN, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H (2007) Arabidopsis thaliana nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (AtNMNAT) is required for pollen tube growth. *Plant J* 49:694–703. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02989.x
49. Gerdes SY, Scholle MD, Souza MD, et al (2002) From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: examples in cofactor biosynthetic pathways. *J Bacteriol* 184:4555–4572. doi: 10.1128/JB.184.16.4555
50. Sorci L, Pan Y, Eyobo Y, et al (2009) Targeting NAD biosynthesis in bacterial pathogens: structure-based development of inhibitors of nicotinate mononucleotide adenylyltransferase NadD. *Chem Biol* 16:849–61. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.07.006
51. Chiarugi A, Dölle C, Felici R, Ziegler M (2012) The NAD metabolome—a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* 12:741–752. doi: 10.1038/nrc3340
52. Kornberg A (1950) Enzymatic synthesis of triphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* 182:805–813.
53. Lau C, Dölle C, Gossmann TI, et al (2010) Isoform-specific targeting and interaction domains in human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferases. *J Biol Chem* 285:18868–18876. doi: 10.1074/jbc.M110.107631
54. VanLinden MR, Dölle C, Pettersen IKN, et al (2015) Subcellular distribution of NAD⁺ between cytosol and mitochondria determines the metabolic profile of human cells. *J Biol Chem* 290:27644–27659. doi: 10.1074/jbc.M115.654129
55. Zhai RG, Rizzi M, Garavaglia S (2009) Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, new insights into an ancient enzyme. *Cell Mol Life Sci* 66:2805–2818. doi: 10.1007/s00018-009-0047-x
56. Lau C, Niere M, Ziegler M (2009) The NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) protein family. *Front Biosci* 14:410–431.
57. Mehl RA, Kinsland C, Begley TP (2000) Identification of the Escherichia coli nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase gene. *J Bacteriol* 182:15–18. doi: 10.1128/JB.182.15.4372-4374.2000.Updated
58. Raffaelli N, Pisani FM, Lorenzi T, et al (1997) Characterization of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase from thermophilic archaea. *Microbiology*

- 179:7718–7723.
59. Saridakis V, Pai EF (2003) Mutational, structural, and kinetic studies of the ATP-binding site of *Methanobacterium thermoautotrophicum* nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *J Biol Chem* 278:34356–34363. doi: 10.1074/jbc.M205369200
 60. Raffaelli N, Amici A, Emanuelli M, et al (1994) Pyridine dinucleotide biosynthesis in archaeobacteria: presence of NMN adenylyltransferase in *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Lett* 355:233–236. doi: 10.1016/0014-5793(94)01195-8
 61. Hunt L, Lerner F, Ziegler M (2004) NAD-New roles in signalling and gene regulation in plants. *New Phytol* 163:31–44. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01087.x
 62. Sorci L, Cimadamore F, Scotti S, et al (2007) Initial-rate kinetics of human NMN-adenylyltransferases: substrate and metal ion specificity, inhibition by products and multisubstrate analogues, and isozyme contributions to NAD⁺ biosynthesis. *Biochemistry* 46:4912–4922.
 63. Sershon VC, Santarsiero BD, Mesecar AD (2009) Kinetic and X-ray structural evidence for negative cooperativity in substrate binding to nicotinate mononucleotide adenylyltransferase (NMAT) from *Bacillus anthracis*. *J Mol Biol* 385:867–888. doi: 10.1016/j.jmb.2008.10.037
 64. Copeland RA (2000) *Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis, SECOND EDI.* WILEY-VCH, Inc.
 65. D'Angelo I, Raffaelli N, Dabusti V, et al (2000) Structure of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase: a key enzyme in NAD⁺ biosynthesis. *Structure* 8:993–1004.
 66. Pfoh R, Pai EF, Saridakis V (2015) Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase displays alternate binding modes for nicotinamide nucleotides. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 71:2032–2039. doi: 10.1107/S1399004715015497
 67. Zhang X, Kurnasov O V, Karthikeyan S, et al (2003) Structural characterization of a human cytosolic NMN/NaMN adenylyltransferase and implication in human NAD biosynthesis. *J Biol Chem* 278:13503–13511. doi: 10.1074/jbc.M300073200
 68. Rodionova I a., Zuccola HJ, Sorci L, et al (2015) Mycobacterial nicotinate mononucleotide adenylyltransferase. *J Biol Chem* 290:7693–7706. doi: 10.1074/jbc.M114.628016
 69. Singh SK, Kurnasov O V, Chen B, et al (2002) Crystal structure of *Haemophilus*

- influenzae NadR protein. A bifunctional enzyme endowed with NMN adenylyltransferase and ribosylnicotinamide kinase activities. *J Biol Chem* 277:33291–33299. doi: 10.1074/jbc.M204368200
70. Zhou T, Kurnasov O, Tomchick DR, et al (2002) Structure of human nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase. *J Biol Chem* 277:13148–13154. doi: 10.1074/jbc.M111469200
 71. Werner E, Ziegler M, Lerner F, et al (2002) Crystal structure of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase in complex with NMN. *FEBS Lett* 516:239–244. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02556-5
 72. Garavaglia S, Angelo ID, Emanuelli M, et al (2002) Structure of human NMN adenylyltransferase. *J Biol Chem* 277:8524–8530. doi: 10.1074/jbc.M111589200
 73. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612. doi: 10.1002/jcc.20084
 74. Zhang, Zhou T, Kurnasov O, et al (2002) Crystal structures of *E. coli* nicotinate mononucleotide adenylyltransferase and its complex with deamido-NAD. *Structure* 10:69–79. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00693-1
 75. Yoon H-J, Kim HL, Mikami B, Suh SW (2005) Crystal structure of nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa* in its apo and substrate-complexed forms reveals a fully open conformation. *J Mol Biol* 351:258–265. doi: 10.1016/j.jmb.2005.06.001
 76. Raffaelli N, Sorci L, Amici A, et al (2002) Identification of a novel human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 297:835–840. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02285-4
 77. Berger F, Lau C, Ziegler M (2007) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity by the phosphorylation state of the nuclear NAD biosynthetic enzyme NMN adenylyl transferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3765–3770. doi: 10.1073/pnas.0609211104
 78. Wang J, Zhai Q, Chen Y, et al (2005) A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration. *J Cell Biol* 170:349–355. doi: 10.1083/jcb.200504028
 79. Coleman MP, Freeman MR (2010) Wallerian degeneration, Wld S, and Nmnat. *Annu Rev Neurosci* 33:245–267. doi: 10.1146/annurev-neuro-060909-153248
 80. Ruan K, Zhu Y, Li C, et al (2015) Alternative splicing of *Drosophila* Nmnat functions as a switch to enhance neuroprotection under stress. *Nat Commun* 6:10057. doi:

- 10.1038/ncomms10057
81. Zhai RG, Zhang F, Hiesinger PR, et al (2008) NAD synthase NMNAT acts as a chaperone to protect against neurodegeneration. *Nature* 452:887–91. doi: 10.1038/nature06721
 82. Opperdoes FR, Coombs GH (2007) Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol* 23:149–158. doi: 10.1016/j.pt.2007.02.004
 83. Verner Z, Cermáková P, Skodová I, et al (2014) Comparative analysis of respiratory chain and oxidative phosphorylation in *Leishmania tarentolae*, *Crithidia fasciculata*, *Phytomonas serpens* and procyclic stage of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 193:55–65. doi: 10.1016/j.molbiopara.2014.02.003
 84. Michels P a M, Bringaud F, Herman M, Hannaert V (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* 1763:1463–77. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.019
 85. Parsons M (2004) Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol* 53:717–724. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04203.x
 86. Fessel MR, Lira CB, Giorgio S, et al (2011) Sir2-related protein 1 from *Leishmania amazonensis* is a glycosylated NAD⁺ dependent deacetylase. *Parasitology* 138:1245–1258. doi: 10.1017/S0031182011001077
 87. Yahiaoui B, Taibi A, Ouaiissi A (1996) A *Leishmania major* protein with extensive homology to silent information regulator 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 169:115–118.
 88. Zemzoumi K, Sereno D, Francois M, et al (1998) *Leishmania major*: cell type dependent distribution of a 43 kDa antigen related to silent information regulatory-2 protein family. *Biol cell* 90:239–245.
 89. Castro H, Sousa C, Santos M, et al (2002) Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Med* 33:1552–1562.
 90. Turrens JF (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Aspects Med* 25:211–220. doi: 10.1016/j.mam.2004.02.021
 91. Barr SD, Gedamu L (2003) Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. *J Biol Chem* 278:10816–10823. doi: 10.1074/jbc.M212990200
 92. O'Hara JK, Kerwin LJ, Cobbold S, et al (2014) Targeting NAD⁺ metabolism in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 9:e94061. doi:

10.1371/journal.pone.0094061

93. Niño CH, Forero-Baena N, Contreras LE, et al (2015) Identification of the nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias Inst Oswaldo Cruz* 110:890–897. doi: 10.1590/0074-02760150175
94. Forero-Baena N, Sánchez-Lancheros D, Buitrago JC, et al (2015) Identification of a nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyltransferase in *Giardia lamblia* (GINMNAT). *Biochim Open* 1:61–69. doi: 10.1016/j.biopen.2015.11.001
95. PAHO (2015) Leishmaniasis. *Epidemiological Report of the Americas*.
96. Romão PRT, Tovar J, Fonseca SG, et al (2006) Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Brazilian J Med Biol Res* 39:355–363.
97. McConville MJ, Naderer T (2011) Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 65:543–61. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102913
98. Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, et al (2008) Protein production and purification. *Nat Methods* 5:135–46. doi: 10.1038/nmeth.f.202
99. Seidman CE, Struhl K, Jen Sheen, Jessen T (2003) Introduction of plasmid DNA into cells. *Curr. Protoc. Mol. Biol*.
100. Speicher DW (2007) Electrophoresis. *Curr Protoc protein Sci*. doi: 10.1002/0471140864.ps1712s62
101. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
102. Balducci E, Orsomando G, Polzonetti V, et al (1995) NMN adenylyltransferase from bull testis: purification and properties. *Biochem J* 310:395–400.
103. Balducci E, Emanuelli M, Raffaelli N, et al (1995) Assay methods for nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of wide applicability. *Anal Biochem* 228:64–68.
104. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, et al (2016) KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* 44:D457–D462. doi: 10.1093/nar/gkv1070
105. Caspi R, Altman T, Billington R, et al (2014) The MetaCyc database of metabolic

- pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Res* 42:471–480. doi: 10.1093/nar/gkt1103
106. Kim HS, Mittenthal JE, Caetano-Anollés G (2006) MANET: tracing evolution of protein architecture in metabolic networks. *BMC Bioinformatics* 7:351. doi: 10.1186/1471-2105-7-351
 107. Engebrecht J, Brent R, Kaderbhai MA (2003) Minipreps of plasmid DNA. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*
 108. Berger F, Lau C, Dahlmann M, Ziegler M (2005) Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem* 280:36334–36341. doi: 10.1074/jbc.M508660200
 109. Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
 110. Smith DE, Fisher PA (1984) Identification, developmental regulation, and response to Heat Shock of two antigenically related forms of a major nuclear envelope protein in *Drosophila* embryos: application of an improved method for affinity purification of antibodies using polypeptides. *J Cell Biol* 99:20–28.
 111. Niño A, Camacho M (2005) *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* growth in vitro culture relies more on folic acid availability than *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Memorias Inst Oswaldo Cruz* 100:309–310.
 112. Aquino Teixeira MC, Santos R de J, Barreto Sampaio R, et al (2002) A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol Resolut* 88:963–968. doi: 10.1007/s00436-002-0695-3
 113. Gupta N, Goyal N, Rastogi AK (2001) In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends Parasitol* 17:150–153.
 114. Atayde VD, Ullu E, Kolev NG (2012) A single-cloning-step procedure for the generation of RNAi plasmids producing long stem – loop RNA. *Mol Biochem Parasitol* 184:55–58.
 115. Dutta S, Ray D, Kolli BK, Chang KP (2005) Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4474–4484. doi: 10.1128/AAC.49.11.4474-4484.2005
 116. Rath A, Cunningham F, Deber CM (2013) Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts. *Proc Natl Acad Sci*

U S A 110:15668–73. doi: 10.1073/pnas.1311305110

117. Simon SM, Sousa FJR, Mohana-Borges R, Walker GC (2008) Regulation of *Escherichia coli* SOS mutagenesis by dimeric intrinsically disordered umuD gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1152–1157. doi: 10.1073/pnas.0706067105
118. Werner WE (1995) Ferguson Plot Analysis of High Molecular Weight Glutenin Subunits by Capillary Electrophoresis. *Cereal Chem* 72:248–251.
119. de Marco A, Volrath S, Bruyere T, et al (2000) Recombinant Maize Protoporphyrinogen IX Oxidase Expressed in *Escherichia coli* Forms Complexes with GroEL and DnaK Chaperones. *Protein Expr Purif* 20:81–86. doi: 10.1006/prev.2000.1274
120. Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5:725–738. doi: 10.1038/nprot.2010.5
121. Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9:40. doi: 10.1186/1471-2105-9-40
122. Bhattacharya D, Cheng J (2013) 3Drefine: Consistent protein structure refinement by optimizing hydrogen bonding network and atomic-level energy minimization. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 81:119–131. doi: 10.1002/prot.24167
123. Lovell SC, Davis IW, Adrendall WB, et al (2003) Structure validation by Ca geometry: phi, psi and C β deviation. *Proteins Struct Funct Genet* 50:437–450.
124. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 31:3688–3691. doi: 10.1093/nar/gkg526
125. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, et al (2009) Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): a review. In: *Methods Enzymol*. Elsevier Inc., pp 439–473
126. Bornhorst JA, Falke JJ (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol* 326:245–254.
127. De Marco A, Volrath S, Bruyere T, et al (2000) Recombinant maize protoporphyrinogen IX oxidase expressed in *Escherichia coli* forms complexes with GroEL and DnaK chaperones. *Protein Expr Purif* 20:81–86. doi: 10.1006/prev.2000.1274
128. Emanuelli M, Carnevali F, Saccucci F, et al (2001) Molecular cloning, chromosomal localization, tissue mRNA levels, bacterial expression, and enzymatic properties of

- human NMN adenylyltransferase. *J Biol Chem* 276:406–412. doi: 10.1074/jbc.M008700200
129. Emanuelli M, Natalini P, Raffaelli N, et al (1992) NAD biosynthesis in human placenta: purification and characterization of homogeneous NMN adenylyltransferase. *Arch Biochem Biophys* 298:29–34. doi: 10.1016/0003-9861(92)90089-F
 130. Olland AM, Underwood KW, Czerwinski RM, et al (2002) Identification, characterization, and crystal structure of *Bacillus subtilis* nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase. *J Biol Chem* 277:3698–3707. doi: 10.1074/jbc.M109670200
 131. Emanuelli M, Carnevali F, Lorenzi M, et al (1999) Identification and characterization of YLR328W, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding NMN adenylyltransferase. Expression and characterization of the recombinant enzyme. *FEBS Lett* 455:13–17.
 132. Contreras LE, Neme R, Ramírez MH (2015) Identification and functional evaluation of *Leishmania braziliensis* Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase. *Protein Expr Purif* 115:26–33. doi: 10.1016/j.pep.2015.08.022
 133. Claros MG, Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241:779–786. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.00779.x
 134. Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, et al (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18:298–305. doi: 10.1093/bioinformatics/18.2.298
 135. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2:953–71. doi: 10.1038/nprot.2007.131
 136. Hua S, Sun Z (2001) Support vector machine approach for protein subcellular localization prediction. *Bioinformatics* 17:721–728. doi: 10.1093/bioinformatics/17.8.721
 137. Bhasin M, Raghava GPS (2004) ESLpred: SVM-based method for subcellular localization of eukaryotic proteins using dipeptide composition and PSI-BLAST. *Nucleic Acids Res* 32:414–419. doi: 10.1093/nar/gkh350
 138. Chou K-C, Shen H-B (2010) Cell-PLoc 2.0: an improved package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nat Sci* 02:1090–1103. doi: 10.4236/ns.2010.210136

-
139. Singh SM, Panda AK (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 99:303–10. doi: 10.1263/jbb.99.303
 140. Parola AD, Sciocco-Cap A, Glikmann G, Romanowski V (2003) An immunochemical method for quantitation of *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV). *J Virol Methods* 112:13–21. doi: 10.1016/S0166-0934(03)00185-X
 141. Depledge DP, MacLean LM, Hodgkinson MR, et al (2010) *Leishmania*-specific surface antigens show sub-genus sequence variation and immune recognition. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e829. doi: 10.1371/journal.pntd.0000829
 142. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294:1351–62. doi: 10.1006/jmbi.1999.3310
 143. Xue Y, Ren J, Gao X, et al (2008) GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 7:1598–1608. doi: 10.1074/mcp.M700574-MCP200
 144. Depledge DP, Evans KJ, Ivens AC, et al (2009) Comparative expression profiling of *Leishmania*: modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds. *PLoS Negl Trop Dis*. doi: 10.1371/journal.pntd.0000476
 145. Rochette A, Raymond F, Corbeil J, et al (2009) Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 165:32–47. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.12.012
 146. Rastrojo A, Carrasco-Ramiro F, Martín D, et al (2013) The transcriptome of *Leishmania major* in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. *BMC Genomics* 14:223. doi: 10.1186/1471-2164-14-223
 147. Henard CA, Carlsen ED, Hay C, et al (2014) *Leishmania amazonensis* amastigotes highly express a tryparedoxin peroxidase isoform that increases parasite resistance to macrophage antimicrobial defenses and fosters parasite virulence. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3000. doi: 10.1371/journal.pntd.0003000
 148. Olekhnovitch R, Bousso P (2015) Induction, propagation, and activity of host nitric oxide: lessons from *Leishmania* infection. *Trends Parasitol* 31:653–664. doi: 10.1016/j.pt.2015.08.001
 149. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 48:449–470. doi: 10.1146/annurev.mi.48.100194.002313

150. Andrade JM, Murta SMF (2014) Functional analysis of cytosolic trypanothione reductase in antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. *Parasit Vectors* 7:406. doi: 10.1186/1756-3305-7-406
151. Dumas C, Ouellette M, Tovar J, et al (1997) Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J* 16:2590–2598. doi: 10.1093/emboj/16.10.2590
152. Palmieri F, Rieder B, Ventrella A, et al (2009) Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins. *J Biol Chem* 284:31249–31259. doi: 10.1074/jbc.M109.041830
153. Todisco S, Agrimi G, Castegna A, Palmieri F (2006) Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281:1524–31. doi: 10.1074/jbc.M510425200
154. Agrimi G, Russo A, Scarcia P, Palmieri F (2012) The human gene SLC25A17 encodes a peroxisomal transporter of coenzyme A, FAD and NAD⁺. *Biochem J* 443:241–7. doi: 10.1042/BJ20111420
155. Schreiber V, Dantzer F, Ame J-C, de Murcia G (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:517–28. doi: 10.1038/nrm1963
156. Daniels CM, Thirawatananond P, Ong S-E, et al (2015) Nudix hydrolases degrade protein-conjugated ADP-ribose. *Sci Rep* 5:18271. doi: 10.1038/srep18271
157. McLennan AG (2006) The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci* 63:123–143. doi: 10.1007/s00018-005-5386-7
158. Maugeri DA, Cazzulo JJ, Burchmore RJS, et al (2003) Pentose phosphate metabolism in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 130:117–125. doi: 10.1016/S0166-6851(03)00173-7
159. Imai SI (2009) The NAD world: A new systemic regulatory network for metabolism and aging-Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance. *Cell Biochem Biophys* 53:65–74. doi: 10.1007/s12013-008-9041-4
160. de Figueiredo LF, Gossmann TI, Ziegler M, Schuster S (2011) Pathway analysis of NAD⁺ metabolism. *Biochem J* 439:341–348. doi: 10.1042/BJ20110320
161. Bi J, Wang H, Xie J (2011) Comparative genomics of NAD(P) biosynthesis and novel antibiotic drug targets. *J Cell Physiol* 226:331–40. doi: 10.1002/jcp.22419
162. Sasaki Y, Araki T, Milbrandt J (2006) Stimulation of nicotinamide adenine

- dinucleotide biosynthetic pathways delays axonal degeneration after axotomy. *J Neurosci* 26:8484–91. doi: 10.1523/J Neurosci.2320-06.2006
163. Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5:1–17. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172
 164. Lebediker M, Danieli T (2014) Production of prone-to-aggregate proteins. *FEBS Lett* 588:236–246.
 165. Papanephytous CP, Kontopidis G (2014) Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review. *Protein Expr Purif* 94:22–32. doi: 10.1016/j.pep.2013.10.016
 166. Berndt C, Lillig CH, Holmgren A (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1783:641–650. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.02.003
 167. Kolaj O, Spada S, Robin S, Wall JG (2009) Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 8:1–17. doi: 10.1186/1475-2859-8-9
 168. Zhai RG, Cao Y, Hiesinger PR, et al (2006) *Drosophila* NMNAT maintains neural integrity independent of its NAD synthesis activity. *PLoS Biol* 4:2336–2348. doi: 10.1371/journal.pbio.0040416
 169. Marchesini N, Docampo R (2002) A plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 119:225–236. doi: S0166685101004194 [pii]
 170. Raffaelli N, Lorenzi T, Mariani PL, et al (1999) The *Escherichia coli* NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity. *J Bacteriol* 181:5509–5511.
 171. Vickers TJ, Greig N, Fairlamb AH (2004) A trypanothione-dependent glyoxalase I with a prokaryotic ancestry in *Leishmania major*. *PNAS* 101:13186–13191.
 172. Ariza A, Vickers TJ, Greig N, et al (2006) Specificity of the trypanothione-dependent *Leishmania major* glyoxalase I : structure and biochemical comparison with the human enzyme. *Mol Microbiol* 59:1239–1248. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05022.x
 173. Padmanabhan PK, Mukherjee A, Singh S, et al (2005) Glyoxalase I from *Leishmania donovani*: a potential target for anti-parasite drug. *Biochem Biophys Res Commun* 337:1237–1248. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.09.179

174. Mondal S, Roy JJ, Bera T (2014) Generation of adenosine tri-phosphate in *Leishmania donovani* amastigote forms. *Acta Parasitol* 59:11–16. doi: 10.2478/s11686-014-0203-9
175. Pabón MA, Cáceres AJ, Gualdrón M, et al (2007) Purification and characterization of hexokinase from *Leishmania mexicana*. *Parasitol Resolut* 100:803–810. doi: 10.1007/s00436-006-0351-4
176. Hernán Sosa M, Giordana L, Nowicki C (2015) Exploring biochemical and functional features of *Leishmania major* phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Arch Biochem Biophys* 583:120–129. doi: 10.1016/j.abb.2015.07.015
177. Peres-sampaio CE, De Almeida-Amaral EE, Lima Giarola NL, Meyer-Fernandes JR (2008) *Leishmania amazonensis*: effects of heat shock on ecto-ATPase activity. *Exp Parasitol* 119:135–143. doi: 10.1016/j.exppara.2008.01.003
178. Villa H, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, et al (2003) Molecular and functional characterization of adenylate kinase 2 gene from *Leishmania donovani*. *Eur J Biochem* 270:4339–4347. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03826.x
179. Stout TJ, Foster PG, Matthews DJ (2004) High-Throughput structural biology in drug discovery: protein kinases. *Curr Pharm Des* 1b:1069–1082.
180. Hare TO, Shakespeare WC, Zhu X, et al (2009) AP24534, a Pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* 16:401–412. doi: 10.1016/j.ccr.2009.09.028
181. Magni G, Di Stefano M, Orsomando G, et al (2009) NAD(P) biosynthesis enzymes as potential targets for selective drug design. *Curr Med Chem* 16:1372–1390.
182. Mayer PR, Huang N, Dewey CM, et al (2010) Expression, localization, and biochemical characterization of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 2. *J Biol Chem* 285:40387–96. doi: 10.1074/jbc.M110.178913
183. Berger F, Lau C, Ziegler M (2006) Regulation of poly (ADP-ribose) polymerase 1 activity by the phosphorylation state of the nuclear NAD biosynthetic enzyme NMN adenylyl transferase 1. *PNAS* 104:3765–3770.
184. Ruggieri S, Gregori L, Natalini P, et al (1988) Recent observations on the structure and the properties of yeast nmna adenylyltransferase. *Experientia* 44:27–29.
185. Song J, Tan H, Perry AJ, et al (2012) PROSPER: an integrated feature-based tool for predicting protease substrate cleavage sites. *PLoS One* 7:e50300. doi: 10.1371/journal.pone.0050300

-
186. Martínez-Salas E, Piñeiro D, Fernández N (2012) Alternative mechanisms to initiate translation in eukaryotic mRNAs. *Comp Funct Genomics* 2012:1–12. doi: 10.1155/2012/391546
 187. Brar G a, Weissman JS (2015) Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:651–664. doi: 10.1038/nrm4069
 188. Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS (2011) Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* 147:789–802. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.002
 189. Parsons M, Myler PJ (2016) Illuminating parasite protein production by ribosome profiling. *Trends Parasitol* 1–12. doi: 10.1016/j.pt.2016.03.005
 190. Smircich P, Eastman G, Bispo S, et al (2015) Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 16:443–457. doi: 10.1186/s12864-015-1563-8
 191. Kato M, Lin SJ (2014) YCL047C/POF1 is a novel nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 289:15577–15587. doi: 10.1074/jbc.M114.558643
 192. Koh L, Drmota T, Beeumenc J Van, et al (1996) Cloning and characterization of the NAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenases of *Trypanosoma brucei brucei* and *Leishmania mexicana mexicana* and expression of the trypanosome enzyme in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol* 76:159–173.
 193. Ma D, Russell DG, Beverley SM, Turco SJ (1997) Golgi GDP-mannose Uptake Requires *Leishmania* LPG2. *J Biol Chem* 272:3799–3805.
 194. Capul A a, Barron T, Dobson DE, et al (2007) Two functionally divergent UDP-Gal nucleotide sugar transporters participate in phosphoglycan synthesis in *Leishmania major*. *J Biol Chem* 282:14006–17. doi: 10.1074/jbc.M610869200
 195. Mottram JC, Coombs GH (1985) *Leishmania mexicana* : Subcellular Distribution Amastigotes and Promastigotes. *Exp Parasitol* 59:265–274.
 196. Brunetti L, Di Stefano M, Ruggieri S, et al (2010) Homology modeling and deletion mutants of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isozyme 2: new insights on structure and function relationship. *Protein Sci* 19:2440–50. doi: 10.1002/pro.526
 197. Cohen-Freue G, Holzer TR, Forney JD, McMaster WR (2007) Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37:1077–1086. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.011

198. Campbell DA, Thomas S, Sturm NR (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* 5:1231–1240. doi: 10.1016/j.micinf.2003.09.005
199. Thomas S, Green A, Sturm NR, et al (2009) Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics* 10:152. doi: 10.1186/1471-2164-10-152
200. Respuela P, Ferella M, Rada-Iglesias A, Åslund L (2008) Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 283:15884–15892. doi: 10.1074/jbc.M802081200
201. Ochaya S, Respuela P, Simonsson M, et al (2007) Characterization of a *Trypanosoma cruzi* acetyltransferase: cellular location, activity and structure. *Mol Biochem Parasitol* 152:123–131. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.12.009
202. Horn D (2007) Introducing histone modification in trypanosomes. *Trends Parasitol* 23:239–242. doi: 10.1016/j.pt.2007.04.002
203. Rochette A, Raymond F, Ubeda J-M, et al (2008) Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC Genomics* 9:255–281. doi: 10.1186/1471-2164-9-255
204. Clayton CE (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21:1881–1888.
205. Mao Y, Najafabadi HS, Salavati R (2009) Genome-wide computational identification of functional RNA elements in *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* 10:355. doi: 10.1186/1471-2164-10-355
206. Najafabadi HS, Lu Z, MacPherson C, et al (2013) Global identification of conserved post-transcriptional regulatory programs in trypanosomatids. *Nucleic Acids Res* 41:8591–8600. doi: 10.1093/nar/gkt647
207. Green ML, Karp PD (2004) A Bayesian method for identifying missing enzymes in predicted metabolic pathway databases. *BMC Bioinformatics* 5:76. doi: 10.1186/1471-2105-5-76
208. Kim S, Kurokawa D, Watanabe K, et al (2004) *Brucella abortus* nicotinamidase (PncA) contributes to its intracellular replication and infectivity in mice. *FEMS Microbiol Lett* 234:289–295. doi: 10.1016/j.femsle.2004.03.038
209. Ma B, Pan SJ, Zupancic ML, Cormack BP (2007) Assimilation of NAD⁺ precursors in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 66:14–25. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05886.