

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Análisis estructural y funcional de la  
Nicotinamida/Nicotinato  
mononucleótido adenililtransferasa  
de *Plasmodium falciparum*  
(PfNMNAT)**

**Carlos Alfonso Nieto Clavijo**

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

2017



# **Análisis estructural y funcional de la Nicotinamida/Nicotinato mononucleótido adenililtransferasa de *Plasmodium falciparum* (PfNMNAT)**

**Carlos Alfonso Nieto Clavijo**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en ciencias - Bioquímica**

Directora:

Dr rer nat. María Helena Ramírez Hernández

Línea de Investigación:

Bioquímica

Grupo de Investigación:

Laboratorio de investigaciones básicas en bioquímica - LIBBIQ

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia  
2017



*“Love your curves and all your edges  
all your perfect imperfections”*

**All of me - John Legend**



## Agradecimientos

La presente tesis de maestría es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de dificultad y en los momentos de felicidad.

A tí Dios mío, por darme la oportunidad de existir así, aquí y ahora; por mi vida, que la he vivido junto a ti. Gracias por iluminarme y darme fuerzas para caminar por tu sendero.

Debo agradecer de manera especial y sincera a la Profesora María Helena Ramírez por brindarme su confianza y permitirme realizar esta tesis en su grupo. Debo reconocer que gracias a su dirección he podido enriquecerme en esta bonita profesión, y no tan solo de manera académica sino de manera personal, su más valioso ejemplo es quizás la colaboración. Gracias por su orientación y rigurosidad para cada uno de los experimentos realizados, gracias por facilitarme todos los medios para culminación de esta tesis y por siempre preocuparse por mi bienestar.

A mis padres, hermana y Juan, por su amor, por su apoyo incondicional durante el tiempo transcurrido de mi carrera y de mi vida; por estar pendiente de mí a cada momento. Gracias por ser ejemplo para mí. Gracias por darme felicidades y acompañarme en la tristeza. Gracias por mi sobrina.

A ti, Catherine Lozada, tu sabes que eres una persona muy especial en mi vida. Gracias porque en el tiempo compartido me he podido dar cuenta que tengo a mi lado mi media mitad. Gracias por tenerme paciencia, gracias por tu voz de aliento que me impulsaron muchas a seguir. Tu sabes que me gusta hacer las cosas lo mejor posible y por eso muchas veces no hubo tiempo para los dos, sé que Dios en algún momento nos recompensará el tiempo invertido.

Finalmente, gracias a todos mis compañeros de laboratorio, junto a ustedes fue más fácil llevar este trabajo a su culminación. Gracias a Andrés Herrera, por brindarme su amistad incondicional. Uno de los mejores regalos que me dejó esta experiencia fue conocer valiosas personas como Luis Contreras, Facundo Morales, Laura Jutinico, Laura Guasca, Lesly Ortíz, Gustavo Garzón, Camila González y muchas personas más con las que pude compartir, me brindaron muchos momentos de felicidad y grandes aportes a este trabajo.

Agradecer a COLCIENCIAS por la financiación del proyecto 110156935240, y las convocatorias de Jóvenes investigadores 645 de 2014 y 706 de 2015 que permitieron mi mantenimiento durante estos dos años.

Al Laboratorio de Parasitología molecular de la universidad El Bosque (Dra. Jacqueline Chaparro, Dra. Paula Hernández y Liliana Morales), y Zully Rodríguez por la ayuda brindada en temas de cultivo, a la Profesora Zuly Monroy y Grupo FaMeTra por permitirme el acceso de equipos para ensayos de actividad.

A la Facultad de Ciencias – Sede Bogotá por las becas de posgrado que permitieron la realización de mi maestría.

A la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Química por permitir la continuación de mi formación académica.



## Resumen

La malaria es causada por los parásitos *Plasmodium*, transmitida por la picadura de un mosquito hembra. Existen cinco especies que pueden infectar al humano, entre las cuales *Plasmodium falciparum* es el responsable de casi todas las muertes por dicha enfermedad. El parásito cuenta con dos fases de reproducción: sexual en el mosquito y la asexual en el humano.

En los eritrocitos el parásito toma los aminoácidos esenciales para su metabolismo a partir del grupo globina; el grupo hemo se oxida formando radicales libres, los cuales son tóxicos. *P. falciparum* tiene provisto una serie de sistemas antioxidantes que le permiten sobrevivir en estas condiciones. Algunos de estos sistemas dependen directamente del poder reductor del parásito proporcionado por la NADPH, para lo cual es necesario que el parásito aumente la actividad de vías como la pentosa fosfato y secuencialmente el metabolismo del NAD<sup>+</sup>. Dentro de la biosíntesis de esta molécula podemos resaltar una enzima clave, la Nicotinamida/Nicotinato monucleótido adenililtransferasa (NMNAT), punto de convergencia entre las vías de biosíntesis.

En este trabajo se continuó con la caracterización del metabolismo del NAD<sup>+</sup> en el parásito a través de la enzima PfNMNAT, mediante la optimización de la expresión y purificación de la proteína recombinante silvestre y mutantes, análisis de la expresión de la NMNAT estadios intraeritrocíticos del parásito, e igualmente se identificó la localización subcelular. Las evidencias obtenidas indicaron diferencias notables entre la proteína analizada en relación con las NMNATs ortólogas humanas; lo que sugiere que el proceso de biosíntesis del NAD<sup>+</sup> en *P. falciparum* es un blanco farmacológico promisorio.

**Palabras clave:** dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD<sup>+</sup>), *Plasmodium falciparum*, nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT).

## Abstract

Malaria is caused by the parasites *Plasmodium*, transmitted by the bite of a female mosquito. There are five species that can infect humans, among which *Plasmodium falciparum* is responsible for almost all deaths from a disease. The parasite has two phases of reproduction: sexual in the mosquito and asexual in the human.

In erythrocytes the parasite takes the amino acids essential for metabolism from the globin group; The heme group oxidizes to form free radicals, which are toxic. *P. falciparum* has a number of antioxidant systems that allow it to survive in these conditions. Some of these systems depend directly on the parasite power reducer provided by NADPH, for which it is necessary for the parasite to increase the activity of pathways such as pentose phosphate and sequentially the metabolism of NAD<sup>+</sup>. Within the biosynthesis of this molecule may highlight a key enzyme, Nicotinamide/Nicotinate mononucleotide adenylyl transferase (NMNAT), point of convergence between biosynthetic pathways.

In this work we continued with the characterization of the metabolism of NAD<sup>+</sup> in the parasite through the enzyme PfNMNAT, by optimizing the expression and purification of recombinant wild protein and mutants, analyzing the expression of NMNAT intraeritrocitic stages of the parasite, and the subcellular localization was also identified. The evidences obtained indicated remarkable differences between the protein analyzed in relation to NMNATs orthologous humans; What suggests that the process of biosynthesis of NAD<sup>+</sup> is *P. falciparum* is a promising pharmacological target.

**Keywords:** adenine and nicotinamide dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), *Plasmodium falciparum*, nicotinamide / nicotinate mononucleotide adenylyl transferase (NMNAT).

# Contenido

<b>1. Marco teórico.....</b>	<b>3</b>
1.1 El modelo de estudio: <i>Plasmodium falciparum</i> .....	3
1.2 ¿Cómo se controla la enfermedad? .....	4
1.2.1 Quinina (QN).....	5
1.2.2 Cloroquina (CQ).....	5
1.2.3 Amodiaquina (AQ).....	5
1.2.4 Mefloquina (MQ).....	5
1.2.5 Combinaciones terapéuticas con derivados de artemisininas (CTDAs).....	6
1.3 ¿Cómo afecta el estrés oxidativo al parásito? .....	6
1.4 Glicolisis y la vía de las pentosas fosfato .....	7
1.5 ¿Cómo se regulan los genes var? .....	8
1.6 ¿Porqué es importante el NAD <sup>+</sup> en el parásito? .....	9
1.6.1 El Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD <sup>+</sup> ) y su metabolismo.....	10
1.6.2 La Nicotinamida/Nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT).....	13
<b>2. Justificación.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivo general .....	19
3.2 Objetivos específicos .....	19
<b>4. Pregunta de investigación.....</b>	<b>21</b>
<b>5. Materiales y métodos.....</b>	<b>23</b>
5.1 Optimización de la expresión y purificación de la proteína PfNMNAT, usando diversos vectores de expresión .....	23
5.1.1 Estimación in silico de la solubilidad.....	24
5.1.2 Amplificación de la región codificante de la PfNMNAT.....	24
5.2 Estudio de la relevancia funcional de secuencias específicas de la PfNMNAT, en aras de caracterizar la proteína, mediante el desarrollo de mutantes .....	28
5.2.1 Diseño de mutantes de la PfNMNAT.....	29
5.2.2 Producción de mutantes de la PfNMNAT.....	29
5.3 Determinación de la localización de la PfNMNAT endógena .....	32
5.3.1 Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	32
5.3.2 Obtención de extractos proteicos citoplasmáticos.....	33

5.3.3	Inmunodetección de la PfNMNAT.....	33
5.3.4	Inmunoprecipitación de PfNMNAT.....	34
5.3.5	Determinación de la localización subcelular mediante inmunofluorescencia de PfNMNAT en <i>Plasmodium falciparum</i> .....	34
5.4	Identificación de los niveles de expresión transcripcional y proteico en los estadios del ciclo de vida asexual del parásito .....	35
5.4.1	Extracción de ARN.....	35
5.4.2	PCR acoplada a transcriptasa reversa.....	36
5.4.3	Extractos proteicos.....	36
5.4.4	Inmunodetección.....	36
6.	Resultados y discusión.....	37
6.1	Optimización de la expresión y purificación de la proteína PfNMNAT, usando diversos vectores de expresión. ....	37
6.1.1	Estimación in silico de la solubilidad.....	38
6.1.2	Amplificación de la PfNMNAT, clonación y transformación en cepas de mantenimiento.....	39
6.1.3	Expresión de las proteínas recombinantes PfNMNATs.....	44
6.1.4	Purificación mediante cromatografía de afinidad a amilosa de MBP-PfNMNAT... ..	45
6.1.5	Determinación del peso molecular de la MBP-PfNMNAT.....	47
6.1.6	Ensayos de actividad enzimática de la MBP-PfNMNAT.....	48
6.1.7	Estabilidad de la MBP-PfNMNAT luego de almacenamiento.....	49
6.2	Estudio de la relevancia funcional de secuencias específicas de la PfNMNAT, en aras de caracterizar la proteína, mediante el desarrollo de mutantes .....	50
6.2.1	Diseño de mutantes de la MBP-PfNMNAT.....	51
6.2.2	Producción de mutantes de la MBP-PfNMNAT.....	53
6.3	Determinación de la localización de la PfNMNAT endógena .....	61
6.3.1	Inmunodetección de la proteína PfNMNAT endógena de <i>P. falciparum</i> .....	61
6.3.2	Inmunolocalización in situ de la proteína PfNMNAT.....	64
6.4	Identificación de los niveles de expresión transcripcional y proteico en los estadios del ciclo de vida asexual del parásito .....	67
6.4.1	Niveles de expresión transcripcional de la PfNMNAT.....	68
6.4.2	Niveles de expresión proteica de la PfNMNAT.....	69
7.	Conclusiones.....	73
7.1	Conclusión general .....	73
7.2	Conclusiones específicas .....	73
8.	Perspectivas.....	75
9.	Anexos.....	77
10.	Bibliografía.....	83

## Lista de figuras

Figura 1-1:	Ciclo de vida de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	4
Figura 1-2:	Funciones del dinucleótido de adenina y nicotinamida.....	10
Figura 1-3:	Biosíntesis del dinucleótido de adenina y nicotinamida.....	12
Figura 1-4:	Arquitectura estructural de las NMNAT's.....	14
Figura 6-1:	Modelos estructurales de la PfNMNAT unida a las diferentes etiquetas.....	39
Figura 6-2:	Obtención de la proteína recombinante MBP-PfNMNAT.....	40
Figura 6-3:	Obtención de la proteína recombinante His+TF-PfNMNAT.....	41
Figura 6-4:	Obtención de la proteína recombinante His+SUMO-PfNMNAT.....	42
Figura 6-5:	Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes PfNMNATs.....	45
Figura 6-6:	Cuantificación densitométrica de la MBP-PfNMNAT.....	45
Figura 6-7:	Expresión y purificación de la MBP-PfNMNAT mediante cromatografía de unión a amilosa.....	46
Figura 6-8:	Determinación del peso molecular de la MBP-PfNMNAT.....	47
Figura 6-9:	Verificación de la actividad catalítica de la MBP-PfNMNAT cuantificada en RP-HPLC.....	48
Figura 6-10:	Estabilidad de la MBP-PfNMNAT almacenada durante 6 meses.....	50
Figura 6-11:	Identificación de secuencias específicas de la PfNMNAT.....	51
Figura 6-12:	Comparación de modelos estructurales de la PfNMNAT (mutantes inserción 1 vs proteína silvestre).....	53
Figura 6-13:	Obtención de de las proteínas recombinantes MBP-PfNMNAT mutadas.....	53
Figura 6-14:	Verificación de MBP-PfNMNAT N163D y N163Y.....	55
Figura 6-15:	Purificación de las MBP-PfNMNAT's.....	56
Figura 6-16:	Evaluación de la actividad catalítica de las proteínas recombinantes MBP- PfNMNAT cuantificada en RP- HPLC.....	57
Figura 6-17:	Disposición espacial de las cadenas laterales de los residuos implicados en la unión de NMN de la N163Y/MBP-PfNMNAT.....	58
Figura 6-18:	Determinación de los parámetros cinéticos de las proteínas MBP-PfNMNAT .....	59
Figura 6-19:	Evaluación de IgY e IgG anti his-PfNMNAT sobre extractos asincrónicos.....	62
Figura 6-20:	Fosforilaciones de la PfNMNAT.....	64
Figura 6-21:	Inmunodetección de la proteína PfNMNAT sobre estadios del ciclo asexual de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	65
Figura 6-22:	Ampliación de la localización de la proteína PfNMNAT mediante microscopía de fluorescencia empleando anticuerpo IgY.....	67
Figura 6-23:	Detección del mRNA de la PfNMNAT en parásitos asincrónicos.....	68
Figura 6-24:	Niveles de transcrito de la NMNAT de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	69
Figura 6-25:	Análisis de expresión proteica de la PfNMNAT.....	70
Figura 6-26:	Eficiencia traduccional de la PfNMNAT en los estadios asexuales de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	70

## Lista de tablas

Tabla 1-1. Propiedades bioquímicas de algunas NMNATs.....	14
Tabla 5-1. Iniciadores utilizados para la amplificación de la región codificante <i>PfNMNAT</i> .....	25
Tabla 5-2. Iniciadores utilizados para realizar las mutaciones de la proteína PfNMNAT..	30
Tabla 5-3. Iniciadores para verificar la expresión de PfNMNAT a nivel de RNA .....	36
Tabla 6-1. Predicción <i>in silico</i> de la solubilidad de las proteínas recombinantes PfNMNAT usando programas bioinformáticos en línea .....	38
Tabla 6-2. Rendimiento de la purificación de la MBP-PfNMNAT .....	49
Tabla 6-3. Análisis de mutantes: Resumen de las modificaciones en la estructura y efectos sobre la solubilidad .....	52
Tabla 6-4. Purificación de las MBP-PfNMNAT silvestre y mutantes .....	57
Tabla 6-5. Parámetros cinéticos de las proteínas MBP-PfNMNAT .....	60
Tabla 6-6. Predicción bioinformática de la localización subcelular de la PfNMNAT .....	61
Tabla 6-7. Predicción de las fosforilaciones de la PfNMNAT .....	63

## Lista de abreviaturas

AQ	Amodiaquina
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de suero bovino
CQ	Cloroquina
CQR	Resistente a cloroquina
CTDAs	Combinaciones terapéuticas con derivados de artemisininas
FPIX	Ferriprotoporfirina IX
G6PD	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GSH-Px	Peroxidasas dependientes de glutatión
LB	Luria Bertani
MBP	Proteína de unión a maltosa
MQ	Mefloquina
NA	Ácido nicotínico
NAAD	Dinucleótido de adenina y ácido nicotínico
NAD	Dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADP	NAD fosfato
NADPH	NADP reducido
NADS	NAD sintasa
Nam	Nicotinamida
NAMN	Mononucleótido de NA
NAR	Ribósido de NA
NMN	Nicotinamida mononucleótido

NMNAT	Nicotinamida/Nicotinato mononucleótido adenililtransferasa
NR	Ribósido de Nam
PARPs	Poli ADP ribosa polimersa
PfEMP1	Proteína de membrana del eritrocito de <i>P. falciparum</i> 1
PfSIR2	Sirtuina de <i>P. falciparum</i>
QA	Ácido quinolínico
QN	Quinina
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimersa - transcriptasa reversa
TRX-Px	Peroxidasa dependientes de tiorredoxina
SODs	Superóxido dismutasas
VD	Vacuola digestiva



# Introducción

La malaria o paludismo es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium* y está distribuida a nivel mundial en zonas tropicales y subtropicales, en donde casi 3.300 millones de personas están expuestas a contraerla (Garavito, Arteaga, & Acebey, 2002; WHO, 2016). Una vez que una persona ha sido infectada, el único tratamiento posible es la administración de antimaláricos; infortunadamente, durante los últimos 50 años se ha reportado resistencia progresiva del parásito a la mayoría de los medicamentos, lo que ha convertido al paludismo en uno de los principales problemas de salud pública en el mundo (WHO, 2016).

La identificación de posibles dianas farmacéuticas y el desarrollo de estrategias que permitan mantener el control 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<sup>+</sup>) es llamativo y adecuado dadas las funciones esenciales que desempeña: metabolismo energético, defensa ante estrés oxidativo y regulación celular (Nikiforov, Kulikova, & Ziegler, 2015).

La biosíntesis del NAD<sup>+</sup> se puede realizar a partir de dos vías: de novo y la de reciclaje. Pese a que estas dos rutas necesitan de 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) (Dolle, Skoge, Vanlinden, & Ziegler, 2013). Por esta razón, la caracterización de la enzima NMNAT de *P. falciparum* (PfNMNAT) y la identificación de posibles diferencias estructurales con respecto sus ortólogas humanas (HsNMNAT 1-3), constituyen puntos esenciales para el desarrollo de nuevas estrategias para el control del parásito.

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación permitieron identificar, clonar y expresar la proteína recombinante His-PfNMNAT en el sistema heterólogo *Escherichia coli*, estableciendo las primeras evidencias experimentales sobre el

metabolismo del NAD<sup>+</sup> en el género *Plasmodium* (Marín, C. & Ramírez, 2009). Nuestro trabajo constituye una profundización del estudio de la proteína PfNMNAT.

Inicialmente, se estandarizaron las condiciones de expresión y purificación de la proteína recombinante PfNMNAT, lo que permitió su caracterización enzimática. Dado que el estudio de la estructura primaria de la proteína del parásito reveló la existencia de secuencias específicas, la proteína recombinante obtenida en el primer paso de este estudio se utilizó como control para el estudio de estas secuencias, comparando efectos sobre la actividad catalítica.

Anticuerpos previamente realizados en el laboratorio se emplearon para determinar la localización intracelular de la proteína NMNAT endógena en *Plasmodium falciparum*. Finalmente, la PfNMNAT se evaluó a nivel de mRNA y de proteína en los tres estadios intraeritrocíticos (anillo, trofozoíto y esquizonte).

Los resultados del presente trabajo de investigación permitieron obtener información funcional y estructural importante sobre la enzima PfNMNAT, contribuyendo al conocimiento del metabolismo del NAD<sup>+</sup> en *Plasmodium falciparum*.

# 1. Marco teórico

## 1.1 El modelo de estudio: *Plasmodium falciparum*

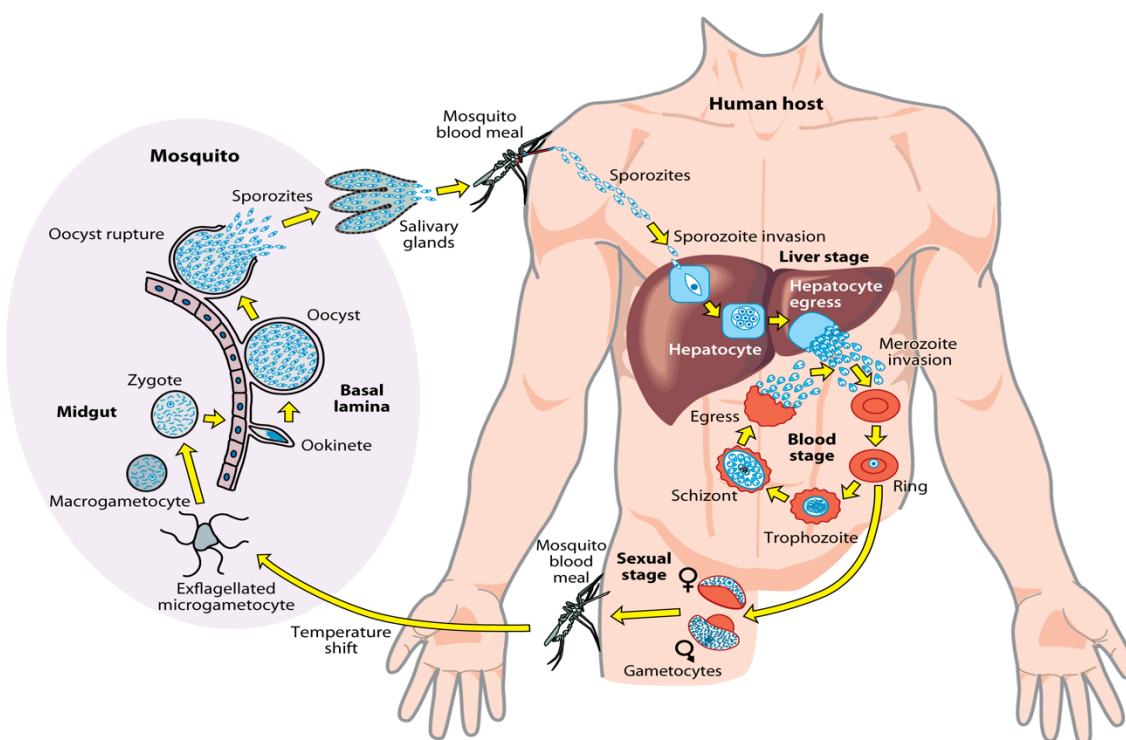
El parásito causante de la malaria es un parásito protozoario del género *Plasmodium*, el cual se transmite por la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles*. Existen cinco especies de *Plasmodium* que pueden causar malaria en los humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*. Dentro de estas cinco especies, *P. falciparum* es la que causa mayores complicaciones y mortalidad en el mundo (Montoya, Tobón, Blair, Carmona, & Maestre, 2007). Según la OMS, alrededor de 3,4 millones de personas están expuestas a contraer malaria en el mundo; en el año 2015, cerca de 214 millones de personas fueron afectadas y de estas 438.000 fallecieron siendo cerca del 64% niños menores de 5 años (WHO, 2016). En Colombia, alrededor de 25 millones de personas están en riesgo de contraer malaria, principalmente por *P. falciparum* y *P. Vivax* (Restrepo-Pineda, Arango, Maestre, Do Rosário, & Cravo, 2008) y para el año 2015, se reportaron 53.254 casos de malaria, de los cuales 18 personas fallecieron (INS, 2016).

El ciclo de vida de *P. falciparum* (Figura 1.1) involucra una fase asexual y otra sexual, la primera que se lleva a cabo en el hospedero humano, y la segunda en el mosquito hembra *Anopheles*. La fase asexual inicia cuando un mosquito *Anopheles* hembra infectado pica a un humano e introduce esporozoítos, los cuales viajan por el torrente sanguíneo hasta llegar al hígado. Allí, los esporozoítos se diferencian a esquizontes hepáticos, los cuales liberan entre 10.000 y 40.000 merozoítos que se dirigen al torrente sanguíneo e invaden los eritrocitos (Sturm et al., 2016). En los glóbulos rojos, los parásitos pasan por tres estadios conocidos como: anillo, trofozoíto y esquizonte (Vickerman, 2005), hasta que la célula se rompe liberando merozoítos que invaden nuevos eritrocitos. Algunos parásitos se diferencian en gametos y la fase sexual del ciclo de vida inicia cuando los macro y microgametos (gametos femeninos y masculinos) ingeridos por el mosquito alcanzan el intestino y se fusionan formando un cigoto. El cigoto sufre una transformación a ooquinetos,

el cual es una forma móvil que es capaz de penetrar en la pared del intestino del mosquito, donde se convierte en ooquiste. Dentro del ooquiste se da un proceso de multiplicación y diferenciación, el cual culmina con la ruptura del ooquiste y la liberación de miles de esporozoítos, los cuales viajan hacia las glándulas salivares, donde esperan hasta que el mosquito pique de nuevo a otro humano, repitiéndose el ciclo de vida (Good, 2005).

**Figura 1-1: Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*.**

Tomado de: (Boddey & Cowman, 2013). Se muestra la fase sexual en el mosquito y la fase asexual en el hospedero humano.



## 1.2 ¿Cómo se controla la enfermedad?

Una vez infectado de malaria, la única opción es el tratamiento con antimaláricos, debido a que no existe una vacuna de uso clínico. A lo largo de la historia se han utilizado diferentes tratamientos, los más utilizados se describen a continuación, teniendo la mayoría como mecanismo de acción el aumento de radicales libre para la eliminación del parásito.

### 1.2.1 Quinina (QN)

La QN es uno de los agentes antipalúdicos más antiguos y se extrajo por primera vez en el año 1600, de la corteza de un árbol del género cinchona. La QN pertenece al grupo de los aril amino alcoholes y es un esquizonticida de acción rápida (Cossio et al., 2007).

### 1.2.2 Cloroquina (CQ)

La CQ, una 4-aminoquinolina, se sintetizó por primera vez en 1934 y fue por décadas el antimalárico más utilizado en todo el mundo (FF, WM, GR, & al, 1946). El éxito de este medicamento se basaba en su excelente eficacia clínica, su limitada toxicidad, su fácil administración y a que su proceso de síntesis era sencillo y económico (Wells & Poll, 2010). Sin embargo, a pesar de todas estas ventajas, su uso se vio dramáticamente disminuido debido a la aparición y propagación de la resistencia del parásito al medicamento (Winstanley, Ward, & Snow, 2002). Por eso, la CQ es el tratamiento de primera línea para tratar *P. vivax* en todo el mundo, pero ya prácticamente no se usa para tratar malaria causada por *P. falciparum*.

### 1.2.3 Amodiaquina (AQ)

La AQ es un medicamento antipalúdico derivado de la 4-aminoquinolina, con un mecanismo de acción similar al de la CQ (Onseca & Lair, 2006). La AQ sigue siendo un importante medicamento, ya que es eficaz contra muchas cepas CQR, por lo tanto, muchos proyectos de diseño de drogas ya se han centrado en reducir esta toxicidad (O'Neill, Bray, Hawley, Ward, & Park, 1998).

### 1.2.4 Mefloquina (MQ)

La MQ es una 4-metanol-quinolina con efecto sobre las etapas eritrocíticas de *P. falciparum* y *P. vivax*, incluso contra cepas CQR. Se recomienda su uso profiláctico para quienes viajan a zonas endémicas, sobre todo aquellas donde hay un alto riesgo de infección por *P. falciparum* CQR (Roche, 2008).

### 1.2.5 Combinaciones terapéuticas con derivados de artemisininas (CTDAs)

La artemisinina es un sesquiterpeno trioxano lactona que se extrae de la planta *Artemisia annua L.* Los tratamientos con artemisininas como monoterapia, llevan a que el parásito se haga menos sensible al medicamento, pues lo debilitan, pero no lo matan. Por eso, los derivados de artemisininas se utilizan en combinación con otros antipalúdicos (CTDAs), alcanzando así una eficacia curativa cercana al 95%, y disminuyendo la probabilidad que el parásito se vuelva resistente. Los derivados de artemisininas inhiben el desarrollo de los estadios intraeritrocíticos, eliminan los gametocitos tempranos (Kombila et al. 1997), disminuyen la infectividad de los gametocitos (Pei-quan et al., 1994), pero no tienen efecto sobre los estadios hepáticos del parásito (Targett et al., 2001). En la actualidad, las CDTAs son efectivas para tratar infecciones causadas por *P. falciparum* multiresistente y son, junto con la QN, el único tratamiento disponible contra la malaria no complicada resistente a CQ (Hien et al., 1996; Nealon et al., 2002).

### 1.3 ¿Cómo afecta el estrés oxidativo al parásito?

Para empezar, hay que entender el estrés oxidativo como la condición química, relacionada con la presencia de elevadas cantidades de radicales libres, los cuales presentan electrones libres desapareados, y que tiene la facilidad de formar enlaces con otros compuestos para lograr su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre le roba un electrón a una molécula estable, la molécula se convierte a su vez en un radical libre con un electrón desapareado, iniciando una reacción en cadena, que altera el estado redox de las células y ocasiona daños a nivel intracelular (Betteridge, 2000).

Es necesario tener en cuenta que el parásito debe degradar la hemoglobina para adquirir los aminoácidos esenciales que requiere para el metabolismo. El proceso de digestión se realiza dentro de la vacuola digestiva (VD) del parásito. En este proceso se lleva a cabo la separación del grupo hemo y del grupo globina. El grupo hemo se oxida formando un compuesto llamado Ferritoporfirina IX (FPIX), el cual es altamente tóxico y necesita ser inactivado, para lo cual, el parásito polimeriza y forma un nuevo compuesto inerte llamado hemozoína (pigmento malárico), que se acumula en la vacuola digestiva en forma de cristales insolubles (Bustamante & Giralda, 1999; Garavito et al., 2002). De no ser así en el parásito hay una acumulación de radicales libres que conllevan a la muerte del parásito, debido al aumento del estrés oxidativo.

Por esta razón el parásito posee una variedad de sistemas antioxidantes, que dependen directamente del poder reductor del NADP(H) presente en la célula. Los primeros mecanismos de defensa de tipo enzimático, son las superóxido dismutasas (SODs), las cuales catalizan la dismutación de los aniones superóxido para evitar la oxidación de otras moléculas. En esta reacción están implicadas una buena gama de peroxidases, que incluyen: la hemo-peroxidasa, las peroxidases dependientes del glutatión (GSH-Px) (Müller, 2004) y las peroxidases que dependen de la tioredoxina (Trx- Px) (Krnajski, Gilberger, Walter, Cowman, & Müller, 2002; Müller, 2004). Las GSH-Px y las Trx-Px consiguen su poder reductor principalmente a través de dos sistemas redox: el sistema redox del glutatión y el de la tioredoxina, que involucran una cascada de proteínas cuya función se basa en el traspaso de electrones de NADPH, a moléculasceptoras como: las alquil- hidroxiperoxidasas y las nucleótido reductasas (Müller, 2004; E. F. Roth, 1987).

#### **1.4 Glicolisis y la vía de las pentosas fosfato**

En estudios anteriores se estimó que la infección de los eritrocitos por *P. falciparum*, conlleva a un incremento de consumo de glucosa hasta 100 veces mayor que los eritrocitos no infectados, esto es necesario para el desarrollo y multiplicación del parásito (E. Roth, 1990; F. Roth, Raventos-suarez, Nagel, & Annenberg, 1982). Adicionalmente al haber un incremento de esta molécula, también se ve un aumento en la actividad de muchas de las enzimas implicadas en la glucólisis de los eritrocitos infectados, esto se debe a la codificación de genes por *P. falciparum*, esto fue demostrado por Roth y colaboradores, al evidenciar un aumento en la actividad de las enzimas glicolíticas: hexoquinasa 3 y fosfoglicerato quinasa 4. Complementariamente se ha evidenciado un aumento en la actividad de enzimas no glicolíticas tales como: la glutamato deshidrogenasa (no está presente en eritrocitos no infectados) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que presenta diferentes propiedades a diferencia con la de los eritrocitos que no se encuentran (Müller, 2004; Olszewski et al., 2009).

Mientras los estadios intraeritrocíticos, el parásito tiene un incremento de nucleótidos, en donde el paso de los ribonucleótidos a deoxirribonucleótidos es mediado por la enzima ribonucleótido reductasa dependiente NADPH. Es decir, que una célula que se crece y se divide con alta velocidad, necesita de buenas cantidades de NADPH a nivel celular, que

generalmente es adquirido por la oxidación de la glucosa-6-fosfato en la vía de las pentosas fosfato, en la cual también se produce ribosa- 5-fosfato, metabolito necesario para la producción de ácidos nucleicos (Zerez, Roth, Schulman, & Tanaka, 1990).

Las reacciones que se llevan a cabo en la vía de las pentosas fosfato se efectúan en el citoplasma, y está conformada por dos fases: una oxidativa y otra no oxidativa. Inicialmente ocurre la oxidación empleando la glucosa-6- fosfato como sustrato. De tal forma, que la glucosa-6-fosfato sea oxidada a lactona por la actividad de la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa, esta reacción tiene como resultado la liberación de dos electrones que permiten el paso de una molécula de NAD oxidado (NADP+) a NAD reducido (NADPH). Luego ocurre un proceso de descarboxilación de la 6-fosfo-D-gluconato por medio de la enzima 6- fosfogluconatodeshidrogenasa, este proceso libera de nuevo dos electrones, que a su vez reducen una segunda molécula de NADP+ (Bozdech & Ginsburg, 2005).

Debido a que los eritrocitos no contienen mitocondria ni núcleo, la vía de las pentosas fosfato es el único origen de NADPH, en resumen, toda la maquinaria de defensa antioxidante del parásito depende exclusivamente de NADP+ y de G6PD a nivel intracelular (Beutler, 2012; Cappellini & Fiorelli, 2008).

## 1.5 ¿Cómo se regulan los genes var?

*Plasmodium falciparum* ha desarrollado un mecanismo de supervivencia, que hace que pueda esquivar el sistema inmune del humano. Este mecanismo tiene como base la expresión de antígenos variables de manera coordinada, estos reciben el nombre de PfEMP1 (Proteína de membrana del eritrocito de *P. falciparum* 1), y se expresan en el espacio superficial del eritrocito que se encuentra infectado. Estos antígenos son codificados por 60 genes var. Los eritrocitos que están infectados se adhieren al endotelio y a otras células del humano a través de una variedad de receptores, esto genera un secuestro masivo de células que puede dar lugar a que la microvasculatura se obstruya y así se evite su posterior degradación en el bazo (Flick & Chen, 2004). Complementariamente el parásito puede alterar la expresión de los genes var modificando las características funcionales y antigénicas de los eritrocitos que están infectados, la consecuencia de este proceso resulta en el esquivamiento del sistema inmune del hospedero y la apropiación que le permite instaurar su patología característica (Frank & Deitsch, 2006; Kyes, Kraemer, & Smith, 2007; Ralph, Scheidig-Benatar, & Scherf, 2005).



Estos genes antigénicos variables, se encuentran ubicados generalmente en los telómeros y subtelómeros de los cromosomas, son genes necesarios para el desarrollo y multiplicación del parásito y pueden estar regulados por dos proteínas deacetilasas de histonas conocidas como Pfsir2A y B (reguladora de la información siliente, homóloga a sir2 de *Saccharomyces cerevisiae*) (Duraisingh et al., 2005; Tonkin et al., 2009).

La proteína Pfsir2A hasta el momento ha sido la más estudiada, consta de 273 aminoácidos, su localización es en el núcleo y se encuentra en el grupo III de las enzimas deacetilasas, las cuales tienen en común la deacetilación de residuos de lisina de proteínas blanco y son dependientes de NAD<sup>+</sup>. Un rol complementario al de deacetilasa, es tener actividad ADP-ribosiltransferasa, es decir que transfiere moléculas de ADP-ribosa a histonas en *Plasmodium falciparum* y a sí misma. Ésta actividad de auto ADP-ribosilación es algo atípico en proteínas ortólogas, por lo que puede estar directamente relacionada con la activación enzimática y es necesaria para su papel como deacetilasa (Merrick & Duraisingh, 2007; Prusty et al., 2008).

## 1.6 ¿Porqué es importante el NAD<sup>+</sup> en el parásito?

Además de ser necesario en rutas metabólicas como la glucólisis, defensa ante el estrés oxidativo, defensa ante la presión inmune del hospedero y silenciamiento génico como mecanismo de evasión el NAD<sup>+</sup> tiene otras particularidades e el parásito. En la década de los 90, Zerez y colaboradores estimaron un aumento del dinucleótido de Nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>) en eritrocitos infectados por *P. falciparum*, con respecto a eritrocitos normales, esto permite constatar el rol tan importante de los niveles del NAD<sup>+</sup> en el crecimiento y división del parásito, y la esquivación del sistema inmune del humano (Eren, 2003; Merrick & Duraisingh, 2007; Zerez et al., 1990). Adicionalmente Llinas y colaboradores en su estudio bioinformático y luego experimental de las enzimas encargadas de la síntesis del NAD<sup>+</sup> en *P. falciparum*, lograron identificar diversos inhibidores de esta síntesis a nivel in vitro, lo que permite el desarrollo de prometedores tratamientos antimaláricos (O'Hara et al., 2014; Plata, Hsiao, Olszewski, Llinás, & Vitkup, 2010). Este acercamiento deja en evidencia lo necesario que se hace realizar estudios más profundos en las enzimas encargadas de la síntesis del NAD<sup>+</sup>. Para este fin, se presentan las principales características del NAD<sup>+</sup>.

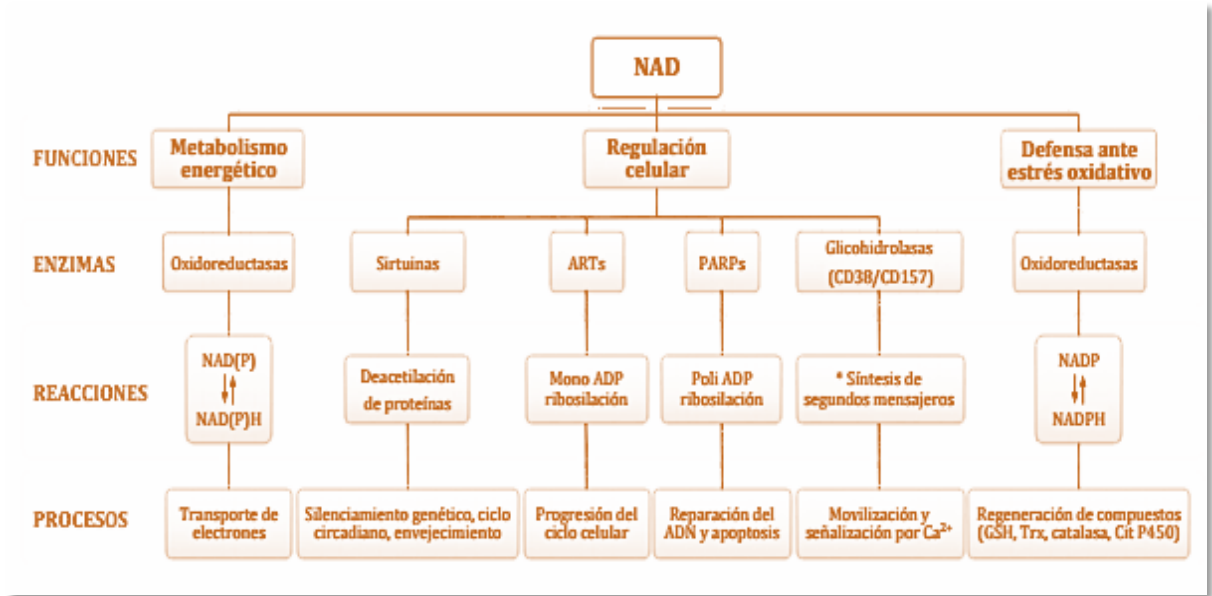
### **1.6.1 El Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD+) y su metabolismo**

El Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD+) es un metabolito procedente de la Niacina o de la vitamina B3, considerado como una coenzima clave dada su habilidad de transportar dos equivalentes de electrones, asistiendo al flujo REDOX de la célula al formar el par molecular NAD+/NADH. Este par de moléculas participa como aceptor y donador de hidrogeniones (H+), en diversas reacciones de óxido-reducción en la célula (Figura 1-2). Consecuentemente la razón de este par molecular se hace vital para la fisiología celular, pues están implicadas en la síntesis de ATP y por ende con la energía de la célula (Ghosh, George, Roy, Ramachandran, & Kolthur-Seetharam, 2010).

#### **Figura 1-2: Funciones del dinucleótido de adenina y nicotinamida**

El NAD+ tiene tres funciones dentro de la célula, las cuales son mediadas por diferentes enzimas que lo emplean como co-enzima (oxidoreductasas) o co-sustrato (Sirtuinas, ARTs, PARPs y glicohidrolasas).

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



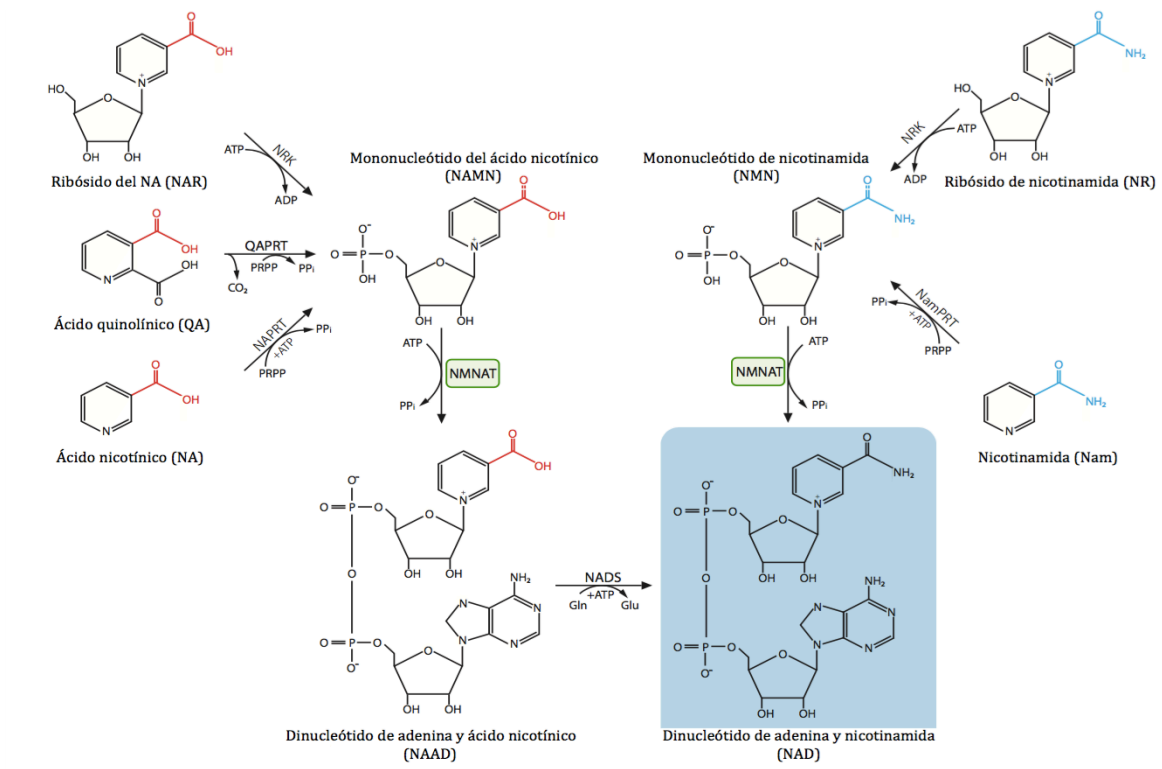
El NAD<sup>+</sup>, adicionalmente desempeña una función muy importante como sustrato. Al día de hoy se sabe que el NAD<sup>+</sup> es un Co-sustrato que es usado principalmente por grupos de enzimas; ADP-ribosiltransferasas (PARPs), cADP-ribosa sintasas y deacetilasas (Ghosh et al., 2010). Estos grupos de enzimas están implicadas desde la modificación de proteínas por acetilación de forma covalente o ADP-ribosilación hasta la movilización de calcio por medio de la síntesis de ciclo-ADP-ribosa (cADPR), usando al NAD<sup>+</sup> para llevar a cabo la actividad.

La síntesis del NAD<sup>+</sup> se puede dar por medio de dos rutas; una ruta de síntesis de Novo y una ruta de reciclaje (Figura 1-3). No obstante, desde una visión más general esta síntesis puede dividirse en dos fases: la primera donde se da la síntesis del mononucleótido de ácido nicotínico (NaMN) mientras que la segunda tiene como fin, la síntesis de NAD<sup>+</sup> por medio de Nicotinamida mononucleótido (NMN) o NaMN. En la primera fase de síntesis cabe resaltar el proceso para la formación del ácido quinolínico (QA), el cual es formado en animales y bacterias por medio del triptófano; y en plantas se puede dar por medio del ácido aspártico (Kato, Uenohara, Akita, & Hashimoto, 2006). El primer paso que se lleva a cabo en lo procariontes es la producción del iminoasparto, por medio de la enzima aspartato oxidasa; el producto obtenido de esta reacción es condensado con la dihidroxiacetona fosfato permitiendo así la formación del ácido quinolínico, la enzima que actúa allí es la ácido quinolínico sintetasa. Por último, la QA-fosforibosiltransferasa cataliza

la producción de NaMN, este es un intermediario de la biosíntesis del NAD<sup>+</sup> que se ha encontrado en todos los organismo estudiados.

### Figura 1-3: Biosíntesis del dinucleótido de adenina y nicotinamida

Adaptado de (Dolle et al., 2013). El NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>. 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.



Una enzima muy importante en la segunda fase del proceso de síntesis del NAD<sup>+</sup> es la Nicotinamida /Nicotinato mononucleótido adenililtransferasa (NMNAT /NaMNAT) punto donde convergen tanto la ruta de Síntesis de Novo como la ruta de reciclaje, con la formación del dinucleótido del ácido nicotínico (NaAD) o NAD<sup>+</sup> respectivamente. Luego la

NAD sintetasa amida al NaAD para producir NAD<sup>+</sup>. Finalmente, el NAD<sup>+</sup> puede ser fosforilado a NADP por la enzima NAD-quinasa.

Pese a que en casi todos los organismos se ha visto que tienen presentes estas dos rutas, en *Plasmodium falciparum* solamente se han podido identificar enzimas candidatas para lo que parece ser una ruta de salvamento, al igual que sucede en el eritrocito (Bogan & Brenner, 2008), sin embargo, el parásito cuenta con una enzima adicional, la nicotinamidasas que catalizaría el paso de nicotinamida a ácido nicotínico. Mediante análisis experimentales lograron identificar que la síntesis del NAD<sup>+</sup> en el parásito es dependiente de la concentración de niacina en el medio exógeno (O'Hara et al., 2014). Esto sugiere entonces que el parásito es un auxótrofo del NAD<sup>+</sup> (Ginsburg & Abdel-Haleem, 2016). Esto además ha sido encontrado en otras especies como *Leishmania infantum* y múltiples especies de levaduras patógenas, lo que indica que es una condición adaptiva común (E. Gazanion et al., 2011; Elodie Gazanion et al., 2012). En varias especies de levaduras se han caracterizado transportadores de NAD<sup>+</sup> o de sus sustratos, que se aumentan en condiciones de deficiencia de esta molécula (Belenky, Moga, & Brenner, 2008; Ma et al., 2009).

Aunque desde hace tiempo se conoce del proceso de la síntesis del NAD<sup>+</sup>, la mayoría de los estudios se han centrado en caracterizar el proceso de organismos procariotas. Al día de hoy se caracterizaron las isoenzimas humanas de la NAD-sintetasa, NAD-quinasa (Schweiger et al., 2001) y la NMNAT (Garavaglia et al., 2002). Al realizar la comparación de estas enzimas con sus equivalentes procariotas se establecieron diferencias como: distintas especificidades de sustrato, capacidades de oligomerización, sensibilidades a cofactores catiónicos divalentes y secuencias específicas (Berger, Lau, Dahlmann, & Ziegler, 2005).

### **1.6.2 La Nicotinamida/Nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT)**

La NMNAT (EC: 2.7.7.1 o 2.7.7.18), ha sido identificada en organismos tan distintos como arqueas, bacterias y eucariotas (Schweiger et al., 2001; Stancek, Schnell, & Rydén-Aulin, 2005) (Tabla 1-1). En humanos se han identificado tres isoenzimas, denominadas NMNAT 1, 2 y 3; y se han identificado en el núcleo, aparato de Golgi y mitocondrias, respectivamente (Berger et al., 2005; Lau et al., 2010). Cada una de ellas tiene secuencias

específicas que le permiten la localización intracelular para cada organelo. Ortólogos de la NMNAT-1 han sido caracterizados en microorganismos, demostrando la importancia de sus roles en diversas enfermedades. En cuanto a la NMNAT de *P. falciparum* se identificó recientemente (Marín, C. & Ramírez, 2009), y se ha caracterizado en cuanto a parámetros enzimáticos y estudio de estructuras cuaternarias mediante la construcción de plot de fergusson (Mejía & Ramírez-Hernández, 2011), por otro lado, se identificaron posibles inhibidores de la enzima, promisorios como agentes antimaláricos (O'Hara et al., 2014).

**Tabla 1-1. Propiedades bioquímicas de algunas NMNATs**

Tabla adaptada de: (Lau, 2009), con datos provenientes de las bases de datos Brenda, PDB y UniProt.

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

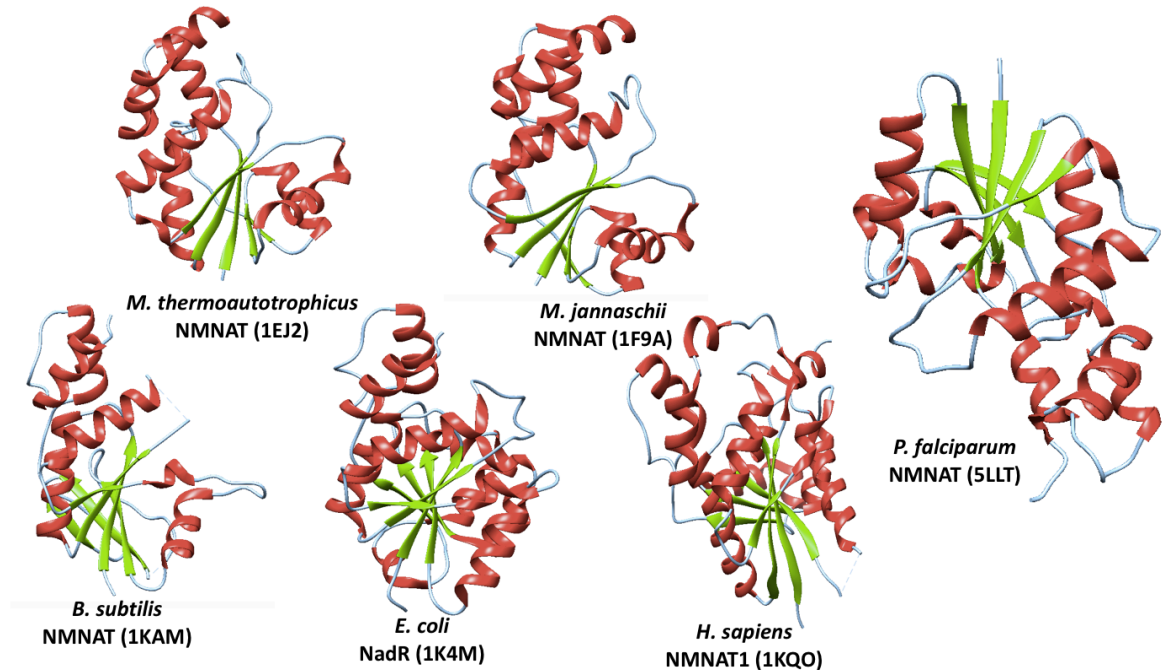
	HsNMNAT			ScNMNAT		AtNMNAT	MjNMNAT	MtNMNAT	ScNMNAT
	1	2	3	1	2				
Peso molecular (kDa)	31,9	34,4	28,3	28,3	45,8	26,9	20	20,5	66
pl	4,7-4,8	6,6	* 9,3	4,2	5,6	* 5,8	* 8,1	* 5,8	5,4
Localización	Núcleo	Citoplasma	Mitocondria	Núcleo		Núcleo	Citoplasma		-
	<b>Km(μM)</b>								
ATP	40	204	29	104	1400			160	0,08
NMN	34	32	209	170	130			80	1,4

### 1.6.2.1 Unión a sustratos y estructura

Estudios cristalográficos de rayos X han elucidado la estructura de la NMNAT de los tres dominios de la vida: arqueobacterias (D'Angelo et al., 2000; Pfoh, Pai, & Saridakis, 2015), bacterias (Kumar Singh et al., 2002; X. Zhang et al., 2003) y humanos (Garavaglia et al., 2002; Werner, Ziegler, Lerner, Schweiger, & Heinemann, 2002; X. Zhang et al., 2003; Zhou et al., 2002). Estos estudios permitieron encontrar estructuras conservadas de las NMNATs, que tienen por característica la presencia de un dominio  $\alpha/\beta$  conformado por hojas  $\beta$  paralelas rodeadas por hélices  $\alpha$  y giros aleatorios, denominado plegamiento Rossmann. Este plegamiento contiene los elementos estructurales relacionados con la unión a los sustratos y la catálisis (Figura 1-4).

**Figura 1-4: Arquitectura estructural de las NMNAT's**

El plegamiento Rossmann es la característica principal de las NMNATs. Verde: hojas  $\beta$  paralelas. Rojo: hélices  $\alpha$ . Gris: 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.



En cuanto a la unión a los sustratos se han identificado dos motivos altamente conservados para la unión con el ATP, ubicados hacia los extremos amino ([H/T]xxH) y carboxilo terminal (SxxxxR) de las NMNATs. Las interacciones del primer motivo son electrostáticas, participando las histidinas y del segundo motivo la serina y la arginina para formar puentes de hidrogeno y salinos, del sustrato entonces participa en cada una de las interacciones los grupos fosfatos del ATP. En el caso del segundo sustrato que puede ser el NMN o NaNM, se han podido relacionar algunos aminoácidos como el triptófano que mediante apilamiento e anillos aromáticos estaría interactuando con los anillos de piridina, y un residuo ya sea de lisina o arginina estabiliza el grupo fosfato de los sustratos mediante interacciones electrostáticas (Zhai et al., 2006).

### 1.6.2.2 Dominios exclusivos de las NMNATs

Se ha reportado la existencia de dominios exclusivos en otras NMNATs (D'Angelo et al., 2000) por ejemplo, las isoenzimas humanas presentan dominios específicos (ISTIDs, Isoform Specific Targeting and Interaction Domains) y se ha demostrado que cuando se remueve alguno de estos dominios, altera su localización intracelular. Para la HsNMNAT1, su ISTID contiene la señal de localización nuclear (NLS) GRKRKW, mientras que el ISTID de la HsNMNAT2 tiene dos cisteínas (Cis164 y Cis165) relacionadas 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 (Lau et al., 2010).

Adicionalmente, el ISTID de la HsNMNAT1 contiene un residuo de serina blanco de fosforilación (Ser136) por proteínas quinasa C. Se ha evidenciado que la HsNMNAT1 puede interactuar y regular la actividad catalítica de la enzima PARP1 auto-modificada, la cual está involucrada en procesos nucleares dependientes de NAD<sup>+</sup>. Dicha interacción es alterada negativamente por la fosforilación del residuo Ser136. Esta evidencia representa un tipo de regulación post- traduccional, al menos para la HsNMNAT1 (Berger, Lau, & Ziegler, 2007).

Por otro lado, las NMNATs de procariotas también presentan regiones específicas, lo cual las hace atractivas como posibles blancos de agentes terapéuticos (Khan, Forouhar, Tao, & Tong, 2007).



## 2. Justificación

De las especies de *Plasmodium* que pueden afectar el ser humano, *P. falciparum* ocupa el primer lugar en el mundo en mortalidad. Debido que hasta el día de hoy no existe una vacuna de uso clínico, y debido al reciente aumento de cepas de parásitos resistentes a los medicamentos ha aumentado, todas las miradas están puestas en encontrar proteínas que sirvan como blancos terapéuticos para el control de la enfermedad (WHO, 2016).

Durante su ciclo de vida asexual el parásito infecta a los eritrocitos incrementando el estrés oxidativo, tras la degradación de la hemoglobina. Por esta razón el parásito posee una variedad de sistemas antioxidantes, que dependen directamente del poder reductor del NADPH presente en la célula. Adicionalmente al infectar el eritrocito, *P. falciparum* aumenta la actividad del ciclo de las pentosas fosfato, la síntesis del NAD<sup>+</sup> y la expresión de enzimas glicolíticas, con el fin de adaptarse al ambiente intracelular (Eren, 2003; Müller, 2004). Por lo anterior, la función NAD(P)<sup>+</sup> es imprescindible, debido a que cumple un papel fundamental en algunos procesos bioquímicos y biológicos indispensables para el parásito (Zerez et al., 1990), considerando lo anterior la identificación y caracterización de las enzimas involucradas en su biosíntesis resulta interesante. Una de las enzimas más importantes en esta ruta, es la Nicotinamida/Nicotinato mononucleótido adenililtransferasa (NMNAT; EC:2.7.7.1), debido a que en ella convergen las dos rutas biosintéticas del NAD<sup>+</sup>: la de novo y la de salvamento (Lau, 2009). Aunque la actividad catalítica de la NMNAT se conoce desde algunos años, la identificación y caracterización de estas enzimas se ha logrado en diversos organismos, solo en los últimos veinte años.

La NMNAT de *Plasmodium falciparum* (PfNMNAT) se identificó hace tan solo diez años, por lo cual se ha caracterizado parcialmente mediante sobreexpresión de transgen (localización celular) e identificación de parámetros enzimáticos (Marín, C. & Ramírez, 2009; O'Hara et al., 2014). En este trabajo se planteó caracterizar la PfNMNAT por medio

del estudio *in vivo* e *in vitro* de esta proteína. En el acercamiento *in vivo* se verificaron la expresión a nivel de proteína y mRNA a través del ciclo celular asexual del parásito y se estudió la localización endógena de la proteína. Por otro lado, en el estudio *in vitro*, se realizó la optimización de la expresión y purificación de la proteína recombinante, y el estudio estructural analizando la relevancia de secuencias específicas del parásito mediante la construcción de proteínas mutantes. Esto permitió profundizar en la comprensión del metabolismo del NAD<sup>+</sup> en el parásito y entender su participación en procesos biológicos indispensables para su supervivencia.

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Estudiar el metabolismo del NAD<sup>+</sup> en *Plasmodium falciparum* mediante la proteína Nicotinamida/Nicotinato mononucleótido adenililtransferasa (PfNMNAT), a nivel *in vitro* e *in vivo*.

### 3.2 Objetivos específicos

- Optimizar la expresión y purificación de la proteína PfNMNAT, usando diversos vectores de expresión.
- Estudiar la relevancia funcional de secuencias específicas de la PfNMNAT, en aras de caracterizar la proteína, mediante el desarrollo de mutantes.
- Determinar la localización de la PfNMNAT en el parásito empleando inmunofluorescencia.
- Identificar los niveles de expresión transcripcional y proteico en los estadios del ciclo de vida asexual del parásito.



## 4. Pregunta de investigación

Explorar y conocer el metabolismo básico de los parásitos que tienen una alta tasa de incidencia a nivel mundial, permite diseñar nuevas herramientas que ayuden al control y a la erradicación de la enfermedad. En el 2009 se logró identificar la Nicotinamida/Nicotinato mononucleótido adenililtransferasa en *Plasmodium falciparum* (PfNMNAT), enzima esencial en el metabolismo energético del parásito. Su caracterización se había logrado parcialmente, y con el objeto de continuar con el estudio del metabolismo del NAD(P)<sup>+</sup> en *Plasmodium* y su posible uso como blanco farmacológico se han planteado los siguientes interrogantes:

- ¿Cuál etiqueta permite obtener la proteína recombinante de forma soluble y activa catalíticamente?
- ¿Existen diferencias estructurales y funcionales de la proteína del parásito con relación a sus ortólogas humanas?
- ¿La expresión de la PfNMNAT es variable en los diferentes estadios del ciclo de vida asexual del parásito a nivel transcripcional y proteico?
- ¿Cuál es la localización de la proteína endógena del parásito?

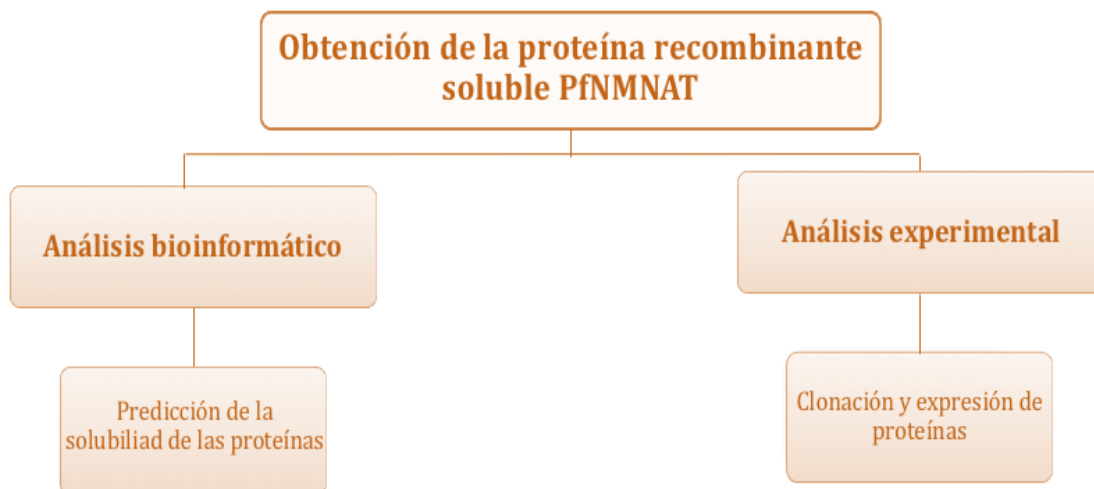


## **5. Materiales y métodos**

En este trabajo se tuvieron en cuenta dos metodologías: a nivel *in vitro* se estandarizó la expresión y purificación de la proteína recombinante PfNMNAT, para ser utilizada como control de actividad en el análisis de secuencias específicas. Por otro lado con la proteína endógena se confirmó la localización subcelular de la proteína endógena en el parásito, y se evaluaron sus niveles de expresión a nivel transcripcional y proteico. Para tal fin se llevaron a cabo diferentes metodologías que se verán enmarcadas inicialmente como metodologías generales, y luego la descripción detallada de cada una de estas.

### **5.1 Optimización de la expresión y purificación de la proteína PfNMNAT, usando diversos vectores de expresión**

Para optimizar la expresión y la purificación de la PfNMNAT en este trabajo se probaron vectores de expresión que permitieran aumento en la solubilidad de la proteína recombinante, se realizaron dos estrategias: predicciones bioinformáticas con el fin de tener una aproximación de los vectores que posiblemente podían aumentar mayoritariamente la solubilidad de la proteína recombinante y por otro lado una parte experimental para corroborar lo obtenido mediante las predicciones bioinformáticas, y que permitieran obtener la proteína PfNMNAT soluble y activa.



### 5.1.1 Estimación in silico de la solubilidad

Se implementaron programas informáticos que estiman la solubilidad de la proteína PfnMNAT unida a varias etiquetas moleculares aportadas por los vectores de expresión utilizados. Los vectores evaluados fueron: Champion™ pET SUMO (ThermoFisher), pCold TF DNA (Takara) y pMAL-c5X (New England Biolabs). Los programas utilizados para estimar la solubilidad fueron: SolPro (Magnan, Randall, & Baldi, 2009), ProSo II (Smialowski, Doose, Torkler, Kaufmann, & Frishman, 2012) y ESPRESSO (Hirose et al., 2011).

### 5.1.2 Amplificación de la región codificante de la PfnMNAT

Para la amplificación de la región codificante *PfnMNAT* se usaron varias parejas de iniciadores que permitieron la clonación en los respectivos vectores de expresión. Las condiciones para la amplificación que se utilizaron fueron: 1U de la enzima Taq Polimerasa (Applied Biosystems), MgCl<sub>2</sub> (2,5mM), buffer de la ADN polimerasa (1X), dNTP's (10mM), H<sub>2</sub>O DEPC, iniciadores (Tabla 5-1) y aproximadamente 50 ng de ADN plantilla, todo a un volumen final de 15 µL. Se empleó el siguiente perfil térmico: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 10 min., seguido por 30 ciclos de 94 °C por 45 seg, 50 °C por 1 min, 72 °C por 45 seg, y una extensión final a 72 °C por 10 min (termociclador Biorad).



**Tabla 5-1. Iniciadores utilizados para la amplificación de la región codificante *PfNMNAT***

Vector	Iniciador directo 5' – 3'	Iniciador reverso 5' – 3'
pET SUMO	ATGCATAAGAATATATGT	CTAATTAAAATCATATAAGTT
pCOLD TF	GGATCCATGCATAAGAATATATGT	
pMAL c5X		

### 5.1.2.1 Clonación de la región codificante *PfNMNAT*

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa 1%. Estos se cortaron desde el gel y se purificaron con mini columnas (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, PROMEGA). Para realizar la clonación se usaron dos estrategias dependiendo del vector de expresión: ligación directa con el producto de PCR o subclonación utilizando el vector pGEM–T Easy (PROMEGA). La ligación se realizó teniendo en cuenta una relación 1:1 inserto purificado y vector (aproximadamente 50 ng). Los parámetros de ligación (tiempo, temperatura, etc.) fueron los recomendados por el fabricante.

### 5.1.2.2 Transformación en cepas de *E. coli*

Se transformaron cepas de *E. coli* de mantenimiento ONE SHOT MATCH1-T1 y de expresión BL21(DE3) químicamente competentes, mediante choque térmico (42 °C durante 45 s, 5 min en hielo). Inmediatamente, las bacterias transformadas se incubaron durante una hora a 37 °C en medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10mM, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> y 20mM glucosa), y se sembraron en cajas de Petri con LB-agar con el antibiótico de selección respectivo para cada vector (Ampicilina o Kanamicina).

### 5.1.2.3 Purificación del ADN recombinante

Se implementó el método de lisis alcalina (Sambrook & Rusell, 2001). Se partió de un cultivo de 10 mL, inoculando en medio LB líquido suplementado con el antibiótico de selección. El producto obtenido de la extracción se sometió a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, en buffer TBE 0,5X.

### 5.1.2.4 Expresión de las proteínas recombinantes

Se tomó una colonia de cada uno de los plásmidos recombinantes, se inocularon individualmente en medio LB suplementado con el antibiótico de selección y se dejaron creciendo toda la noche a 37 °C. Se realizó una dilución del cultivo 1:100 y se continuó el crecimiento hasta alcanzar una DO de aproximadamente 0,6 medida

espectrofóticamente a 600 nm. Se estandarizó la inducción de la expresión de las proteínas IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D- 1-thiogalactopyranoside), incubando a 15 – 25 °C con agitación constante. Finalizada la inducción se colectaron las bacterias por centrifugación a 6000 rpm por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo de células.

#### **5.1.2.5 Lisis celular**

Los pellets celulares se resuspendieron en buffer de lisis (5 mL/g). Se adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/mL y cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma P8340; 1 mM AEBSF, 14  $\mu$ M E64, 15  $\mu$ M Pepstatin A, 40  $\mu$ M Bestatin, 20  $\mu$ M Leupeptin, 0,8  $\mu$ M Aprotinin). El conjunto se incubó en hielo durante 30 min con agitación mecánica. Pasado este tiempo se sometió la muestra a 5 min de sonicación sobre hielo (50 % de amplitud, 15 s de pulso y 15 s de reposo), la muestra fue centrifugada a 12000 rpm por 20 min a 4 °C, separándose el sobrenadante (fracción soluble) y el pellet (fracción insoluble o cuerpos de inclusión).

#### **5.1.2.6 Detección de las proteínas recombinantes por electroforesis SDS-PAGE y western blot**

Los lisados de los clones inducidos se analizaron por electroforesis vertical SDS-PAGE. Para esto se tomó una alícuota de las fracciones insoluble y soluble obtenidas en la lisis y se resuspendieron en buffer de carga desnaturizante. Las muestras se calentaron a 92 °C durante 7 minutos. Se utilizó un gel concentrador de 3,9% y un gel separador de 12%, y se mantuvo una diferencia de potencial de 108 V. La visualización de las bandas se logró mediante la tinción del gel con azul de Coomassie R-250.

Para los ensayos de inmunodetección (western blot) las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (ThermoFisher), usando el método de electrotransferencia húmeda (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979), en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 10 % V/V, pH 8,3) aplicando 200 mA por 2 horas. La membrana se activó H<sub>2</sub>O destilada durante 30 s y al igual que el gel a transferir se equilibró en el buffer antes de realizar la electrotransferencia. A su término, se tiñó la membrana con Rojo Ponceau. Para detectar la proteína recombinante se realizó el siguiente procedimiento: **1)** Bloqueo de la membrana por 2 horas en buffer TBST-L (leche 5%, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween 20 0,1% V/V). **2)** Incubación de toda la noche con el anticuerpo primario (Anti etiqueta) en TBST (1:10000),

3 lavados de 10 min con TBST-L. **3)** Incubación durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG biotinilado de ratón en TBST (1:10000), 3 lavados de 10 min con TBST-L. **4)** Incubación durante 30 minutos con estreptavidina-fosfatasa alcalina en TBST (1:5000), 3 lavados de 10 min con TBST. **5)** Revelado de las proteínas con los sustratos cromogénicos BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt) y NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) en el buffer de reacción (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM). La membrana se documentó después del revelado. La proteína obtenida a partir del mejor sistema de expresión fue purificada posteriormente.

#### **5.1.2.7 Purificación de la proteína recombinante por afinidad a resina de amilosa**

La proteína MBP-PfNMNAT (MBP, maltose-binding protein) se purificó a partir de la fracción soluble mediante afinidad a resina de amilosa (New England Biolabs). Para eso se cuantificó densitométricamente mediante SDS-PAGE, comparando la intensidad de la banda con diferentes concentraciones conocidas de BSA. La resina se equilibró con buffer de lisis y se mezcló con la fracción soluble diluida (1:6). La unión se llevó a cabo durante 1 hora a 4 °C con agitación constante. La mezcla se transfirió a una mini columna, empacándose la resina y obteniéndose las proteínas no unidas. La resina se lavó con 12 volúmenes de buffer de lisis. La proteína MBP-PfNMNAT se eluyó con buffer de elución (buffer de lisis+maltosa 20 mM); se recolectaron 25 fracciones de aprox. 60 µL y se almacenaron a -80 °C. La purificación se analizó por SDS-PAGE. La proteína en la fracción soluble y en los eluidos se cuantificó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

#### **5.1.2.8 Ensayo enzimático directo**

La síntesis de NAD<sup>+</sup>, catalizada por la proteína MBP-PfNMNAT se determinó con ensayos enzimáticos directos, los cuales se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC). El ensayo enzimático contempla la siguiente ecuación:



Se realizó un ensayo *in vitro* para determinar la actividad de la proteína recombinante purificada. Las mezclas de reacción (1 mM mononucleótido de nicotinamida (NMN) y ATP 1.3 mM en buffer HEPES 100 mM + Mg<sup>2+</sup> 10 mM, pH 7.5) se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, al término de lo cual se detuvo la reacción con HClO<sub>4</sub> 1.2 M a 4 °C. La proteína se precipitó mediante centrifugación a 12000 rpm durante 3 minutos a 4 °C. Se neutralizó el sobrenadante con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M en hielo. Se tomaron 120 µl de sobrenadante y se diluyeron hasta 240 µL con H<sub>2</sub>O mQ. El resultado de la reacción *in vitro* se evaluó mediante HPLC en fase reversa. Se utilizó una columna Phenomenex Luna C18 (250mm x 4,60 mm; 5 µm). Se utilizaron como fases móviles buffer fosfato de potasio 0.12 M pH 6.0 y metanol. La separación se llevó a cabo en gradiente con un flujo constante de 1.5 ml/min, con un tiempo de 20 min por corrida. Los analitos, cuyos tiempos de retención se determinaron a partir de patrones, se detectaron espectrofotométricamente a 254 nm mediante un detector de arreglo de diodos.

## **5.2 Estudio de la relevancia funcional de secuencias específicas de la PfnMNAT, en aras de caracterizar la proteína, mediante el desarrollo de mutantes**

Una vez que se tenía la proteína PfnMNAT de forma soluble y activa, se procedió con el siguiente paso. Caracterización funcional y estructural de la PfnMNAT, mediante el desarrollo de mutantes de esta proteína que permitieron evaluar el efecto de modificar sus dominios exclusivos por medio de su actividad enzimática. Para llevar a cabo este objetivo fue necesario el diseño bioinformático y la producción de mutantes de la proteína, que se describirán a continuación.



### 5.2.1 Diseño de mutantes de la PfNMNAT

Se analizaron diversas proteínas mutantes de la PfNMNAT, para esto se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos de la PfNMNAT con sus ortólogas humanas (HsNMNAT 1-3), por medio del servidor en línea Clustal W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994), de allí se identificaron las regiones específicas de la proteína de *Plasmodium falciparum* que se podían alterar. Finalmente se hizo una predicción de la estructura terciaria mediante el servidor I-Tasser de la proteína silvestre como de las mutadas (Y. Zhang, 2008) y se identificaron valores de solubilidad, teniendo como control la proteína MBP-PfNMNAT mediante el servidor ProSo II (Smialowski et al., 2012).

### 5.2.2 Producción de mutantes de la PfNMNAT

Para poder establecer diferencias de la proteína PfNMNAT mutada en comparación con la silvestre, se estudiaron 2 versiones mutadas. Para esto el plásmido recombinante construido en la primera fase, se utilizó como plantilla para la producción de los mutantes (pMal c5X - PfNMNAT), tras los diseños que permitió ver las diferencias más llamativas en cuanto a cambios estructurales y solubilidad. La mutagénesis se realizó mediante el empleo del kit “Phusion Site Direct Mutagénesis” (Thermo Scientific™) cuyo fundamento permite en forma dirigida empleando PCR, crear deleciones o sustituciones dado el caso (Böhlke et al., 2000). Las condiciones de amplificación fueron: 1U de la enzima Phusion Hot Start II DNA polymerase, Phusion HF Buffer (1X), dNTP's (10 mM), H<sub>2</sub>O DEPC, 0,5  $\mu$ M de iniciadores (Tabla 5-2) y aproximadamente 10 pg de ADN plantilla, todo a un

volumen final de 25  $\mu$ L. Se empleó el siguiente perfil térmico: un ciclo de desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 seg., seguido por 25 ciclos de 98 °C por 10 seg, 67 °C por 30 seg, 72 °C por 35 seg, y una extensión final a 72 °C por 10 min (termociclador Biorad).

**Tabla 5-2. Iniciadores utilizados para realizar las mutaciones de la proteína PfnMNAT**

Nombre del iniciador	Secuencia 5' – 3'
N163D_Directo	CCCAAATTATCTTTTATCGATTTTATTTTCATCAAGTG
N163D_Reverso	CACTTGATGAAATAAAATCGATAAAAGATAATTTGGG
N163Y_Directo	CCCAAATTATCTTTTATCTATTTTATTTTCATCAAGTG
N163Y_Reverso	CACTTGATGAAATAAAATAGATAAAAGATAATTTGGG

### 5.2.2.1 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes PfnMNAT silvestre y mutantes

Para expresar las proteínas recombinantes PfnMNAT silvestre y mutadas, se realizó mediante la inducción de células *E. coli* BL21 (DE3), transformadas con los vectores de expresión correspondientes, a la proteína silvestre y proteínas mutadas. Se partió de inóculos de las bacterias de expresión en medio líquido Luria-Bertani (LB), suplementados con ampicilina a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml para cada vector y se incubó a 37°C con agitación constante hasta que alcanzó la densidad óptica adecuada, una vez alcanzada dicha densidad óptica, se inició la expresión de la proteína recombinante al adicionar el inductor adecuado (Mejía & Ramírez-Hernández, 2011). Las células fueron colectadas por centrifugación y lisadas mediante sonicación; la fracción soluble, fue el material de partida para purificar. La expresión y purificación de las proteínas recombinantes fue monitoreada por SDS-PAGE y Western blot (Dong, Lv, & Lai, 2012), y las alteraciones en solubilidad de la proteína mutada expresada fueron evaluadas por medio de densitometría, utilizando como control la proteína silvestre.

### 5.2.2.2 Evaluación de los mutantes obtenidos

Se realizó un ensayo de actividad enzimática de las proteínas recombinantes mutantes y silvestre purificadas, para verificar la síntesis de NAD<sup>+</sup> mediante ensayos enzimáticos directos, los cuales se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC), empleando los parámetros experimentales previamente estandarizados en la primera fase, para la proteína MBP-PfnMNAT silvestre y mediante ensayos acoplados, midiendo la reducción de NAD<sup>+</sup> a 340nm. El estudio comparativo entre

la actividad de la enzima respecto a sus mutantes permitió contribuir a entender la relevancia de las secuencias específicas del parásito (Zhou et al., 2002).

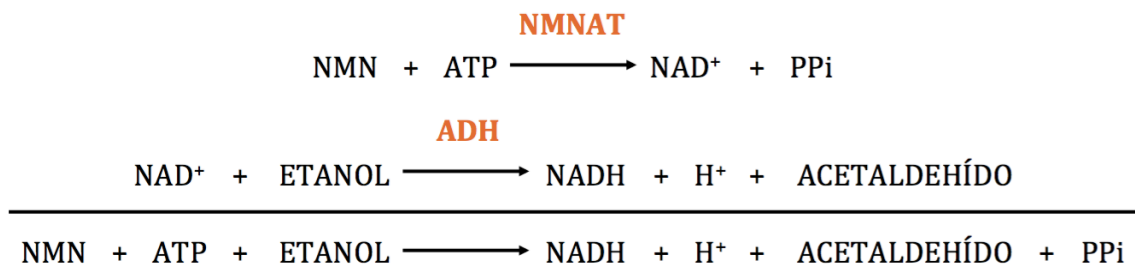
### 5.2.2.3 Determinación de las constantes cinéticas (Km y Vmax) de las proteínas recombinantes MBP-PfNMNAT y N163D/MBP-PfNMNAT

Establecidas las condiciones óptimas de actividad enzimática, se determinaron las constantes cinéticas de las proteínas recombinantes MBP-PfNMNAT, 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. Se empleó el ensayo enzimático acoplado para determinar las constantes por los sustratos NMN y ATP. La velocidad inicial de reacción, expresada como  $\mu\text{mol de NAD}^+$  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.

### 5.2.2.4 Ensayo enzimático acoplado

La actividad catalítica de la proteína MBP-PfNMNAT (síntesis de  $\text{NAD}^+$ ) se verificó mediante ensayos enzimáticos acoplados con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), monitoreando el incremento en la absorbancia a 340 nm, debido a la reducción del  $\text{NAD}^+$  a NADH, como ha sido descrito previamente (Balducci et al., 1995).

El sistema enzimático acoplado puede describirse mediante las siguientes ecuaciones químicas:

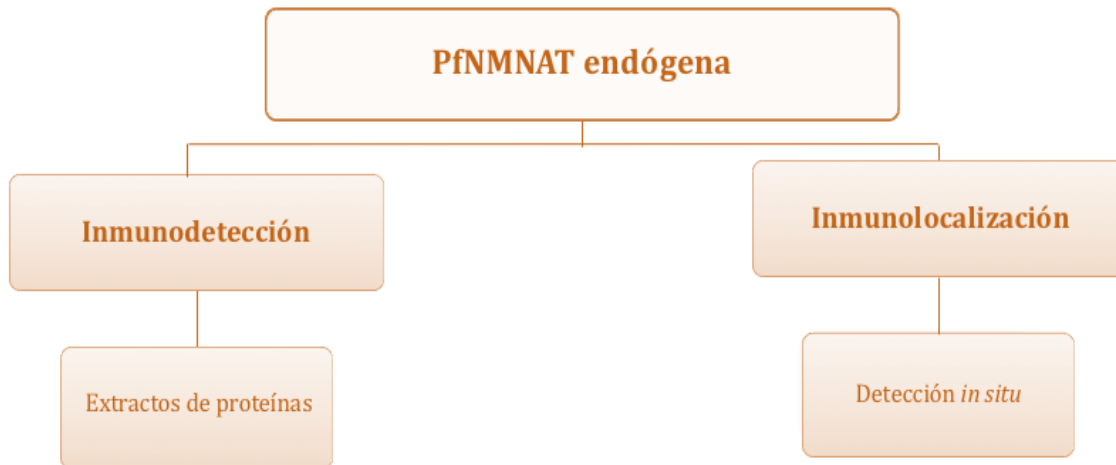


Se realizó una mezcla de reacción que contenía 40 mM etanol, 25 mM HEPES/KOH pH 7.4, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.25 mM ATP (Sigma), 1.25 mM NMN (Sigma) y 2 mU ADH (Sigma). Esta mezcla se alicuotó en placas de 96 pozos, se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 min y se inició la reacción al adicionar 2.5  $\mu\text{g}$  de las muestras a evaluar. Los ensayos se realizaron en un

volumen de 100  $\mu$ l a 37°C con agitación constante en el lector de microplacas GENios (TECAN), registrando los valores de absorbancia a 340 nm durante 15 min.

### 5.3 Determinación de la localización de la PfNMNAT endógena

Con el objeto de estudiar la proteína NMNAT endógena del parásito, se realizaron ensayos de Inmunodetección e inmunolocalización empleando extractos celulares y parásitos fijados en láminas. La primera estrategia permitió el reconocimiento de la proteína endógena del parásito mediante extractos proteicos solubles empleando western blot, y los anticuerpos previamente realizados contra la proteína His-PfNMNAT. La segunda estrategia consistió en la detección *in situ* de la proteína PfNMNAT sobre los parásitos, empleando los anticuerpos previamente desarrollados contra la proteína His-PfNMNAT y microscopía de fluorescencia. Para realizar estos experimentos fue necesario el cultivo del parásito en el laboratorio.



#### 5.3.1 Cultivo de *Plasmodium falciparum*

*Plasmodium falciparum* de la cepa FCR-3 se cultivaron *in vitro* (Trager & Jensen, 1976). El cultivo se mantuvo con sangre humana tipo A factor Rhesus positivo a un hematocrito del 5% en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con: buffer HEPES 25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 32 mM y suero humano A+ inactivado al 15%. Los parásitos fueron incubados a 37 °C en atmosfera de CO<sub>2</sub> 5%, O<sub>2</sub> 5% y N<sub>2</sub> 90%, con cambios de medio cada 24 h hasta obtener parasitemias cercanas al 20 – 40%. Los parásitos fueron sincronizados con sorbitol 5% a 37°C por 10 min, con lo cual se lisan las formas maduras del parásito y se mantienen



las formas de anillos (Lambros & Vanderberg, 1979). Cultivos sincrónicos en el estadio de anillos, se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar el estadio de trofozoítos y esquizontes.

Los parásitos en los diferentes estadios asexuales se obtuvieron por medio centrifugación a 2500 rpm por 5 min y se lisaron los eritrocitos con saponina a una concentración final de 0,01% en buffer PBS a 4°C durante 15 minutos. Los parásitos fueron recuperados por centrifugación a 14000 rpm por 15 minutos, se lavaron con PBS 1X hasta eliminar completamente los residuos de las membranas del eritrocito y hemoglobina.

### **5.3.2 Obtención de extractos proteicos citoplasmáticos**

Una vez que se tenían parásitos en los tres estadios de desarrollo intraeritrocítico, aproximadamente de 2 a 4 millones de parásitos fueron resuspendidos en 100 µL de buffer TMG, inhibidor de proteasas (Sigma P8340; 1mM AEBSF, 14µM E64, 15µM Pepstatin A, 40 µM Bestatin, 20 µM Leupeptin, 0,8 µM Aprotinin), lisados por incubación con el detergente no ionico NP-40 al 0,2% a 4°C por 30 minutos y 30 segundos de sonicación con una amplitud de 50%, 15 segundos de pulsos y 15 segundos de reposo. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su uso.

### **5.3.3 Inmunodetección de la PfNMNAT**

Para la detección de la PfNMNAT en extractos proteicos asincrónicos se estandarizaron las condiciones adecuadas para el ensayo de western blot. Entre estas se encuentra: título óptimo de anticuerpo, cantidad de extracto proteico necesario para la detección de la proteína en estudio y sistema de detección. A continuación, se describen las condiciones que obtuvieron los mejores resultados: 80 – 100 µg de extracto proteico fueron separados por SDS-PAGE en geles del 12% y transferidos a membranas de PVDF (Thermo) por 2h a 200 mA en buffer de electrotransferencia. Las membranas fueron bloqueadas 12 h en TBST-L e incubadas por otras 12 horas con los sueros previamente obtenidos a una dilución de 1:1000 en TBST-L (Mejía & Ramírez-Hernández, 2011). Se realizaron tres lavados con TBST-L por 10 minutos cada uno, se incubó por 2h con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón y anti-IgY de gallina acoplados a biotina (1:2000) y nuevamente se hicieron 3 lavados con TBST-L. La reacción de inmunodetección fue

revelada con sustratos cromogénicos para fosfatasa alcalina acoplada a estreptavidina como se describió anteriormente.

### **5.3.4 Inmunoprecipitación de PfnMNAT**

Se prepararon extractos proteicos citoplasmáticos como se describió anteriormente utilizando 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . El extracto se aclaró por 1h a 4 °C con agitación constante, empleando 100  $\mu\text{l}$  de resina tiofílica (Pierce), previamente equilibrada en buffer TMG. El extracto aclarado se incubó O/N con 50  $\mu\text{L}$  del anticuerpo IgY His-PfnMNAT purificado a partir de sangre de gallina a 4 °C con agitación constante. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de resina tiofílica, previamente equilibrada en buffer TMG y se incubó por 2 h a 4 °C con agitación constante. El inmunoprecipitado se obtuvo al centrifugar las muestras a 4500 xg por 3 min a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó 3 veces con 500  $\mu\text{l}$  de buffer TMG, 10 min cada uno. El precipitado final se resuspendió en 80  $\mu\text{L}$  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 tinción con plata. Paralelamente, se realizó Western blot con los anticuerpos anti His-PfnMNAT, y los anticuerpos para reconocer fosforilaciones en residuos de T, Y y S.

### **5.3.5 Determinación de la localización subcelular mediante inmunofluorescencia de PfnMNAT en *Plasmodium falciparum***

Para determinar la localización subcelular de la proteína endógena mediante inmunofluorescencia se siguió el protocolo reportado por Tonkin y colaboradores (Tonkin et al., 2004), como control negativo se usó el suero preinmune de las gallinas inmunizadas. Se partió de un cultivo asincrónico y se centrifugó a 1000 g x 10 min a 4°C y se lavó con PBS 1X para eliminar impurezas, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de glóbulos rojos empacados infectados y se fijaron con paraformaldehído al 4% y 0,0075% de glutaraldehído en PBS 1X durante 30 min con agitación mecánica constante. Las células fijadas se lavaron con PBS 1X y se permeabilizaron con 0,1% de Tritón X-100 en PBS 1X durante 10 min, de nuevo se lavaron las células con PBS 1X y se tratan con 0,1mg/ml de  $\text{NaBH}_4$ /PBS durante 10 min, para reducir los grupos aldehído libres. De nuevo se lavaron con PBS 1X y se bloqueó con BSA al 3% en PBS 1X durante 1 hora. Se incubaron las células con el anticuerpo primario anti IgY His-PfnMNAT en una dilución 1:250 en BSA/PBS 1X al 3% por 2 horas. Las células se lavaron tres veces con PBS 1X durante 10 min cada uno para

eliminar el exceso del anticuerpo primario. Como anticuerpo secundario se empleó anti IgY-FITC, en dilución con BSA/PBS al 3% y se incubó por 1 h. Se realizó tinción nuclear usando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1µg/ml) en dilución con BSA/PBS al 3% por 5 minutos. De nuevo se lavó tres veces con PBS 1X por 10 min cada uno y se realizaron extendidos en láminas portaobjetos usando 5 µl de la muestra. El montaje de las láminas se realizó con 10 µL fluoromount, se observaron y se registraron en el microscopio de fluorescencia (Nikon C1 plus), con un objetivo de 100X.

## **5.4 Identificación de los niveles de expresión transcripcional y proteico en los estadios del ciclo de vida asexual del parásito**

Para establecer los niveles de expresión de mRNA y de proteína en los diferentes estadios de la fase asexual del parásito, fue necesario la sincronización del cultivo en cada uno de ellos: anillo, trofozoito y esquizonte. Se extrajo RNA de cada uno de los estadios, y se usó métodos de biología molecular como PCR acoplada a transcriptasa reversa para la síntesis de cDNA. Para los niveles proteicos se realizaron extractos citoplasmáticos de cada uno de los estadios como se mencionó anteriormente y se reconocieron con los anticuerpos previamente realizados en el laboratorio.

### **5.4.1 Extracción de ARN**

Cultivo de *Plasmodium falciparum* sincronizado en los diferentes estadios de la fase asexual fueron recolectados y reservados para la extracción de ARN por el método de trizol cloroformo. Se utilizó el cultivo con parasitemia cercana al 40%. Para la extracción de ARN, se utilizó 10 volúmenes de Trizol con respecto al volumen de sangre empacada, se resuspendieron completamente y se almacenaron a -70°C hasta su uso. La extracción inició descongelando las muestras a 37°C y se adicionó 0,2 volúmenes de cloroformo por volumen de trizol, se agitó por aproximadamente 3min y se centrifugó a 4°C por 30 min a 9000xg. Se removió la capa acuosa superior en un tubo nuevo y se le adicionó 0,5 volúmenes de 2-propanol por volumen de trizol y se mezcló por inversión. Se dividió el volumen en 9 tubos de 1,5 µL y se precipitó a -20°C por 24 horas. Finalmente se centrifugó la muestra a 12000 g por 30 minutos a 4°C y se removió el sobrenadante tanto como fue posible, se lavó con 500 µL de etanol al 75% en H<sub>2</sub>O DEPC. Enfriado en hielo y se secó la muestra con el tubo invertido a temperatura ambiente por 5 minutos. Se resuspendió el RNA en 100 µL de H<sub>2</sub>O DEPC y se almacenaron alícuotas de 20 µL hasta su uso a 70°C.

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

### 5.4.2 PCR acoplada a transcriptasa reversa

Se emplearon 2 µg de ARN puro (A260/A280 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. 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. Posteriormente, se realizó la reacción de PCR usando el ADNc sintetizado, siguiendo las condiciones de PCR previamente estandarizadas para los ensayos anteriores. Se usaron los iniciadores que amplifican la región codificante completa de la PfnMNAT, además de un iniciador reverso que hibrida en una región media (Tabla 5-3). Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, y se tiñeron con bromuro de etidio.

**Tabla 5-3. Iniciadores para verificar la expresión de PfnMNAT a nivel de RNA**

<b>Amplicón</b>	<b>Iniciador directo (5' – 3')</b>	<b>Iniciador reverso (5' – 3')</b>
615 pb	ATGCATAAGAATATATGT	CTAATTAAAATCATATAAGTT
320 pb		AAGACCAAAGTAAAAGGTGTA

### 5.4.3 Extractos proteicos

Los extractos proteicos se obtuvieron utilizando la metodología del literal 5.3.2.

### 5.4.4 Inmunodetección

Se utilizó la misma metodología utilizada en el literal 5.3.3., usando el anticuerpo Anti IgY, ya que presentó los mejores resultados.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se mostrarán las evidencias experimentales y bioinformáticas obtenidas para el cumplimiento de los objetivos propuestos.

### 6.1 Optimización de la expresión y purificación de la proteína PfNMNAT, usando diversos vectores de expresión.

En un trabajo anterior se construyó el plásmido recombinante pET100-PfNMNAT, que permite la expresión de la proteína PfNMNAT unida a una etiqueta de hexa-histidinas (PfNMNAT:25,5 kDa+ His:3 kDa = 28,5kDa), al momento de analizar la expresión en la fracción soluble e insoluble a partir del sistema heterólogo *E. coli* BL21 (DE3), la proteína se acumula en la fracción insoluble como cuerpos de inclusión (Marín, 2010). Con el propósito de aumentar la solubilidad de la proteína recombinante His-PfNMNAT, en un siguiente trabajo se evaluaron dos estrategias para aumentar la solubilidad: (1) cepas de expresión (BL21- CodonPlus(DE3)-RIL, BL21(DE3) pLysS y Rosetta (DE3) pLysS) y (2) co-expresión con chaperonas moleculares (plásmido pG-KJE8 - Takara BIO INC). Los mejores resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a solubilidad fueron obtenidos utilizando el sistema de expresión CodonPlus, sin embargo, pese a que se solubilizó la proteína de interés, mayoritariamente se mantenía en la fracción insoluble (Mejía & Ramírez-Hernández, 2011), siendo un problema para continuar con su caracterización.

Diversos autores han informado del reto de obtener proteínas recombinantes solubles de *Plasmodium falciparum* en el sistema heterólogo *E. coli*; por ejemplo, en un trabajo realizado en el 2006, trataron de expresar 1000 proteínas, encontrando que solo el 33,7% se expresa y tan solo el 6,3% se encuentra en la fracción soluble (Mehlin et al., 2006). Debido a que ya se habían probado diferentes condiciones de expresión, la opción a seguir para obtener la proteína recombinante de *Plasmodium* en la fracción soluble es el cambio de vectores (Birkholtz et al., 2008), que por un lado implica adición de etiquetas que pueden ayudar a solubilizar y/o cambio de promotores fuertes por débiles para disminuir la tasa de transcripción/traducción de la proteína interés, evitando precipitación y agregación como cuerpos de inclusión. Para escoger los vectores inicialmente se analizó la composición de aminoácidos de la proteína en mención, y se verificó la presencia de 4 residuos de cisteína. Esta evidencia permite suponer que la PfNMNAT establece un puente

la proteína. Se analizaron diferentes vectores de expresión, que adicionan la etiqueta en el extremo N- terminal (ya que la adición en el C-terminal puede estar alterando la actividad catalítica de la proteína) y los resultados más prometedores en cuanto aumento de solubilidad fueron los vectores: pET SUMO, pCOLD TF y pMAL c5X.

### 6.1.1 Estimación *in silico* de la solubilidad

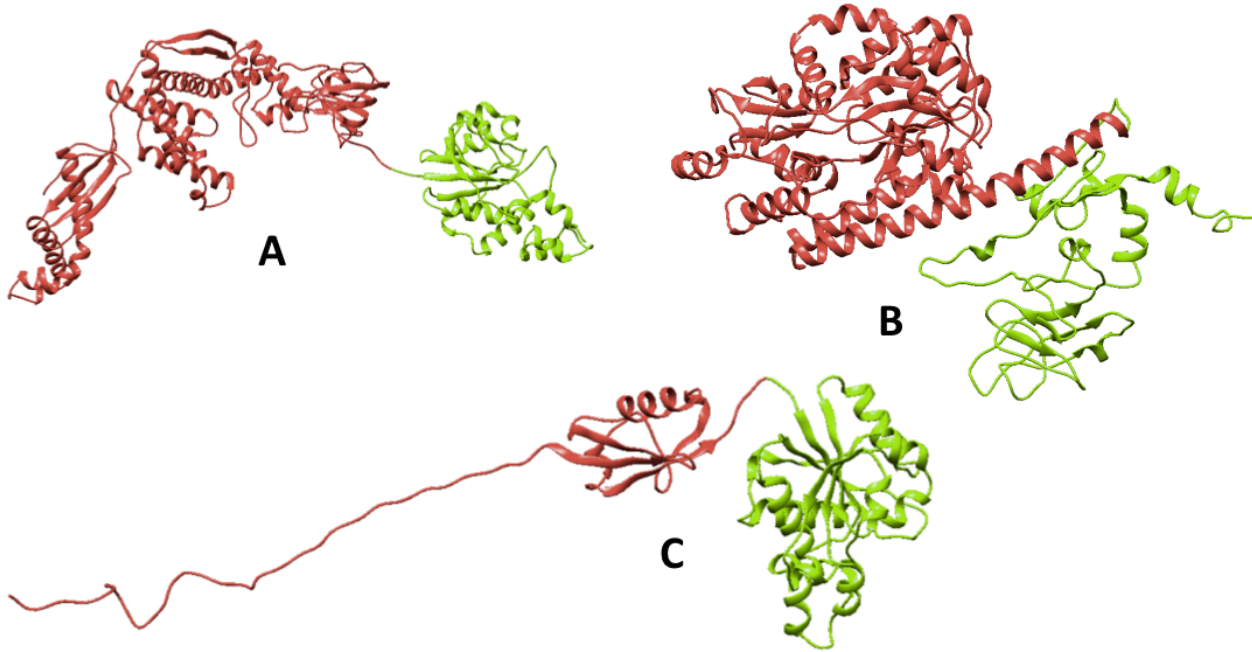
El estudio bioinformático indicó una mayor solubilidad de la proteína PfNMNAT expresada desde el vector pMAL-c5X. Los resultados para la PfNMNAT expresada desde los otros vectores no fueron concluyentes, encontrándose divergencias entre uno u otro programa empleado, esto se puede deber a la matriz de comparación de proteínas utilizado para alimentar cada programa. Como control se usó la secuencia primaria de la proteína sin ninguna etiqueta, donde se puede observar que la expresión de esta proteína recombinante en el sistema heterólogo *E. coli*, conllevaría a la agregación como cuerpos de inclusión (teniendo en cuenta que es una secuencia foránea en la bacteria, y por ende no se puede resolver su plegamiento), esto deja en evidencia la importancia de adicionar las etiquetas para obtener la versión recombinante de forma soluble para poder realizar su estudio (Tabla 6-1). Ya que aproximadamente todos los programas predicen solubilidad del 50%, se procedió a evaluar el desempeño de estos vectores y etiquetas en la solubilidad experimentalmente. En la figura 6-1 se puede observar los modelos tridimensionales para cada una de las proteínas recombinantes, debido a que la estructura de algunas de las etiquetas fueron utilizadas como plantillas para aliemntar el servidor, el plegamiento de la etiqueta se observa mejor resuelto en comparación con la proteína de interés. Sin embargo, esto solo se utilizó para tener una predicción de cómo se podría estar plegando la proteína cuando es unida a cada una de las etiquetas aportadas por los vectores evaluados.

**Tabla 6-1. Predicción *in silico* de la solubilidad de las proteínas recombinantes PfNMNAT usando programas bioinformáticos en línea**

Plásmido recombinante	SolPro	ProSo II	ESPRESSO
pCOLD-PfNMNAT	53,5%	66,7%	48,3,7%
pMAL C5X-PfNMNAT	60,6%	70,3%	50,0%
pET SUMO-PfNMNAT	20,3%	43,3%	46,1%
PfNMNAT	17,7%	53,7%	44,5%

**Figura 6-1: Modelos estructurales de la PfNMNAT unida a las diferentes etiquetas**

A. His/TF-PfNMNAT (C-score:-2,00), B. MBP-PfNMNAT (C-score:-0,25), C. His/SUMO-PfNMNAT (C-score:-3,29). Modelos predichos por el servidor I-TASSER y visualizados en UCSF Chimera. Verde: etiqueta y Rojo: PfNMNAT

**6.1.2 Amplificación de la PfNMNAT, clonación y transformación en cepas de mantenimiento**

Se obtuvieron los productos de PCR deseados para cada pareja de iniciadores. La clonación en los tres vectores empleados fue exitosa, después del análisis por PCR y digestión con enzimas de restricción. A continuación, se describe y se muestra la construcción de cada uno de los plásmidos recombinantes.

**pMAL c5X (New England Biolabs)**

Este vector adiciona la proteína MBP modificada (Proteína de unión a maltosa, chaperona molecular), ya que no presenta el péptido señal característico que exporta la proteína hacia el periplasma, manteniéndola en el citoplasma. El vector está bajo el dominio del promotor Tac, un híbrido entre el promotor de lactosa y el de triptófano. La selección de colonias se hace con ampicilina, y se puede monitorear la expresión y purificación por medio de los anticuerpos dirigidos contra MBP. De esta forma la proteína recombinante PfNMNAT tiene un peso teórico de 67,5 kDa (Figura 6-2).

**Figura 6-2: Obtención de la proteína recombinante MBP-PfNMNAT**

A. Diseño metodológico para la clonación en el vector pMAL c5X (New England Biolabs).

B. Amplificación de la región codificante de la PfNMNAT (615pb) mediante PCR. 1. Amplificación a partir de ADN genómico (*P. falciparum* FCB2), 2. Amplificación a partir de ADN plasmídico (pET100 - PfNMNAT). El producto amplificado se purificó desde el gel y se ligó en el vector de clonación pGEMT-easy. La reacción de ligación se empleó para transformar células *E. coli* TOP10.

C. Rastreo de colonias mediante PCR. 1 y 2. Colonias rastreadas. Se extrajo el plásmido mediante lisis alcalina y se sometió a digestión enzimática con las enzimas BamHI y EcoRI para clonar en el vector pMAL c5X.

D. Análisis del plásmido recombinante pMAL c5X – PfNMNAT mediante PCR. 1 y 2. Plásmidos recombinantes extraídos.

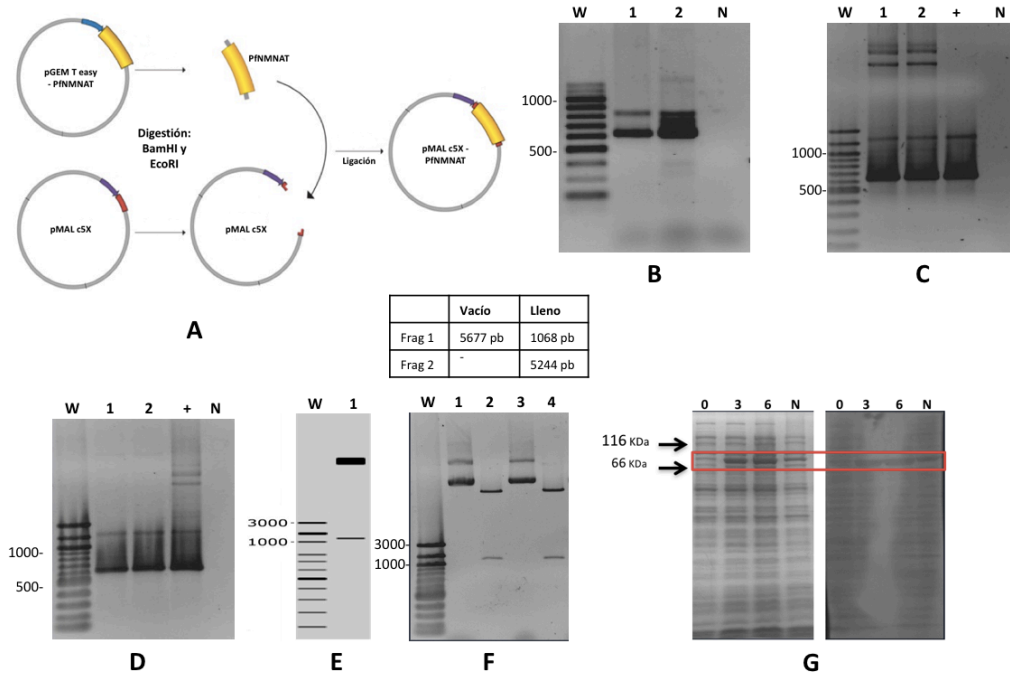
E. Perfil teórico de digestión del plásmido recombinante pMAL c5X – PfNMNAT con la enzima BgIII. Simulación generada con el programa SnapGene.

F. Análisis del plásmido recombinante pMAL c5X – PfNMNAT mediante corte con la enzima BgIII. 1 y 3. Plásmidos recombinantes no digeridos. 2 y 4. Plásmidos recombinantes digeridos.

G. Análisis de la expresión de MBP-PfNMNAT. Tiempos de inducción evaluados: 0, 3, 6 y N (toda la noche). Desde las 3 horas se observa un incremento en la expresión de la proteína recombinante.

W. Marcador de peso molecular 100 pb Axygen. N. Control negativo de la reacción de PCR. +. Control positivo de la reacción de PCR. Geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio. SDS-PAGE 12% teñido con azul de comassie R-250 y Western blot en membrada de PVDF. Anticuerpo primario: Anti-MBP 1:10000, Secundario: Anti conejo biotina 1:8000. Estreptavidina fosfatasa alcalina: 1:5000. Revelado con sustratos cromogénicos NBT y BCIP.





**pCOLD TF (Takara)**

Su nombre se debe a que su inducción se realiza en frío (15°C), se encuentra bajo el dominio del promotor de la proteína CspA (proteína de choque en frío), con esto se asegura que la expresión mayoritariamente va a ser de la proteína de interés debido a que la traducción del resto de las proteínas de *E. coli* se ve disminuida. La etiqueta otorgada por este vector es la His+TF (se une la chaperona Trigger factor, la cual es soluble y puede ayudar al plegamiento de la proteína de interés), inducible con IPTG y se reprime con glucosa. La selección de colonias se hace con el antibiótico ampicilina. De esta forma la proteína recombinante PfNMNAT tiene un peso teórico de 77,5 kDa (Figura 6-3).

**Figura 6-3: Obtención de la proteína recombinante His+TF-PfNMNAT**

A. Diseño metodológico para la clonación en el vector pCOLD TF (Takara).

B. Amplificación de la región codificante de la PfNMNAT (615 pb) mediante PCR. 1. Amplificación a partir de ADN genómico (*P. falciparum* FCB2), 2. Amplificación a partir de ADN plasmídico (pET100 - PfNMNAT). El producto amplificado se purificó desde el gel y se ligó en el vector de clonación pGEMT-easy. La reacción de ligación se empleó para transformar células *E. coli* TOP10.

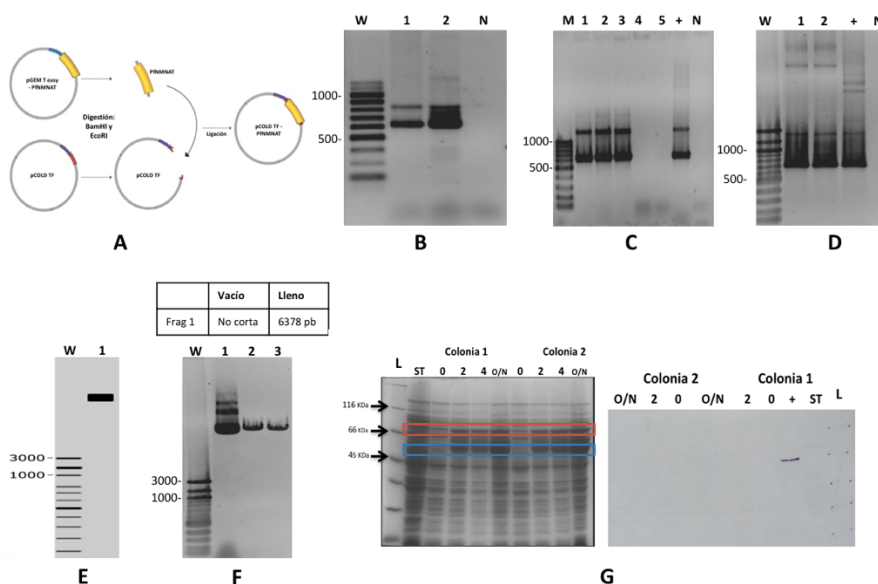
C. Rastreo de colonias mediante PCR. 1 a 5. Colonias rastreadas. Se extrajo el plásmido mediante lisis alcalina y se sometió a digestión enzimática con las enzimas BamHI y EcoRI para clonar en el vector pCOLD TF.

E. Perfil teórico de digestión del plásmido recombinante pCOLD TF–PfnMNAT con la enzima BglIII. Simulación generada con el programa SnapGene.

F. Análisis del plásmido recombinante pCOLD TF–PfnMNAT mediante corte con la enzima BglIII. 1. Plásmidos recombinantes no digeridos. 2 y 3. Plásmidos recombinantes digeridos.

G. Análisis de la expresión de His+TF–PfnMNAT. Tiempos de inducción evaluados: 0, 2, 4 y toda la noche. Desde las 2 horas se observa un incremento en la expresión de la proteína recombinante ST. Perfil de proteínas totales de *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. +. Control positivo de western blot (His+SUMO–PfnMNAT).

W. Marcador de peso molecular 100 pb Axygen. M. Marcador de peso molecular 100pb ThermoScientific. L. Patrones de peso molecular Thermo Fisher Scientific. N. Control negativo de la reacción de PCR. +. Control positivo de la reacción de PCR. Geles de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. SDS-PAGE 12% teñido con azul de comassie R-250 y Western blot en membrada de PVDF. Anticuerpo primario: Anti-Histidinas 1:8000, Secundario: Anti mouse biotina 1:8000. Estreptavidina fosfatasa alcalina: 1:5000. Revelado con sustratos cromogénicos NBT y BCIP.



### pET SUMO (Thermo Fisher Scientific)

Es un vector que adiciona la etiqueta His+SUMO (se ha visto que la proteína SUMO puede ayudar a solubilizar proteínas *in vivo*) a la proteína de interés, permitiendo monitorear la expresión y purificación de la proteína recombinante por medio de anticuerpos Anti-Histidinas, inducible con IPTG y su expresión se reprime con glucosa. Este vector se encuentra bajo el dominio del promotor T7, permite la selección con Kanamicina. De esta forma la proteína recombinante PfnMNAT tiene un peso teórico de 38,5 kDa (Figura 6-4).

A. Amplificación de la región codificante de la PfnMNAT (615 pb) mediante PCR. 1. Amplificación a partir de ADN genómico (*P. falciparum* FCB2), 2. Amplificación a partir de ADN plasmídico (pET100 - PfnMNAT).

B. Purificación del producto de PCR. El producto amplificado se purificó desde el gel y se ligó en el vector de clonación pET SUMO. La reacción de ligación se empleó para transformar células *E. coli* TOP10.

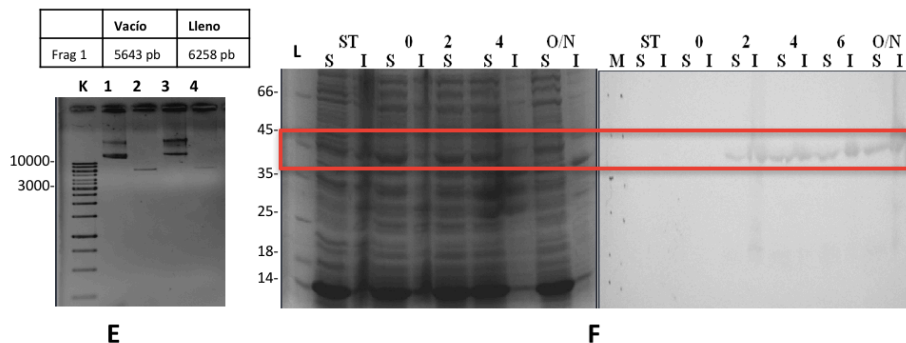
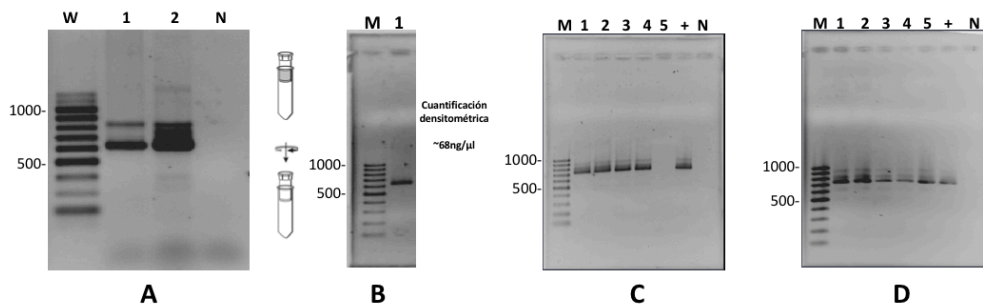
C. Rastreo de colonias mediante PCR. 1 a 5. Colonias rastreadas. Se extrajo el plásmido mediante lisis alcalina.

D. Análisis del plásmido recombinante pET SUMO–PfnMNAT mediante PCR. 1 a 5. Plásmidos recombinantes extraídos.

E. Análisis del plásmido recombinante pET SUMO – PfnMNAT mediante corte con la enzima XbaI. 1 y 3. Plásmidos recombinantes no digeridos. 2 y 4. Plásmidos recombinantes digeridos.

F. Análisis de la expresión de His+SUMO-PfnMNAT. Tiempos de inducción evaluados: 0, 2, 4, 6 y toda la noche. Desde las 2 horas se observa un incremento en la expresión de la proteína recombinante. ST. Perfil de proteínas totales de *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. S. Fracción soluble. I. Fracción insoluble.

W. Marcador de peso molecular 100 pb Axygen. M. Marcador de peso molecular 100pb ThermoScientific. K. Marcador de peso molecular 1Kb Thermo Fisher Scientific. L. Patrones de peso molecular Thermo Fisher Scientific. N. Control negativo de la reacción de PCR. +. Control positivo de la reacción de PCR. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. SDS-PAGE 12% teñido con azul de comassie R-250 y Western blot en membrada de PVDF. Anticuerpo primario: Anti-Histidinas 1:8000, Secundario: Anti mouse biotina 1:8000. Estreptavidina fosfatasa alcalina: 1:5000. Revelado con sustratos cromogénicos NBT y BCIP.



Se logró la construcción de los tres vectores planteados que permiten la expresión de la PfnMNAT con etiquetas diferentes, los cuales fueron evaluados a nivel de expresión en la siguiente fase del trabajo.

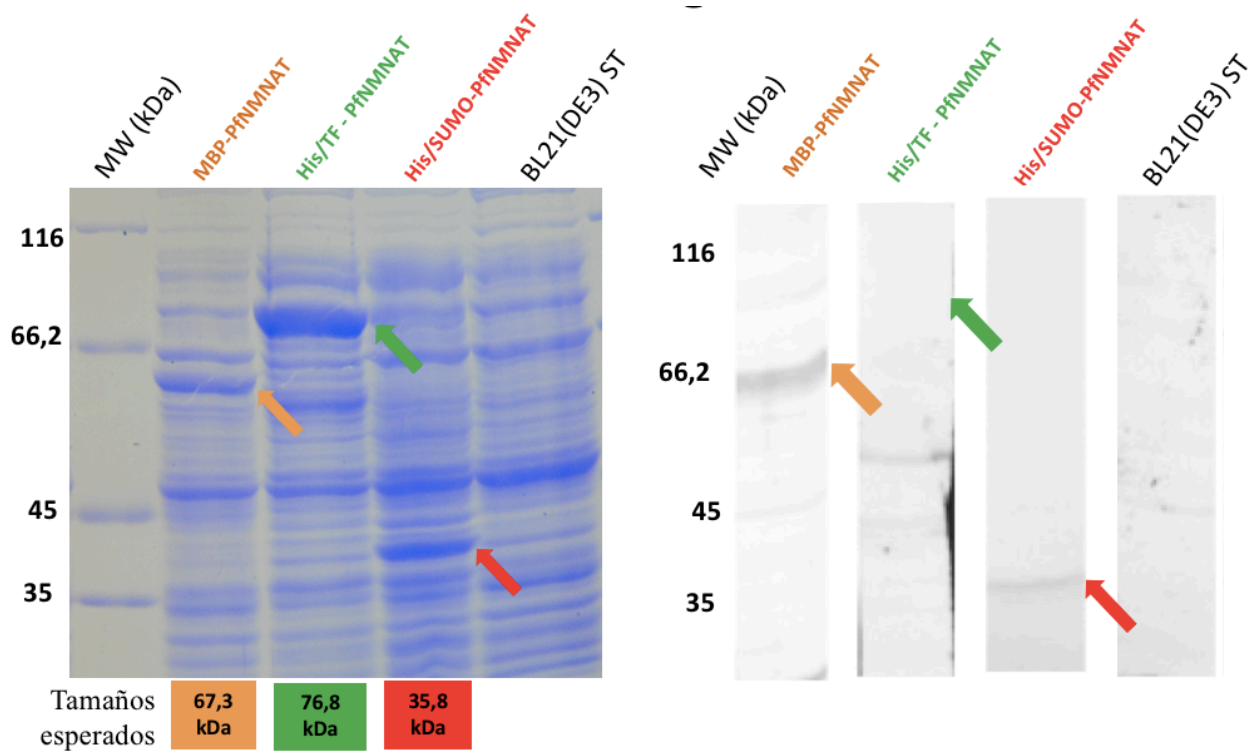
### **6.1.3 Expresión de las proteínas recombinantes PfnMNATs**

En la figura 6-5 se muestra el perfil electroforético de cada uno de los sistemas de expresión evaluados: His+SUMO, His+TF y MBP. Los pesos correspondientes para las proteínas His+TF-PfnMNAT y His+SUMO-PfnMNAT, coincidían con el tamaño esperado. La MBP-PfnMNAT presentó un peso experimental levemente menor al teórico, no obstante, su identidad se confirmó mediante anticuerpos específicos. Adicionalmente, la proteína His+TF-PfnMNAT a pesar de tener el tamaño esperado no fue reconocida con los anticuerpos Anti-histidinas. Se observa una mayor expresión relativa de la proteína con la etiqueta MBP respecto a His+SUMO. Hasta el día de hoy no se tiene claro el mecanismo por el cual la proteína fusión puede modificar la solubilidad de la proteína de interés, sin embargo, la MBP es una de las más estudiadas. La proteína de unión a maltosa puede estar funcionando como una chaperona molecular la cual mediante su bolsillo hidrofóbico secuestra la proteína con plegamiento intermedio y le da una segunda oportunidad de plegamiento, esto permite que la proteína recombinante tenga el plegamiento nativo y por lo cual se exprese en la fracción soluble, si por el contrario no se puede resolver el plegamiento de ésta, formará agregados insolubles (Fox, Kapust, & Waugh, 2001; Kapust & Waugh, 1999). Otra hipótesis sobre el mecanismo de acción de MBP es su función como imán de chaperonas, reclutando chaperonas asociadas a MBP que puedan ayudar a resolver el plegamiento de la proteína fusionada (Randall, Topping, Smith, Diamond, & Hardy, 1998). Por otro lado, los vectores pMal c5X y pCOLD TF al contrario de los vector pET (pET100/d-TOPO o pET SUMO) tienen un promotor débil, lo que permite que el gen tenga una tasa más reducida tanto de transcripción como de traducción. 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 y agregación como cuerpos de inclusión (Singh, Upadhyay, & Panda, 2014). La proteína MBP fusionada a la PfnMNAT en la región amino terminal permitió realizar la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad, debido a la elevada interacción de la resina de amilosa por las proteínas recombinantes que contienen la etiqueta. MBP consta de dos dominios estructurales en forma de bisagra que le permiten interactuar con diversos azúcares como la amilosa y la maltosa, la unión hacia ellas genera un cambio conformacional que cierra la proteína, en la cual se enlaza con el azúcar por enlaces de puentes de hidrogeno y por contactos de Van der Waals, principalmente con residuos aromáticos, causando un enrollamiento de las cadenas laterales contra la cara de los anillos de azúcar. Estos enlaces

conformación cerrada de la proteína (Duan & Quioco, 2002; Sharff, Rodseth, Spurlino, & Quioco, 1992; Spurlino, Lu, & Quioco, 1991). Se esperaba que el tamaño de la proteína fusión (42,5 kDa) no interfiriera en la estructura y función de la proteína purificada, lo cual se confirmó mediante ensayos enzimáticos posteriores.

### Figura 6-5: Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes PfnMNATs

A. SDS – PAGE 12% teñido con azul de Coomassie. B. Inmunodetección en membrana de PVDF. Anticuerpo 1º: Anti-etiquetas respectivamente 1:8000. Anticuerpo 2º: Anti ratón o conejo Biotina 1:8000. Estreptavidina fosfatasa alcalina 1:5000. (Las flechas indican las proteínas expresadas y reconocidas en el western blot, las bandas inespecíficas son comunes hasta en el control negativo y se deben a reconocimiento con el anticuerpo secundario)

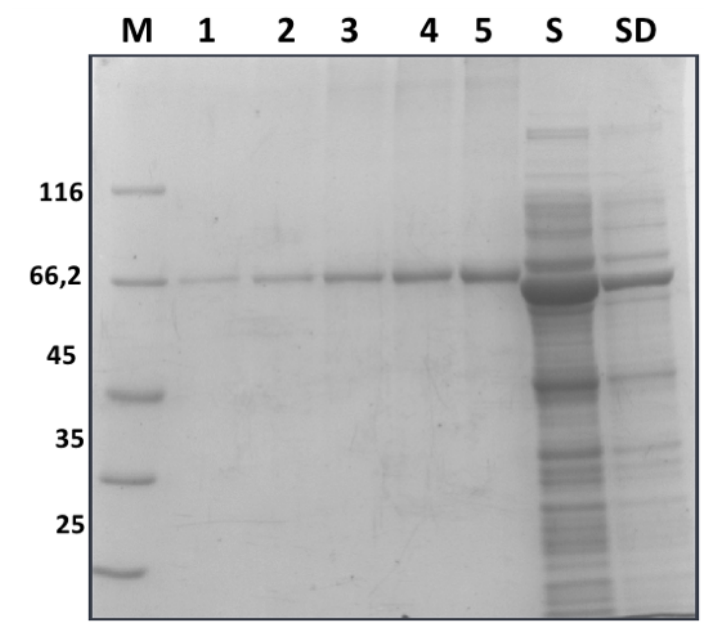


#### 6.1.4 Purificación mediante cromatografía de afinidad a amilosa de MBP-PfnMNAT

La purificación de la proteína se llevó a cabo en condiciones nativas, buscando no interferir con su funcionalidad y estructura. Se cuantificó mediante densitometría (Figura 6-6), encontrando que se necesitan 400  $\mu$ L de resina empacada para purificar 6ml de fracción soluble que contienen un total de proteína de  $\sim$ 7mg (Tabla 6-2).

### Figura 6-6: Cuantificación densitométrica de la MBP-PfnMNAT

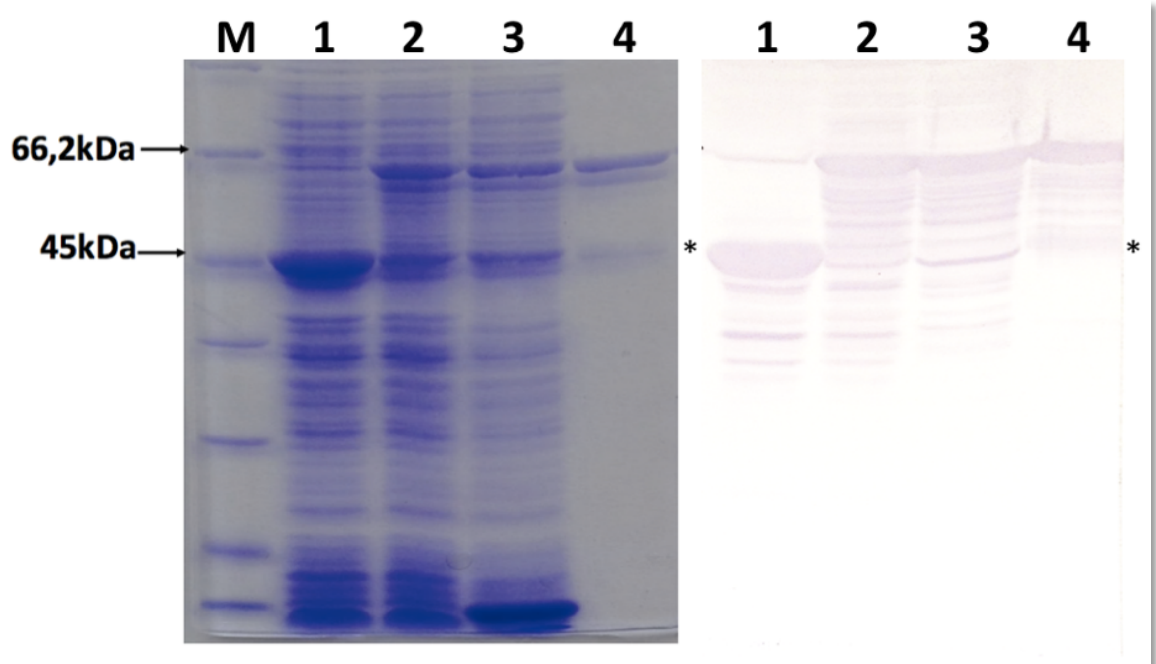
PfNMNAT diluida 1:6 (5µl). M. Patrones de peso molecular (Thermo Fisher Scientific). SDS – PAGE 12% teñido con azul de Coomassie R-250



La purificación por cromatografía de afinidad de la MBP-PfNMNAT fue seguida mediante SDS-PAGE (Figura 6-7). Se observó que a partir de los lavados se elimina una gran cantidad de proteínas no unidas, permitiendo obtener eluidos con la proteína recombinante parcialmente pura y concentrada. Se presentó una contaminación por una proteína de aproximadamente 45kDa correspondiente a un producto de degradación, debido a una alta tasa de degradación de la proteína recombinante PfNMNAT expresada, y el tamaño corresponde a la etiqueta que por el contrario es muy estable. Esta hipótesis se corroboró mediante western blot usando anti-MBP, en el cual se observó reconocimiento bajo del producto de degradación (Figura 6-7), esto se puede deber entonces a que el anticuerpo utilizado es monoclonal y posiblemente donde se está generando la proteólisis es el epítipo de reconocimiento, obteniendo una señal menos intensa que con la proteína recombinante no degradada.

**Figura 6-7: Expresión y purificación de la MBP-PfNMNAT mediante cromatografía de unión a amilosa**

1. Proteínas totales BL21(DE3) expresión etiqueta MBP (Control), 2. Proteínas totales BL21(DE3) expresión de MBP-PfNMNAT, 3. Proteínas solubles BL21(DE3) expresión de MBP-PfNMNAT, 4. Eluido de la purificación de la MBP-PfNMNAT mediante cromatografía de afinidad. M. Patrón de peso molecular. SDS-PAGE 10% Teñido con azul de coomassie R-250. \* producto de degradación.

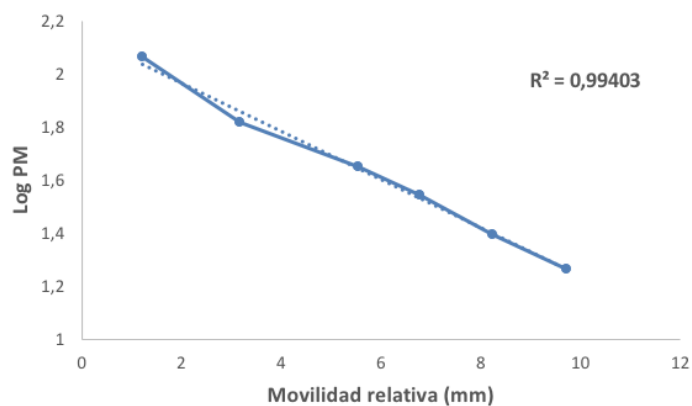
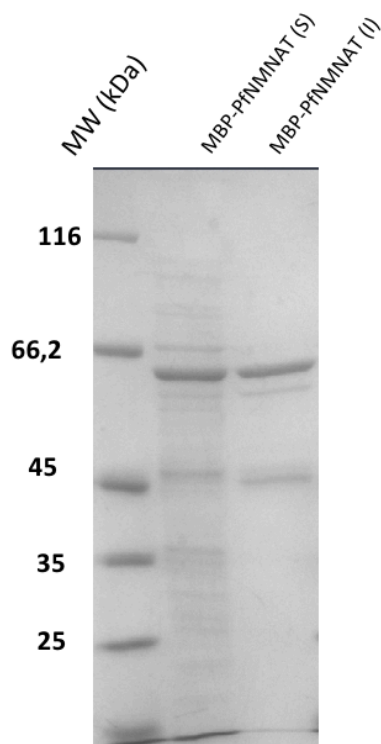


### 6.1.5 Determinación del peso molecular de la MBP-PfNMNAT

Debido a que el peso experimental no concordaba con el teórico (67,5kDa), se decidió confirmar el peso molecular, a partir del SDS-PAGE. Se realizó un grafica del logaritmo del peso molecular vs distancia recorrida de los patrones conocidos, y se interpoló el valor obtenido para la proteína MBP-PfNMNAT como se puede observar en la Figura 6-8, encontrándose un peso experimental de 65,2 kDa, que se encuentra dentro del valor de error que tienen los geles de poliacrilamida, o de características inherentes de la composicionde aminoacidos de la proteína (Rath, Glibowicka, Nadeau, Chen, & Deber, 2009).

#### Figura 6-8: Determinación del peso molecular de la MBP-PfNMNAT

SDS – PAGE 12% teñido con azul de Coomassie R-250, Grafica de Log del peso molecular vs Distancia recorrida de cada patrón conocido y Tabla con los datos de los pesos moleculares de los patrones y de la proteína de estudio.



Movilidad relativa (mm)	Log PM	PM (kDa)
1,23	2,0644	116
3,17	1,8208	66.2
5,54	1,6532	45
6,77	1,544	35
8,25	1,3979	25
9,73	1,2648	18.4
3,54	1,82851484	62,2

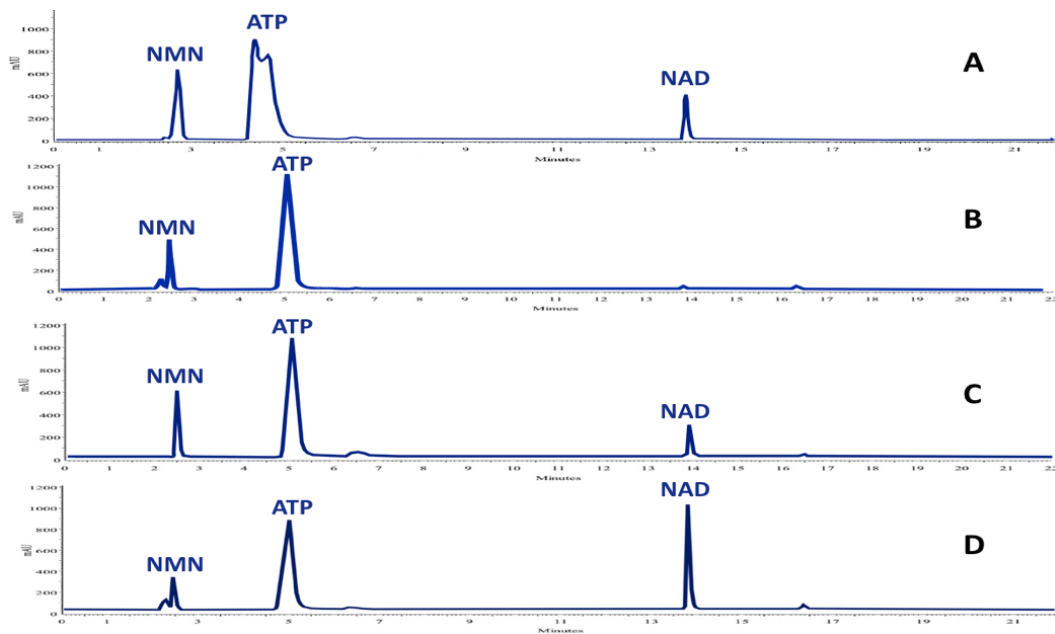
### 6.1.6 Ensayos de actividad enzimática de la MBP-PfNMNAT

La actividad nucleotidiltransferasa de la proteína recombinante se evaluó mediante ensayos NMNAT directos y la posterior observación del pico correspondiente al NAD<sup>+</sup> sintetizado, utilizando HPLC en fase reversa (Figura 6-9). Respecto a la actividad encontrada en la fracción soluble, la actividad detectada en el eluido de la purificación por afinidad fue 18.4 veces mayor (Tabla 6-2), permitiendo buenos rendimientos para la proteína recombinante obtenida desde el sistema de expresión pMAL c5X.

#### Figura 6-9: Verificación de la actividad catalítica de la MBP-PfNMNAT cuantificada en RP-HPLC

A. Patrones, B. Control negativo (Buffer de elución de la proteína), C. Fracción soluble. D. MBP-PfNMNAT. Columna Phenomenex Luna C18. Fases móviles: buffer fosfato de potasio 0.12 M pH 6.0 y metanol. Flujo constante de 1.5 ml/min, con un tiempo de 20 min por corrida. Detección espectrofotométrica a 254 nm.





**Tabla 6-2. Rendimiento de la purificación de la MBP-PfNMNAT**

\*Una unidad de actividad enzimática representa la cantidad de enzima que cataliza la síntesis de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NAD}^+$  por minuto a  $37^\circ\text{C}$ .

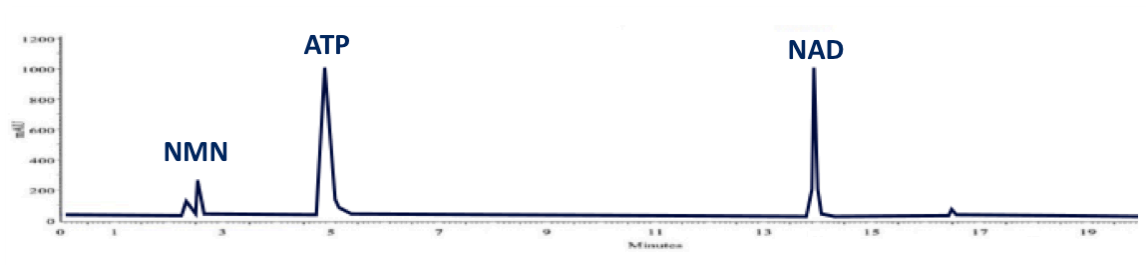
Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (mU*)	Actividad específica (mU/mg)	Recuperación (%)	Purificación (veces)
Soluble	6,96	185,185	26,607	100	-
Eluido	0,29104	142,716	490,365	77,06	18,4

### 6.1.7 Estabilidad de la MBP-PfNMNAT luego de almacenamiento

Igualmente se determinó si la proteína se mantenía estable en las condiciones de almacenamiento utilizadas (Buffer de elución) y  $-80^\circ\text{C}$ , realizando un ensayo de actividad directo y verificando la síntesis de  $\text{NAD}^+$ . Como se puede observar en la Figura 6-10, la proteína MBP-PfNMNAT es catalíticamente activa sin disminución de la actividad después de 6 meses de almacenamiento en las condiciones anteriormente descritas, esto en comparación con la actividad observada para el ensayo de actividad luego de la purificación.

**Figura 6-10: Estabilidad de la MBP-PfNMNAT almacenada durante 6 meses**

Columna Phenomenex Luna C18. Fases móviles: buffer fosfato de potasio 0.12 M pH 6.0 y metanol. Flujo constante de 1.5 ml/min, con un tiempo de 20 min por corrida. Detección espectrofotométrica a 254 nm.



Una vez encontrado el mejor sistema de expresión, que permite obtener la PfNMNAT parcialmente purificada y que es catalíticamente activa, pasamos al segundo objetivo donde el plásmido pMAL c5X-PfNMNAT que codifica para la proteína MBP-PfNMNAT, es utilizado como plantilla para la obtención de mutantes y como patrón de comparación en los ensayos de actividad.

## 6.2 Estudio de la relevancia funcional de secuencias específicas de la PfNMNAT, en aras de caracterizar la proteína, mediante el desarrollo de mutantes

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 modificaciones postraduccionales y localización intracelular. Este tipo de inserciones se han identificado y estudiado en las iso-enzimas humanas HsNMNAT1-3 (Lau et al., 2010).

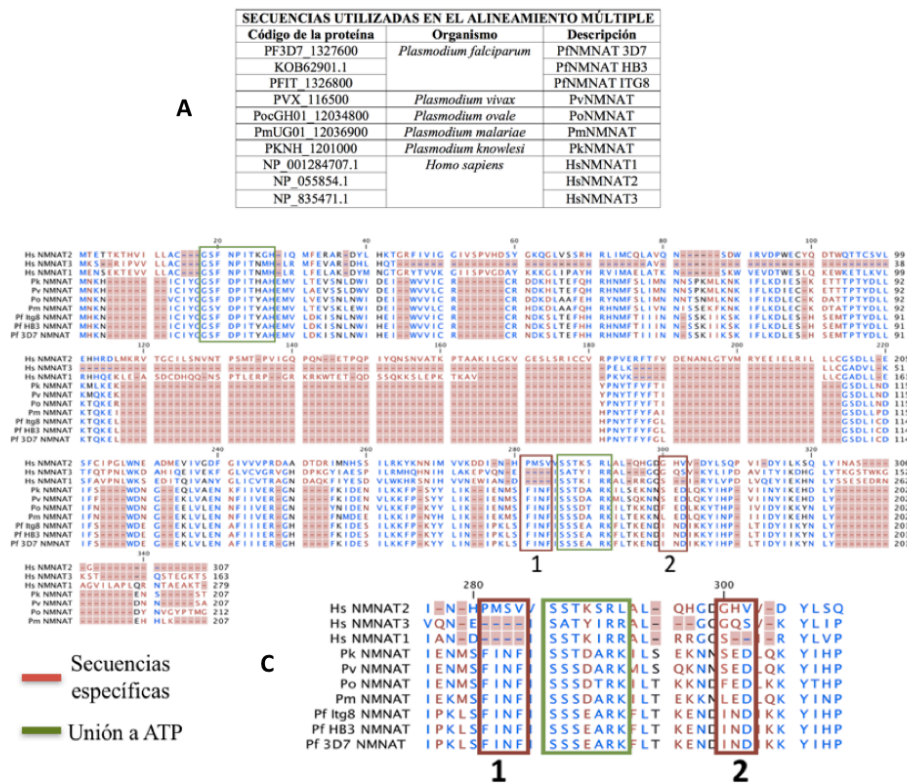
Con el fin de identificar posibles dominios exclusivos de la proteína PfNMNAT, se implementaron dos metodologías. Un diseño bioinformático que permitiera tener una aproximación de las alteraciones en la estructura terciaria y efectos sobre la solubilidad. Y un desarrollo experimental para llevar a cabo la producción de dos mutantes de la proteína MBP-PfNMNAT ( $\Delta$ PfNMNAT).

### 6.2.1 Diseño de mutantes de la MBP-PfnMNAT

El análisis de la estructura primaria confirmó la presencia de los motivos conservados de unión al ATP y la existencia de dos dominios exclusivos en las NMNATs de los parásitos (Inserción 1: 161 – 164, dominio exclusivo de género *Plasmodium* e inserción 2: 180 – 183, dominio exclusivo de especie *P. falciparum*), como se puede observar en la Figura 6-11. La existencia de dominios o inserciones exclusivas en las NMNATs de *Plasmodium spp* podrían estar relacionadas con procesos de regulación funcional de la proteína, hay que tener en cuenta que la fosforilación de serina (S167) reportada por Pease y colaboradores en el 2013 se encuentra próxima entre las dos secuencias exclusivas de la PfnMNAT (Pease et al., 2013).

**Figura 6-11: Identificación de secuencias específicas de la PfnMNAT**

A. Secuencias de NMNAT humanas y de cepas de *Plasmodium falciparum*, utilizadas para realizar la búsqueda de secuencias específicas. B. Alineamiento múltiple de secuencias de las NMNATs de *Plasmodium falciparum* (cepas) y las HsNMNATs. 1, 2. Inserciones específicas de la proteína PfnMNAT. C. Ampliación de las secuencias exclusivas de PfnMNAT. (ClustalW y CLC Main Workbench).



Debido a que el dominio exclusivo 1, es específico de género, se escogió para el diseño de diversos mutantes. Mediante el uso del servidor I-TASSER se hicieron predicciones estructurales de mutantes tanto de delección como de sustitución y por medio del programa ProSo II, se obtuvieron los valores de solubilidad para cada uno de los mutantes diseñados. Los datos obtenidos en cuanto alteración de estructura y solubilidad se pueden observar en la Tabla 6-3. Los resultados más llamativos respecto a estos dos valores, teniendo como parámetro los de la proteína silvestre fueron para la transición N163D (**AAT/GAT**) y la transversión N163Y (**AAT/TAT**), los cuales tienen 3 alteraciones de la estructura terciaria y mantienen buenos valores de solubilidad en comparación con la proteína silvestre para ser producidas de manera recombinante en el sistema heterólogo *E. coli* BL21 (DE3) (Figura 6-12). Las dos mutaciones realizadas permitieron evaluar el efecto de aumento de tamaño y cambio de carga sobre la actividad enzimática de cada una de las proteínas recombinantes mutadas MBP- $\Delta$ PfNMNAT N163D y MBP- $\Delta$ PfNMNAT N163Y. Las mutaciones realizadas sobre este fragmento fueron diseñadas sobre el residuo 163 (asparagina), debido la relevancia entre los 4 aminoácidos, a nivel funcional y su posibilidad de ser blanco de alguna modificación postraducciona (MPT) como la glicosilación.

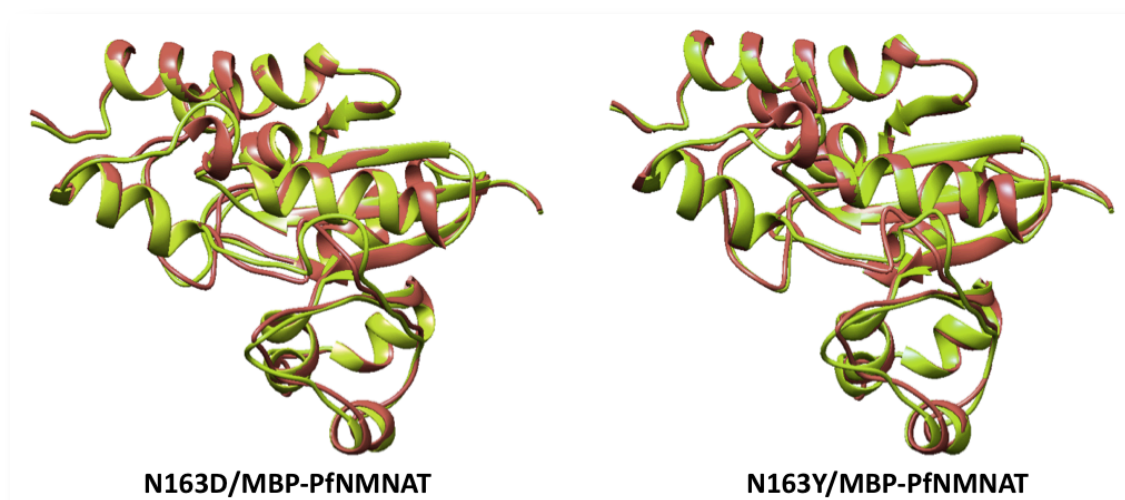
**Tabla 6-3. Análisis de mutantes: Resumen de las modificaciones en la estructura y efectos sobre la solubilidad**

– pérdida, + ganancia, 0 modificación de estructura

Mutante	Tipo	Cambios en la estructura		Solubilidad
		Número	Tipo	
Sin mutar				69,6%
FINF	Delección	2	-alfa, 0 beta	66,1%
FI		3	-alfa, 0 beta, 0 alfa	70,4%
NF		3	-alfa, 0 beta, 0 alfa	69,9%
N163S	Transición	0		67,7%
N163D		3	-alfa, + alfa, 0 beta	68,2%
N163K	Transversión	1	-alfa	71,3%
N163H		2	-alfa, 0 beta	41,6%
N163I		0		69,7%
N163T		1	-alfa	70,1%
N163Y		3	-alfa, + alfa, 0 beta	70,0%
N163Q		Tamaño	0	

**Figura 6-12: Comparación de modelos estructurales de la PfnMNAT (mutantes inserción 1 vs proteína silvestre)**

N163D (RMSD entre 204 parejas de átomos 0.656Å), N163Y (RMSD entre 204 parejas de átomos 0.721Å). Verde: WT y Rojo: Mutante. I-TASSER y UCSF Chimera.



### 6.2.2 Producción de mutantes de la MBP-PfnMNAT

Las mutaciones se realizaron mediante mutagénesis dirigida usando como plantilla el plásmido recombinante pMAL c5X-PfnMNAT que codifica para la proteína unida a la etiqueta MBP (Figura 6-13, B). La identidad de los plásmidos se confirmó inicialmente mediante PCR y corte con enzimas de restricción, obteniendo los perfiles esperados en cada caso (Figura 6-13, D y E). Sin embargo, debido a que son mutaciones puntuales no se puede saber con certeza si las mutaciones fueron o no realizadas, para eso se confirmó mediante secuenciamiento de los plásmidos, y los resultados se pueden observar en la Figura 6-14.

**Figura 6-13: Obtención de de las proteínas recombinantes MBP-PfnMNAT mutadas**

A. Diseño metodológico para realizar las mutaciones puntuales en el plásmido recombinante pMAL c5X-PfnMNAT. 1. Amplificación mediante mutagénesis dirigida (En la reacción hay plásmidos mutantes y plásmidos silvestres que sirvieron como plantilla), 2. Los plásmidos recombinantes silvestres que sirvieron como plantilla, se someten a digestión con la enzima DpnI que reconoce

ADN metilado, 3. Finalmente en la reacción solo quedan ADN plasmídicos mutantes para transformar E. coli One Shot Match1 T1.

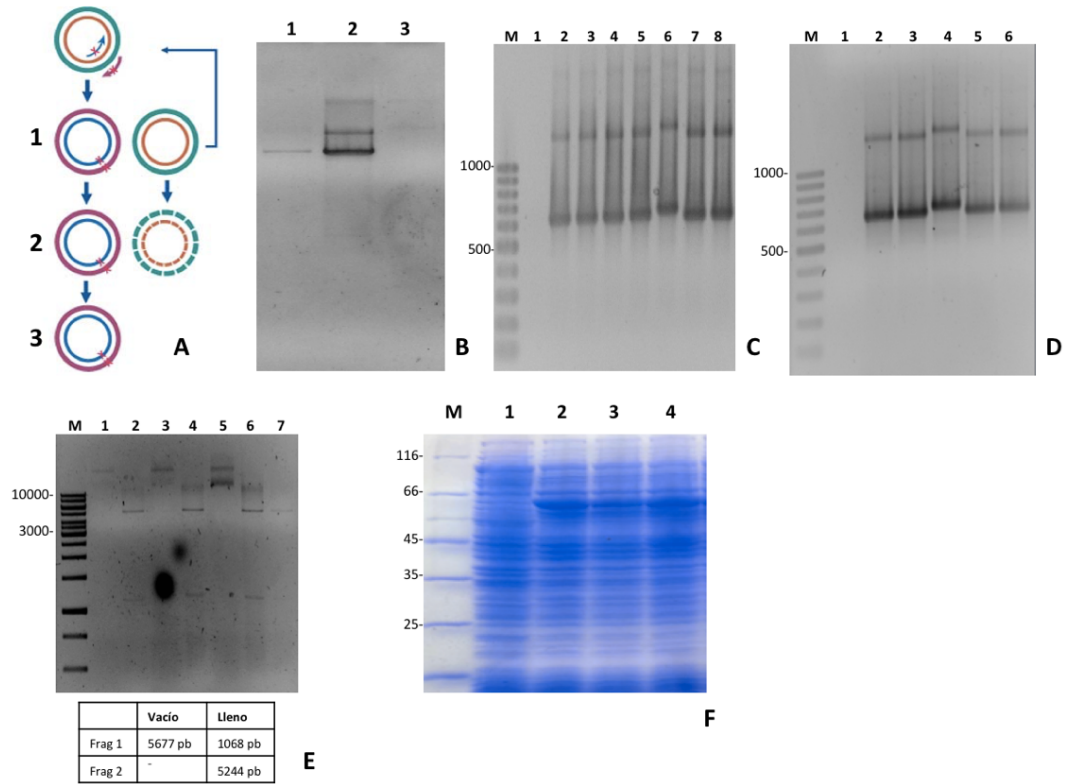
B. Producción de los plásmidos recombinantes mutados. 1. Mutante N163Y. 2. Mutante N163D. 3. Control de carga reacción sin amplificación. Se observan tres bandas correspondientes a los topoisómeros de los superenrollamientos del ADN plasmídico.

C. Rastreo de colonias mediante PCR. 1. Control negativo de la reacción. 2. Control positivo de la reacción. 3 a 5. Colonias rastreadas plásmido recombinante N163D. 6 a 8. Colonias rastreadas plásmido recombinante N163Y. M. Marcador de peso molecular 100 pb Thermo Fisher Scientific. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

D. Análisis de los plásmidos recombinantes pMAL c5X – PfnMNAT mediante PCR. 1. Control negativo de la reacción. 2. Control positivo de la reacción. 3 y 4. Plásmido recombinante N163Y. 5 y 6. Plásmido recombinante N163D. M. Marcador de peso molecular 100 pb Thermo Fisher Scientific. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

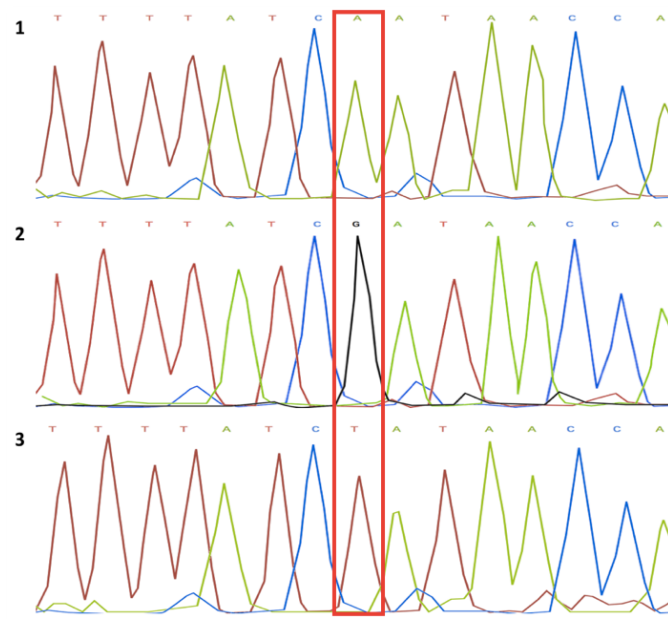
E. Análisis de los plásmidos recombinantes pMAL c5X – PfnMNAT mediante corte con la enzima BglII. 1, 3 y 5. Plásmidos recombinantes no digeridos. 2, 4, 6 y 7. Plásmidos recombinantes digeridos. M. Marcador de peso molecular 1 Kb Thermo Fisher Scientific. Gel de agarosa 0,8% teñido con bromuro de etidio.

F. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes MBP-PfnMNAT. 1. Proteínas totales BL21(DE3), 2. Proteínas totales BL21(DE3) expresión de la MBP-PfnMNAT silvestre, 3. Proteínas totales BL21(DE3) expresión de la MBP-PfnMNAT N163D, 4. Proteínas totales BL21(DE3) expresión de la MBP-PfnMNAT N163Y. M. Patrón de peso molecular. SDS-PAGE 10% Teñido con azul de coomassie R-250.



**Figura 6-14: Verificación de MBP-PfnMNAT N163D y N163Y**

1. Silvestre, 2. N163D (AAT/GAT), 3. N163Y (AAT/TAT). Chromas 1.1.

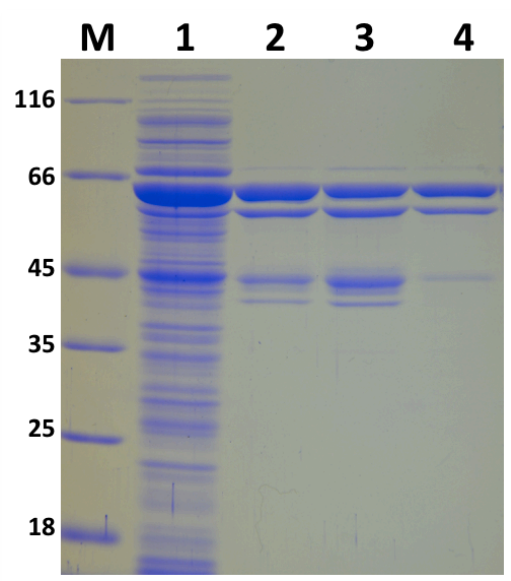


Luego de verificar la identidad de los plásmidos se transformaron *E. coli* BL21(DE3), y se indujo la producción de la proteína recombinante. Adicional se indujo la proteína MBP-PfNMNAT silvestre para ser utilizada como control en los ensayos de actividad, con el fin de evaluar los cambios realizados en las proteínas mutadas. En la Figura 6-14 (F) se puede observar la inducción de las proteínas recombinantes tanto mutadas como silvestre, sin observarse cambios notorios en la inducción.

Se purificaron las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad a amilosa, empleando las condiciones evaluadas en la primera parte de este trabajo y se sometieron a ensayos enzimáticos directos para analizar la relevancia funcional y estructural del residuo mutado, evaluando cambios en la actividad catalítica comparada con la MBP-PfNMNAT silvestre. Pese a que no se observaron cambios significativos en cuanto a expresión en la fracción soluble de las proteínas mutadas con las silvestre, contrariamente en la purificación de las MBP-PfNMNATs en cuanto a patrones de degradación se observaron cambios significativos, del producto de 43 kDa correspondiente a la etiqueta MBP, esto en comparación con la proteína silvestre (Figura 6-15).

#### Figura 6-15: Purificación de las MBP-PfNMNAT's

1. Proteínas solubles *E. coli* BL21(DE3) expresión de MBP-PfNMNAT silvestre, 2. Eluido N163D/MBP-PfNMNAT, 3. Eluido de la purificación de la N163Y/MBP-PfNMNAT. 4. Eluido WT/MBP-PfNMNAT. M. Patrón de peso molecular. SDS-PAGE 10%, teñido con azul de coomassie R-250.

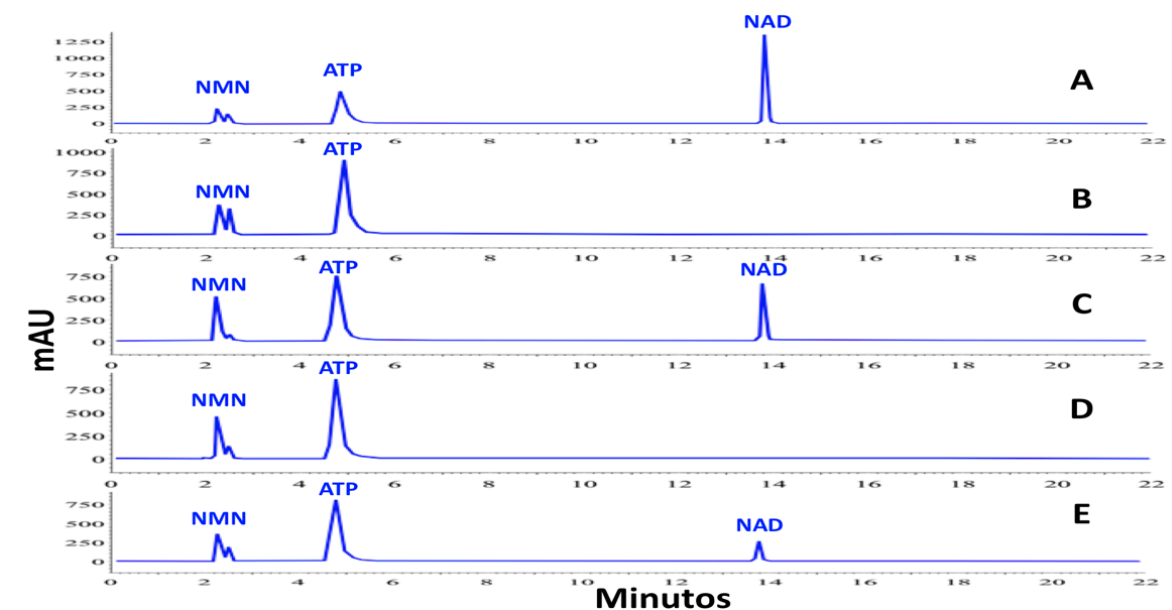




La evidencia experimental señaló que la actividad catalítica de la enzima se puede ver afectada por cambios transicionales y transversionales de aminoácidos en cuanto a carga y tamaño. Pequeños cambios en el tamaño del radical (N163D), con modificación de carga, redujeron la actividad de la enzima, mientras que radicales más grandes (N163Y) manteniendo la carga, remueven completamente la actividad de la enzima (Figura 6-16 y Tabla 6-4).

**Figura 6-16: Evaluación de la actividad catalítica de las proteínas recombinantes MBP-PfNMNAT cuantificada en RP- HPLC**

A. HsNMNAT-3 (Control +), B. Buffer de elución (Control -), C. MBP-PfNMNAT, D. N163Y/MBP-PfNMNAT, E. N163D/MBP-PfNMNAT. Columna Phenomenex Luna C18. Fases móviles: buffer fosfato de potasio 0.12 M pH 6.0 y metanol. Flujo constante de 1.5 ml/min, con un tiempo de 20 min por corrida. Detección espectrofotométrica a 254 nm.



**Tabla 6-4. Purificación de las MBP-PfNMNAT silvestre y mutantes**

\*Una unidad de actividad enzimática representa la cantidad de enzima que cataliza la síntesis de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NAD}^+$  por minuto a  $37^\circ\text{C}$ .

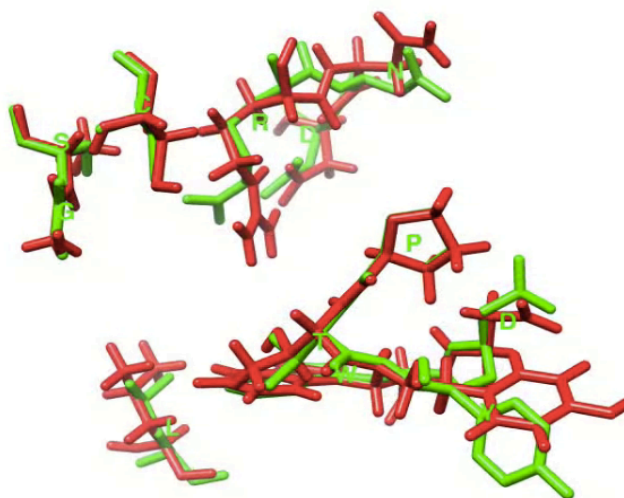
a Valor arbitrario asumiendo que 100 es una purificación total

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (mU*)	Actividad específica (mU/mg)	Recuperación (%)	Purificación (veces)
S WT	6,96	185,18	26,60	100	-
E WT	0,29104	142,71	490,36	77,06	18,4
S N163D	20,8	61,72	2,96	100	-
E N163D	0,64	49,38	77,16	80	26
S N163Y	21,6	-	-	100	-
E N163Y	0,64	-	-	-	70-80 <sup>a</sup>

Con el fin de evaluar si la pérdida de la actividad catalítica se debe a una posible disminución en la afinidad por alguno de los sustratos debido a alteraciones en la disposición lateral de residuos implicados en la unión con los sustratos; mediante la herramienta MatchMaker del programa UCSF Chimera se realizaron alineamientos estructurales de la proteína mutante vs la silvestre, identificando cambios específicos en cuanto a residuos implicados en la unión con el NMN y con el ATP. Los resultados sugieren que la posible pérdida de actividad catalítica de las proteínas mutantes puede estar dada por cambios en la disposición espacial de los residuos implicados con la unión del NMN, ya que hay una mayor alteración en la disposición de las cadenas laterales de este residuo frente a los de unión a ATP, es decir que se pierde afinidad por el NMN y no se puede llevar a cabo la síntesis de NAD<sup>+</sup> con la misma efectividad que la proteína silvestre (Figura 6-17).

**Figura 6-17: Disposición espacial de las cadenas laterales de los residuos implicados en la unión de NMN de la N163Y/MBP-PfNMNAT**

(Verde: WT y Rojo: Mutante).



Con el fin de contrastar la hipótesis experimentalmente, se llevó a cabo la identificación de parámetros enzimáticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) para el sustrato NMN, con la proteína silvestre y la proteína N163D. Como control para determinar las constantes cinéticas se determinaron los parámetros enzimáticos para el ATP con la proteína silvestre, donde se obtuvieron velocidades similares para los dos sustratos evaluados (Figura 6-18 y Tabla 6-5).

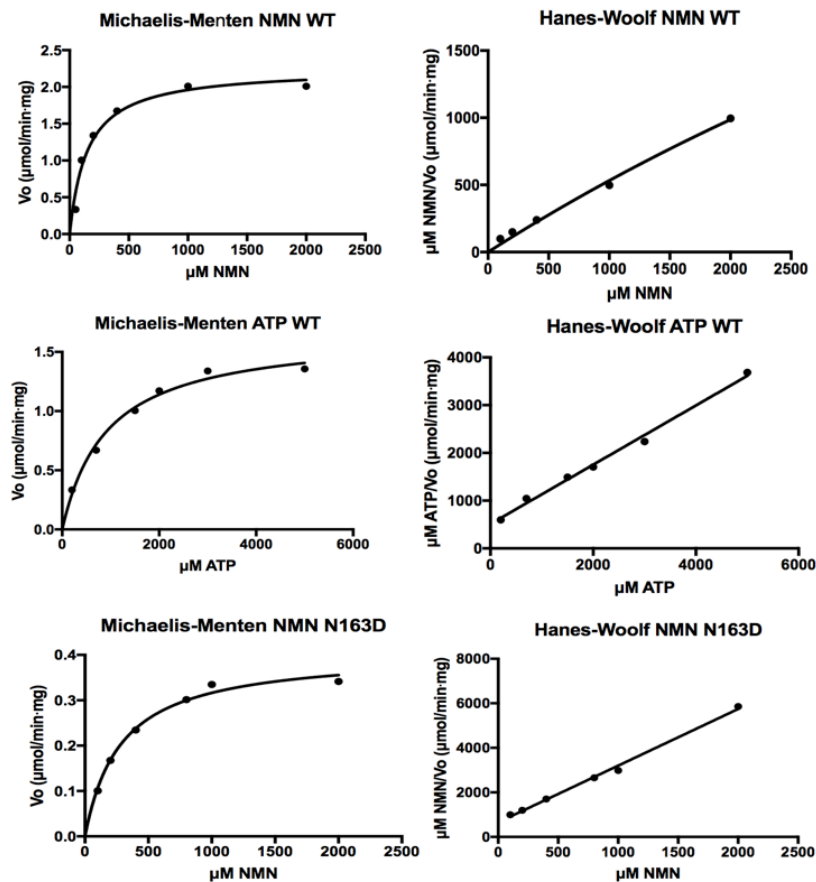
### Figura 6-18: Determinación de los parámetros cinéticos de las proteínas MBP-PfnMNAT

Mediante métodos de regresión lineal (Hanes-Woolf) y no lineal (Michaelis-Menten), se determinaron los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ .

Se emplearon concentraciones saturantes de los siguientes sustratos:

**A y C.** 10mM de ATP

**B.** 5mM de NMN



**Tabla 6-5. Parámetros cinéticos de las proteínas MBP-PfNMNAT**

Proteína	Sustrato	Km ( $\mu\text{M}$ )		Vo ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ )	
		Lineal	No lineal	Lineal	No lineal
MBP-PfNMNAT					
	NMN	158,4	149,2	2,207	2,252
	ATP	826,0	926,4	1,612	1,668
MBP- $\Delta$ PfNMNAT N163D	NMN	258,2	282,6	0,3931	0,4057

Los resultados sugieren que la enzima MBP-PfNMNAT es  $\sim 5,2$  veces más afín por el NMN que por el ATP, los Kms encontrados se encuentran dentro de los valores reportados para otras NMNATs. Este resultado es semejante al reportado para la ScNMNAT2 (Tabla 1-1), cuya afinidad por el NMN es  $\sim 10,7$  veces mayor en comparación con la afinidad por el ATP. En cuanto al Km del NMN para la proteína MBP- $\Delta$ PfNMNAT N163D, se observa una pérdida de afinidad de  $\sim 1,7$  veces, y la síntesis de NAD<sup>+</sup> se ve reducida en  $\sim 2,5$  veces, confirmándose los resultados obtenidos en los ensayos enzimáticos directos y lo predicho por el servidor I-TASSER, donde posiblemente la disposición espacial de las cadenas laterales involucradas en la unión con el NMN, se ve reflejada en la reducción de la síntesis del NAD<sup>+</sup>. Estos resultados sugieren entonces que la actividad catalítica de la proteína se puede regular en cuanto carga cuando se mantiene el tamaño, pero de forma inversa no puede haber regulación y se produce la pérdida total de la actividad catalítica.

Al analizar las estructuras primarias de las NMNATs de eucariotas superiores, se han podido identificar inserciones específicas que se relacionan con la regulación mediante modificaciones postraduccionales y con respecto a la localización subcelular. Estas inserciones o secuencias específicas han sido estudiadas en las 3 isoenzimas humanas (HsNMNAT) (Lau et al., 2010).

Al comparar el efecto funcional generado por las inserciones de la proteína PfNMNAT con las inserciones de las ortólogas humanas se obtienen resultados diferentes, ya que en estas la alteración de sus dominios exclusivos no afectan la actividad catalítica de la proteína (Lau, C., et al., 2010; Brunetti, L et al., 2010). Sin embargo, para la NMNAT de *Leishmania braziliensis* se identificó que estas inserciones exclusivas son indispensables para la actividad catalítica de la proteína (Contreras, Neme, & Ramírez, 2015), de forma similar a los que sucede con la MBP-PfNMNAT. Estos resultados sumados a los nuestros dejan en evidencia que las inserciones de las NMNATs de estos parásitos protozoarios

pueden servir como posibles blancos farmacológicos con tratamientos dirigidos específicamente contra la proteína del parásito, ya que su alteración puede hacer que se pierda la actividad catalítica sin afectar la actividad de las isoenzimas humanas.

### 6.3 Determinación de la localización de la PfNMNAT endógena

Con el fin de identificar el compartimiento donde está ocurriendo la síntesis de NAD<sup>+</sup> en *Plasmodium falciparum*, se utilizaron servidores bioinformáticos. Los 4 predictores sugirieron una localización citoplasmática. Sin embargo, 2 de los programas también predicen una posible localización nuclear (Tabla 6-6).

Por su parte, las herramientas para la predicción de péptidos señal (Signal IP), no detectaron señales de localización celular en la proteína PfNMNAT. La ausencia de este tipo de señales, permite realizar la suposición que la localización es citoplasmática para la proteína de estudio. Hay que tener precaución con los resultados que arrojan los programas bioinformáticos que predicen localización, ya que se encuentran alimentados con los péptidos señal tradicionales para eucariotas.

**Tabla 6-6. Predicción bioinformática de la localización subcelular de la PfNMNAT**

Servidor	Localización sub celular
Cello v. 2.5	Citoplasma
PSORTII	Citoplasma/nuclear
Euk-mPLoc 2.0	Citoplasma/nuclear
WoLF PSORT	Citoplasma

#### 6.3.1 Inmunodetección de la proteína PfNMNAT endógena de *P. falciparum*

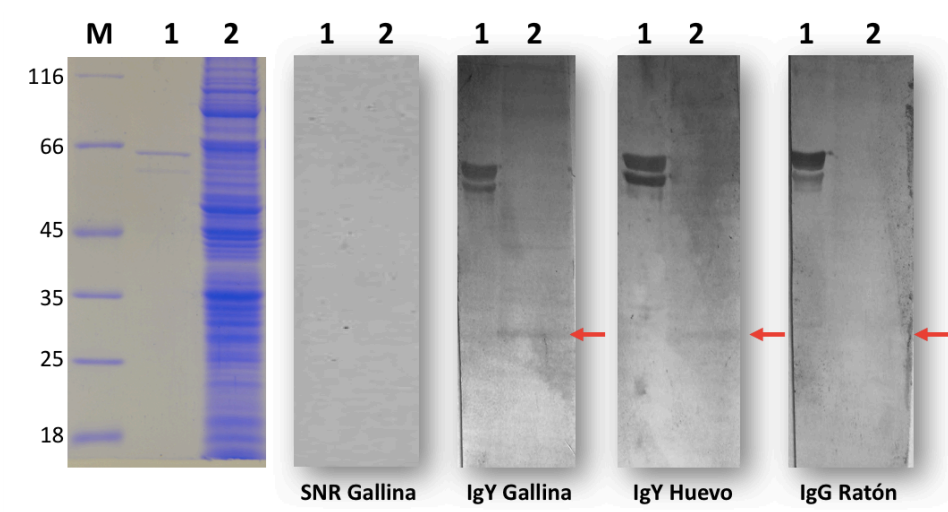
En trabajos previos en el laboratorio se obtuvieron los anticuerpos anti His-PfNMNAT a partir de modelos murinos (IgG) y aviares (IgY) (yema de huevo y sangre de gallina), útiles para este trabajo para detectar la proteína endógena mediante western blot en extractos de parásitos sincrónicos y localización *in situ* mediante inmunofluorescencia indirecta. La evaluación de ambos anticuerpos mediante western blot utilizando la proteína recombinante indicó, que al utilizar una dilución 1:5000 es capaz de reconocer hasta 15 ng de proteína recombinante His-PfNMNAT (Mejía & Ramírez-Hernández, 2011).

En el primer ensayo de inmunodetección se separaron 80 µg de proteína soluble de parásitos asincrónicos mediante SDS-PAGE y se electrotransfirieron a una membrana de

PVDF para ser reconocidos con los anticuerpos anteriormente nombrados, sin embargo, la dilución utilizada en éste caso fue mucho menor teniendo en cuenta que la proteína recombinante esta purificada y enriquecida para su reconocimiento. Se utilizó una dilución 1:1000 tanto del anticuerpo primario como del suero pre-inmune. Cuando se usa el suero pre-inmune como anticuerpo primario no hubo reconocimiento como era de esperarse y los diferentes anticuerpos anti His-PfNMNAT detectaron la proteína recombinante (MBP-PfNMNAT) usada como control, y una banda de aproximadamente 28 kDa en los extractos celulares, es decir mayor al peso molecular teórico de la proteína PfNMNAT (25kDa) (Figura 6-19). Este peso posiblemente corresponda a una proteína modificada postraduccionalmente, teniendo en cuenta lo reportado para otras NMNATs. Por ejemplo, la HsNMNAT-2 es blanco de palmitoilación para poder anclarse al aparato de Golgi, y la HsNMNAT-1 contiene un residuo de serina blanco de fosforilación (Ser136) por proteínas quinasa C, involucrado en la regulación de la actividad catalítica de la enzima PARP1 auto-modificada. Adicionalmente se ha reportado recientemente que la única NMNAT de *Trypanosoma cruzi* tiene 1 o más residuos de serina fosforilados (Sánchez-Lancheros, Ospina-Giraldo, & Ramírez-Hernández, 2016), necesarios posiblemente para su regulación. Cualquiera de estas modificaciones puede estar alterando el peso molecular de nuestra proteína, haciendo entonces que esta migre con un tamaño levemente diferente.

#### **Figura 6-19: Evaluación de IgY e IgG anti his-PfNMNAT sobre extractos asincrónicos**

1. Proteína recombinante MBP-PfNMNAT (66 kDa), 2. 80 µg de extracto asincrónico de *Plasmodium falciparum* FCR3. La flecha roja indica el reconocimiento de una proteína de peso aproximado de 28 kDa, correspondiente a la PfNMNAT endógena. SDS-PAGE 12% teñido con azul de coomassie R-250. Membrana de PVDF Anticuerpo primario 1:1000 (Suero no relacionado, Anti IgY His-PfNMNAT sangre de gallina, Anti IgY His-PfNMNAT huevo, IgG sangre de ratón), anticuerpo secundario 1:8000 (Anti IgY biotina o Anti IgG biotina), Estreptavidina fosfatasa alcalina 1:8000, revelado con sustratos cromogénicos NBT y BCIP.



Para tener un acercamiento a las modificaciones postraduccionales que pueda tener la PfNMNAT, se sometió a un análisis bioinformático como primer paso para el estudio de esta importante regulación (Tabla 6-7). En este caso se realizó la búsqueda de residuos blancos de fosforilación ya que como se ha demostrado las NMNATs pueden ser reguladas por la fosforilación en residuos de serina.

**Tabla 6-7. Predicción de las fosforilaciones de la PfNMNAT**

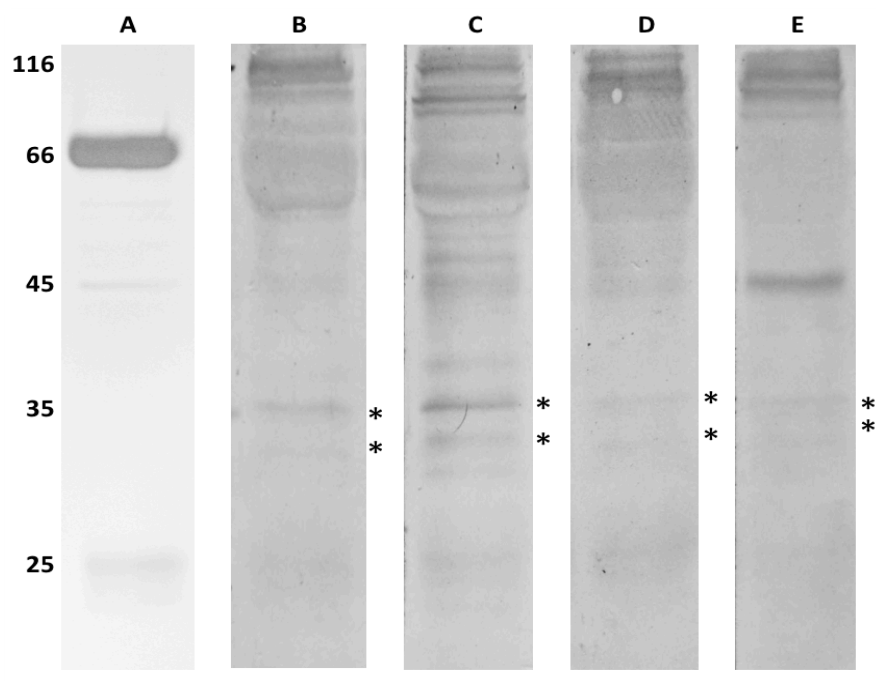
Residuo	No de sitios
Serina	15
Tirosina	2
Treonina	4

El servidor NetPhos 3.1 predijo 15 posibles sitios de fosforilación para serina, 2 para tirosina y 4 para treonina. Con el objeto de determinar si la PfNMNAT es blanco de fosforilación en alguno de sus residuos, se llevó a cabo inmunoprecipitación de la proteína a partir del extracto soluble del parásito con los anticuerpos producidos desde la sangre de gallina, las proteínas inmunoprecipitadas fueron sometidas a western blot con anticuerpos de S, Y y T fosforilada, como se describió en la metodología. en ambos experimentos los resultados fueron congruentes, encontrándose que la PfNMNAT es fosforilada en uno o más residuos de serina, tirosina y treonina (Figura 6-20). Pease y colaboradores, mediante un análisis de fosfoproteoma del parásito empleando espectrometría de masas, encontraron que el residuo de serina 167 es blanco de fosforilación, la cual tiene un pico máximo de modificación en el estadio de anillos (Pease

et al., 2013), esto corrobora los resultados obtenidos y podría ser la explicación en el aumento de tamaño visualizado en el western blot.

### Figura 6-20: Fosforilaciones de la PfNMNAT

Se inmunoprecipitó la PfNMNAT usando los anticuerpos IgY obtenidos a partir de sangre de gallina y resina tiofílica. A. SDS-PAGE 12% teñido con plata. B-E. Membrana de PVDF. B Anticuerpo primario 1:1000 Anti IgG His-PfNMNAT, C. Anti IgG T-fosforilada, D. Anti IgG. Y-fosforilada, E. Anti IgG S-fosforilada. Anticuerpo secundario 1:8000 (Anti IgY biotina o Anti IgG biotina), Estreptavidina fosfatasa alcalina 1:8000, revelado con sustratos cromogénicos NBT y BCIP.



### 6.3.2 Inmunolocalización in situ de la proteína PfNMNAT

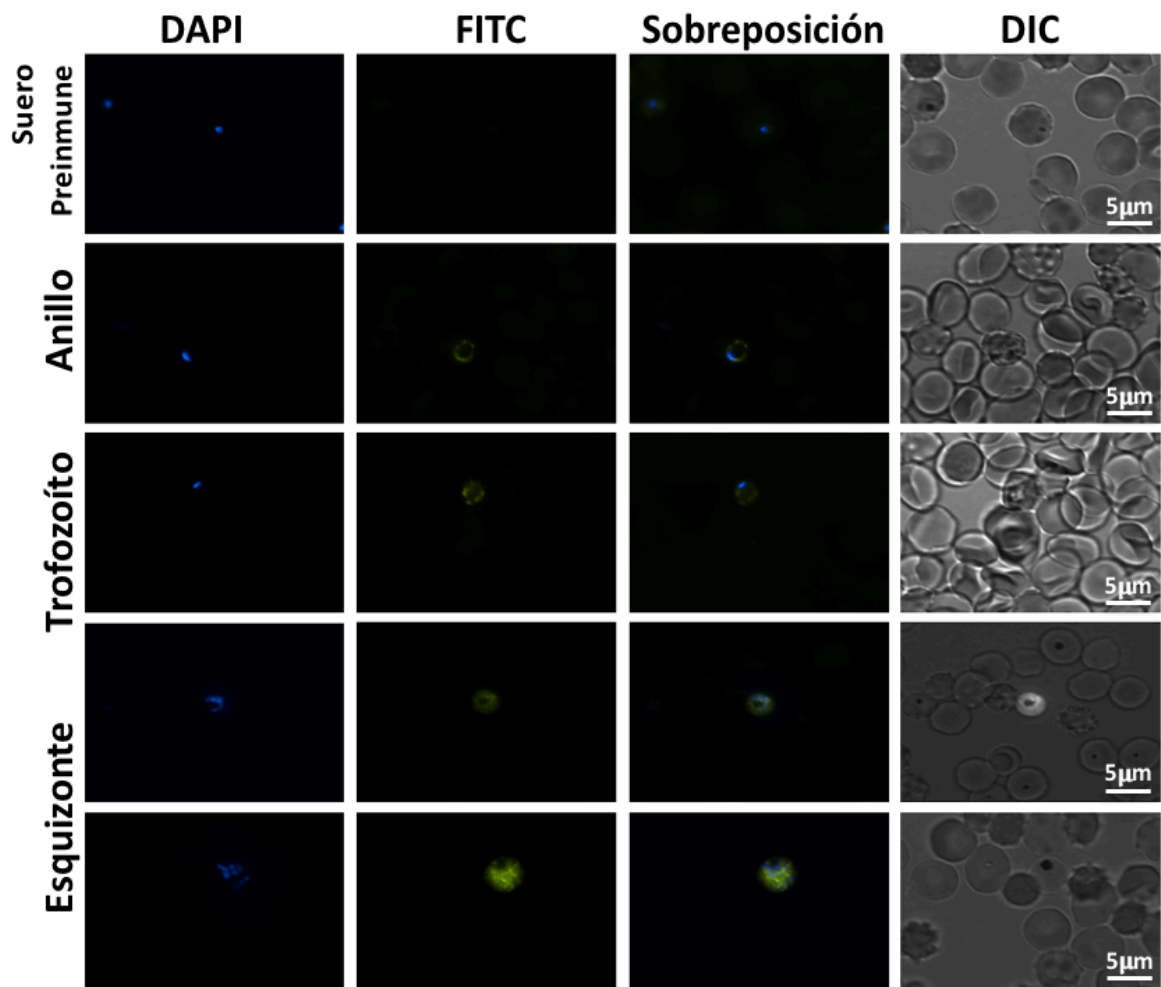
La localización subcelular de la proteína PfNMNAT se estudió mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos IgY anti His-PfNMNAT como anticuerpo primario y como secundario anti gallina acoplado a FITC, sobre parásitos asincrónicos de *P. falciparum*. El suero pre inmune de las gallinas fue usado como control negativo, y los IgY His-PfNMNAT reconocieron la proteína con un patrón citoplasmático (Figura 6-21). El reconocimiento obtenido no fue uniforme, sino que, particularizado dentro del citoplasma del parásito, además de ser un anticuerpo específico ya que no se observa



reconocimiento sobre los glóbulos rojos y adicional de ausencia de fluorescencia en el núcleo.

**Figura 6-21: Inmunodetección de la proteína PfnMNAT sobre estadios del ciclo asexual de *Plasmodium falciparum***

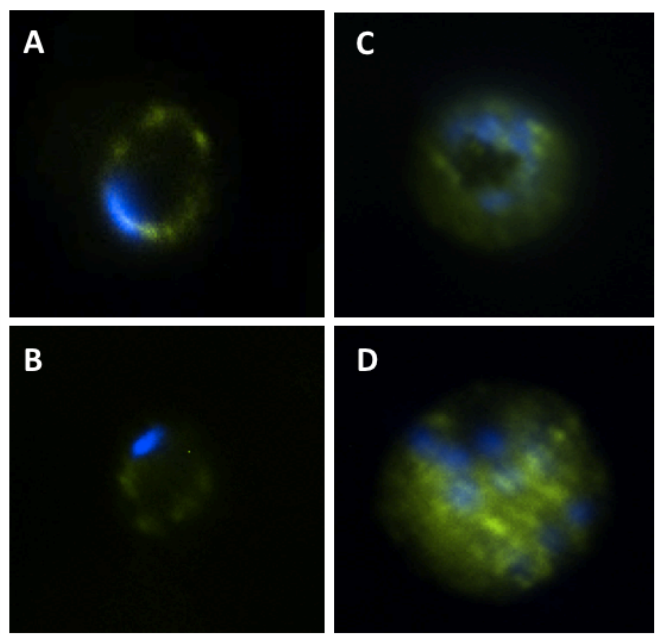
Anticuerpo primario IgY-His/PfnMNAT (1:250). Suero no relacionado (1:250). Los anticuerpos Secundarios  $\alpha$ -IgY-FITC (1:1000). Tinción Nuclear con DAPI (1 $\mu$ g/ml). Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 100X. Imágenes tomadas del Microscopio con Sistema de fluorescencia Nikon C1 plus.



La utilización de los anticuerpos anti IgY His-PfNMNAT permitieron observar reconocimiento de la proteína específicamente en el compartimiento citosólico en los tres estadios del ciclo de vida asexual. Estos resultados permiten corroborar la localización descrita por O'hara y colaboradores, donde mediante sobreexpresión de la proteína recombinante acoplada a GFP en el carboxi terminal, dentro de los parásitos muestran un perfil citoplasmático. Se ha reportado para otras NMNATs por ejemplo de ratón (Sasaki, Araki, & Milbrandt, 2006), levadura (Kato & Lin, 2014) y para una de las isoenzimas de la NMNAT de *D. melanogaster* (Zhai et al., 2006) esta misma localización. El NAD<sup>+</sup> sintetizado en este compartimiento puede ser utilizando como molécula precursora de agentes movilizados de calcio hacia el retículo endoplásmico, o utilizado en rutas metabólicas como la glucólisis, la cual se ve aumentada en eritrocitos infectados (E. Roth, 1990; F. Roth et al., 1982), por ejemplo, el NAD<sup>+</sup> puede ser utilizado por la enzima Glicerilaldehído 3 fosfato deshidrogenasa. Igualmente, el NAD<sup>+</sup> en el citoplasma (Figura 6-22) puede ser modificado para generar los agentes movilizados de calcio ADP ribosa cíclica (cADPR) y dinucleótido de adenina y ácido nicotínico fosfato (NAADP), respectivamente, por acción de la enzima NAD glicohidrolasa (Berger, Ramírez-Hernández, & Ziegler, 2004). Adicionalmente otras enzimas involucradas en la síntesis del NAD<sup>+</sup> también han sido identificadas en el citoplasma, como por ejemplo la Nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT) y la NAD-Sintasa (NADS), lo que sugiere que todo el proceso de síntesis está ocurriendo en este compartimiento (O'Hara et al., 2014). El hecho de que el parásito solo cuente con una NMNAT, se puede deber a una simplificación de rutas metabólicas en parásitos intracelulares, en comparación con organismos de vida libre, esto conlleva a que el NAD<sup>+</sup> sintetizado en el citoplasma necesita ser transportado al núcleo y mitocondria para cumplir con los requerimientos en estos compartimientos. Por ejemplo, la Nicotinamidasa, identificada en el núcleo por O'hara y colaboradores en el 2014, requiere de NAD<sup>+</sup> en el núcleo, el cual puede atravesar los poros nucleares mediante difusión pasiva. Sin embargo, la mitocondria necesita de esta molécula para la fosforilación oxidativa. Para suplir las necesidades del NAD<sup>+</sup> en este organelo, deben existir mecanismos para transportarlo desde el citoplasma. En *S. cerevisiae* y *A. thaliana* se han descrito transportadores de NAD<sup>+</sup>, a través de los cuales el NAD<sup>+</sup> es transportado hacia la matriz mitocondrial y del cloroplasto (Palmieri et al., 2009; Todisco, Agrimi, Castegna, & Palmieri, 2006).

**Figura 6-22: Ampliación de la localización de la proteína PfNMNAT mediante microscopía de fluorescencia empleando anticuerpo IgY**

Anticuerpo primario  $\alpha$ -IgY His-PfNMNAT (1:250), Anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgY-FITC (1:1000). Tinción Nuclear con DAPI (1 $\mu$ g/ml).



En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio, confirman una localización citoplasmática de la única NMNAT de *Plasmodium falciparum*, indicando el sitio de síntesis del NAD<sup>+</sup> en el parásito, que una vez sintetizado, debe transportarse hacia diferentes organelos del parásito empleando diversos mecanismos.

#### **6.4 Identificación de los niveles de expresión transcripcional y proteico en los estadios del ciclo de vida asexual del parásito**

Con el fin de seguir caracterizando el proceso de biosíntesis del NAD<sup>+</sup> de *Plasmodium falciparum*, se determinó la expresión de la proteína y del mRNA en los estadios asexuales del parásito de la PfNMNAT. Los niveles de expresión proteica se analizaron en extractos citoplasmáticos del parásito mediante SDS-PAGE y western blot utilizando los anticuerpos anti IgY His-PfNMNAT obtenidos a partir de sangre de gallina. Por otro lado, la medición a nivel transcripcional se realizó mediante extracción de ARN total y ensayos de amplificación por PCR acoplada a Transcriptasa Reversa (RT-PCR).

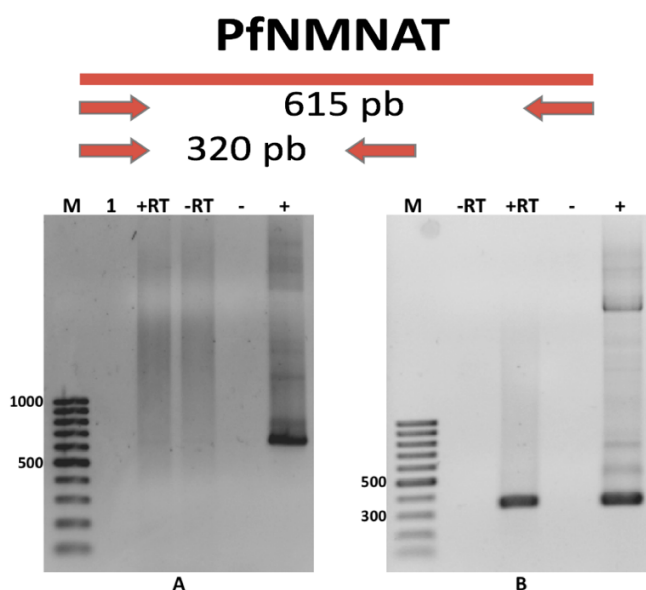
En el estudio de los niveles de expresión se emplaron anillos, trofozoítos y esquizontes. Para obtener parásitos en un único estadio, el cultivo se sometió a tres ciclos de sincronización con sorbitol 5%, con pausas de 96 horas (dos ciclos de vida), entre cada sincronización.

#### 6.4.1 Niveles de expresión transcripcional de la PfNMNAT

Para abordar a nivel transcripcional se realizó una primera aproximación de los niveles de RNA en parásitos asincrónicos mediante RT-PCR. Para esto se hicieron múltiples intentos de extracción de RNA y de síntesis de cDNA. Luego de realizar la extracción de RNA se determinó la concentración y la pureza del mismo mediante análisis espectrofotométrico. La concentración obtenida fue de: 1211,3 ng/μl y una relación de 260/280 de 2,58, condiciones óptimas para realizar la síntesis de cDNA. En la síntesis se usaron 2 μg de RNA y se realizó amplificación mediante PCR usando 1 μl de cDNA, de control se usaron como plantillas el RNA sometido a DNAsas y un ensayo sin retrotranscriptasa. Los resultados obtenidos confirman la presencia de la NMNAT a nivel de mRNA (Figura 6-23).

#### Figura 6-23: Detección del mRNA de la PfNMNAT en parásitos asincrónicos

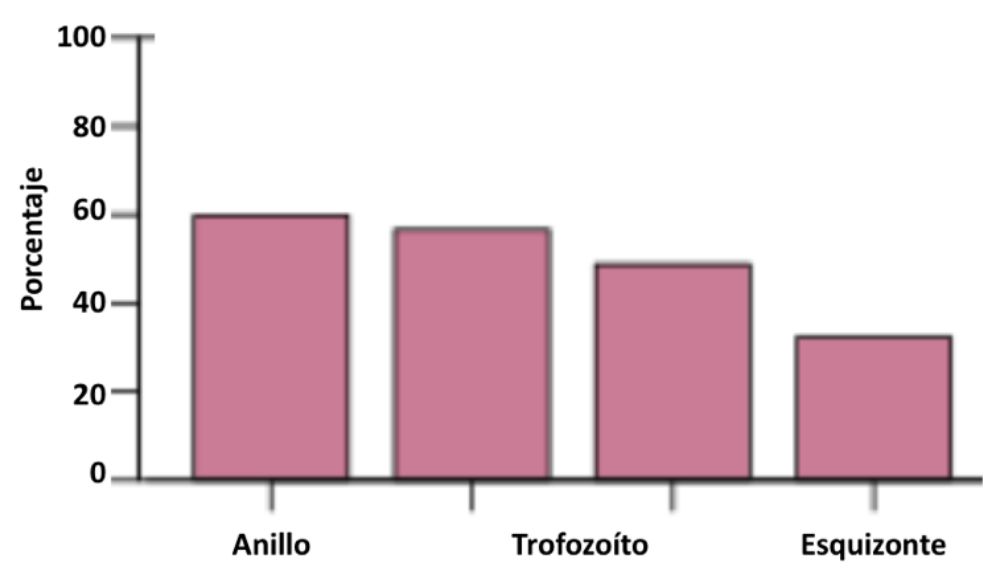
Amplificación de la PfNMNAT a partir de cDNA. A. Primers para amplificar toda la región codificante de la PfNMNAT (615pb). B. Primers para amplificar un fragmento corto de PfNMNAT (320pb). 1. RNA tratado con DNAsa. +RT. Amplificación de PfNMNAT a partir de cDNA. -RT. Control negativo RT. -. Control negativo de PCR. +. Control positivo de PCR.



Dado a que en la base de datos de *Plasmodium* (PlasmoDB) se encuentran datos reportados para el transcrito de la PfNMNAT, a partir de RNAseq y de microarreglos de ADN para cada uno de los estadios del ciclo asexual. Se procedió a realizar el análisis del transcrito con estos datos. Como se observa en la figura 6-24, la NMNAT es una proteína de baja transcripción (en comparación con el gen de referencia 18S) y no se observan variaciones significativas en los diferentes estadios del ciclo de vida asexual, esto deja en evidencia la relevancia funcional que tiene la NMNAT en el transcurso del ciclo de vida asexual del parásito. Hay que tener en cuenta entonces que debido a que el parásito solo cuenta con una NMNAT no tiene variaciones significativas como en parásitos de vida libre, los cuales cuentan con más de una isoforma.

**Figura 6-24: Niveles de transcrito de la NMNAT de *Plasmodium falciparum***

En el eje X se presentan los tres estadios asexuales del parásito, en el eje Y se enuncian los niveles del transcrito en porcentaje (percentiles). Las Librerías de ARN cadena Especificas fueron secuenciadas empleando la plataforma ilumina HiSeq2000. Figura tomada de: PlasmoDB.



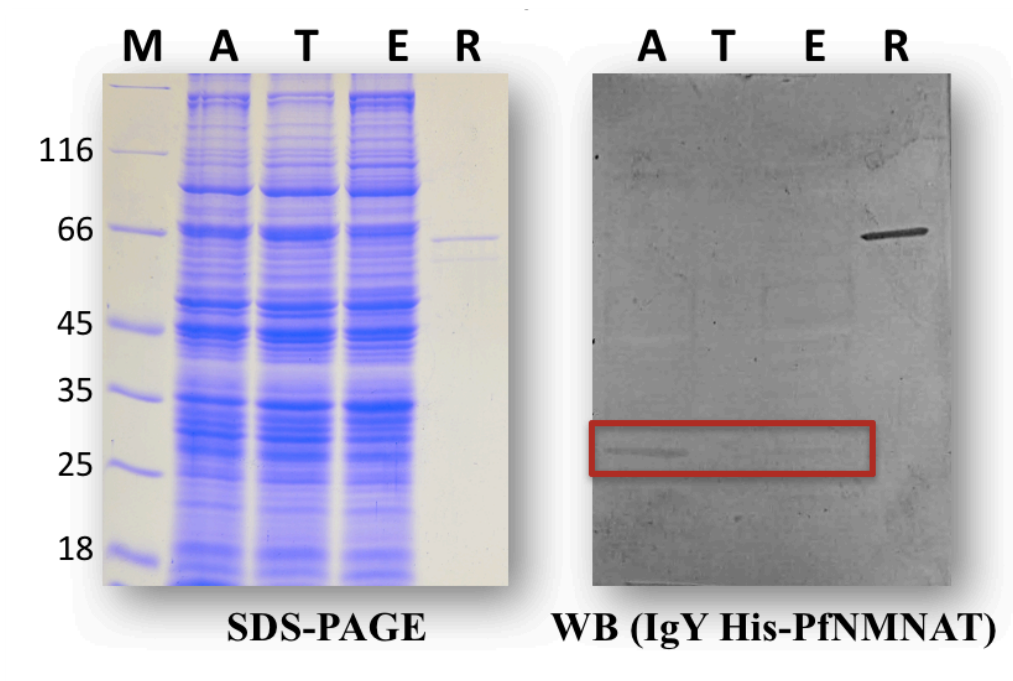
#### 6.4.2 Niveles de expresión proteica de la PfNMNAT

El análisis de extractos proteicos mediante western blot utilizando los anticuerpos anti IgY His-PfNMNAT, permitió identificar que la proteína PfNMNAT se expresa mayoritariamente en el estadio de anillo como se observa en el western blot (Figura 6-25), siendo un resultado congruente con lo reportado en la base de datos de *Plasmodium* donde mediante

perfil ribosomal se encontró que en el estadio de anillos la PfNMNAT es traduccionalmente más activa en comparación con los otros estadios del ciclo de vida asexual (Figura 6-26). Adicionalmente como se describió en los resultados de inmunodetección, Pease y colaboradores en el 2013 pudieron encontrar una fosforilación en el residuo de serina 167, que tiene su pico máximo de expresión en el estadio de anillos (Pease et al., 2013), lo cual puede estar relacionado con este resultado.

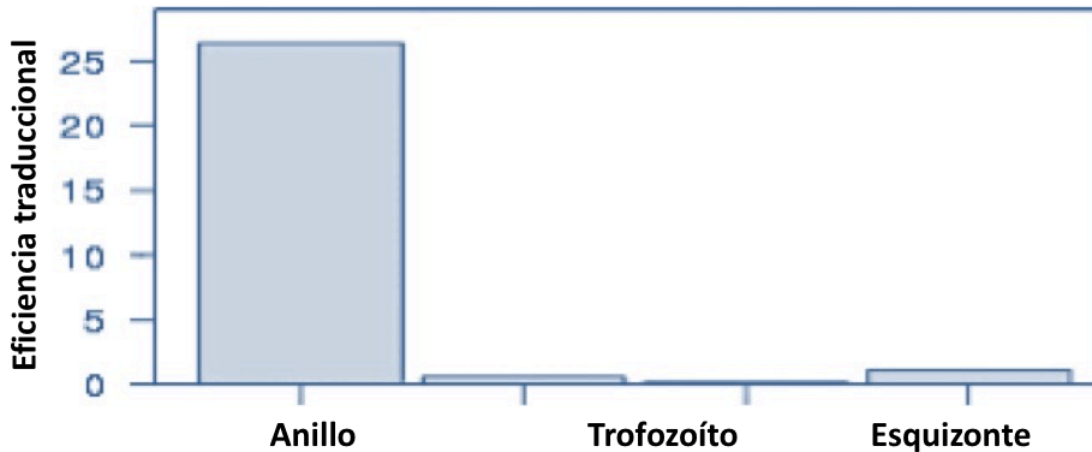
#### Figura 6-25: Análisis de expresión proteica de la PfNMNAT

Se cargaron 150µg de proteína del estadio de Anillos (A), Trofozoítos (T) y Esquizontes (E). Como control se cargaron 150ng de proteína recombinante MBP-PfNMNAT (66kDa). SDS-PAGE 12% teñido con azul de coomassie R-250 y Western blot en membrana de PVDF. Anticuerpo primario Anti IgY His-PfNMNAT (1:1000). Anticuerpo secundario: Anti gallina biotinilado (1:8000). Estreptavidina fosfatasa alcalina (1:8000). Revelado con NBT y BCIP.



#### Figura 6-26: Eficiencia traduccional de la PfNMNAT en los estadios asexuales de *Plasmodium falciparum*

En el eje x se encuentran los tres estadios, donde los anillos tienen una eficiencia traduccional de aproximadamente 25 veces más que el estadio de trofozoítos y de esquizontes. Figura tomada de: PlasmoDB.



Debido a que en el laboratorio no se dispone de anticuerpos que puedan reconocer proteínas de *Plasmodium falciparum* que sirvan como control de carga, la tinción del SDS-PAGE con azul de coomassie R-250 o la tinción de la membrana con rojo ponceau, se utilizó como control de carga para las muestras evaluadas en este trabajo, donde se puede observar la misma cantidad de proteína en todos los carriles (Figura 6-26).

Los resultados sugieren que la regulación de la expresión de PfNMNAT se puede estar dando a nivel: postranscripcional, traduccional o postraduccional, como se ha demostrado para el parásito (Cui, Lindner, & Miao, 2016; Doerig, Rayner, Scherf, & Tobin, 2015). Que en este caso específico no hay variaciones significativas a nivel transcripcional, pero si un aumento de expresión a nivel proteico en el estadio de anillos.

Cada estadio de desarrollo tiene una morfología y una fisiología distintas que se determinan por su perfil de expresión génica, como lo revelan los análisis transcriptómicos y proteómicos específicos de estadios de *P. falciparum* (Acharya et al., 2009; Bozdech et al., 2003; EM et al., 2014). De hecho, los estudios a nivel de sistemas han demostrado que *P. falciparum* se caracteriza por un patrón de expresión cíclica permanente de ARN mensajero (ARNm), en el cual cerca del 75% de los genes alcanzan los niveles máximos de expresión de mRNA en un solo punto del ciclo de vida asexual (Bozdech et al., 2003; Foth et al., 2011; Le Roch et al., 2003). Además, para aproximadamente el 30% de los genes, se observa un retraso entre el máximo nivel de expresión ARNm y los niveles proteicos (Foth et al., 2011; Le Roch et al., 2003), en casos seleccionados, esto corresponde a un retraso en el ensamblaje ribosómico (Caro, Ahyong, Betegon, & DeRisi, 2014; EM et al., 2014).

---

El resultado primario de la expresión génica es la producción de proteínas, por eso en *Plasmodium* spp., es un proceso coordinado en el tiempo y en el espacio, lo que le permite variar los niveles de una proteína para responder a una variedad de señales del medio (Kelen et al., 2009). Esto no ocurre solamente en los estadios intraeritrocíticos, sino que también está facilitando las transiciones de una etapa a otra. El hecho de que se mantenga un control post-transcripcional, se apoya en que aparentemente el parásito no cuenta en su genoma con codificantes para los factores de transcripción especializados, mientras que hay un gran número de genes que codifican para proteínas de unión y regulación del RNA (Coulson, Hall, & Ouzounis, 2004; Gardner et al., 2002; Reddy et al., 2015).



# 7. Conclusiones

## 7.1 Conclusión general

Se estudió el metabolismo del NAD<sup>+</sup> en el parásito *Plasmodium falciparum*, a través de la enzima central de su biosíntesis, NMNAT. Las evidencias bioinformáticas y experimentales que se obtuvieron en este trabajo, indicaron importantes diferencias entre la PfNMNAT y las ortólogas HsNMNAT1-3. Dichas diferencias se relacionan con los dominios exclusivos, localización intracelular y los parámetros cinéticos (Km y Vmax) de las proteínas en mención. Esto señala a la PfNMNAT como un blanco farmacológico promisorio para el control de la malaria.

## 7.2 Conclusiones específicas

- Se implementó la expresión de la PfNMNAT en otros sistemas de expresión, encontrando el mejor resultado para el vector pMAL c5X (etiqueta MBP), con aumento de la solubilidad de la proteína PfNMNAT en comparación con las otras etiquetas usadas, lo cual además facilitó la obtención de la proteína con un alto porcentaje de purificación y buen rendimiento.
- Se identificaron 2 secuencias exclusivas y conservadas en la proteína NMNAT de *Plasmodium*. La secuencia específica de género reveló que pequeños cambios en el tamaño del radical (N163D), con modificación de carga, redujeron la actividad de la enzima, mientras que radicales más grandes (N163Y) manteniendo la carga, remueven completamente la actividad de la enzima. El estudio de estos mutantes permitió un acercamiento a funcionamiento y regulación de éstas proteínas.
- Se inmunodetectó la proteína PfNMNAT usando diferentes anticuerpos y extractos proteicos de *Plasmodium falciparum*, observándose una banda de mayor peso molecular al esperado, que se podría atribuir a modificación postraduccional.

- Se estableció que la localización intracelular de la proteína NMNAT en parásitos *P. falciparum* es citoplasmática en los tres estadios del ciclo de vida asexual.
- Se observó PfNMNAT a nivel de transcrito y proteína. Los niveles de la proteína tienen variaciones en el ciclo de vida asexual, teniendo un pico mayoritario de expresión en el estadio de anillos.

## 8. Perspectivas

Nuestros resultados además de aumentar los conocimientos sobre el metabolismo del NAD<sup>+</sup> en el parásito *Plasmodium falciparum*, generaron varias preguntas que pueden guiar futuros estudios.

- ¿Las secuencias exclusivas de la PfNMNAT pueden estar alterando la formación de oligómeros de la proteína?
- ¿Podrían ser esas secuencias específicas blancos farmacológicos para el control de la malaria?
- ¿Cuáles proteínas pueden estar implicadas en la regulación de la PfNMNAT?
- ¿Por qué el parásito solo tiene una NMNAT?
- ¿Existe un transporte de NAD<sup>+</sup> o precursores en el parásito desde el medio exógeno?
- ¿Cuáles y donde pueden estar localizados los transportadores de NAD<sup>+</sup> (o precursores) en el parásito?



## 9. Anexos

### Anexo 1: Información de la PfNMNAT

INFORMACIÓN GENERAL	
PLASMO-DB	nicotinate-nucleotide adenylyltransferase
	<i>NMNAT</i>
Nombre	Nicotinamida/Nicotinato mononucleótido adenililtransferasa
Cromosoma	13
Cepa	3D7
Ubicación en el cromosoma	1,159,366 a 1,159,980
ID	PF3D7_1327600
Previo ID	PF13_0159
Intrones	0
Tamaño con intrones	615pb
Tamaño sin intrones	615pb
Proteína	NMNAT
Peso Molecular teórico	24,2 kDa
Punto isoeléctrico	7,32
Link PlasmoDB	<a href="http://plasmodb.org/plasmo/app/record/gene/PF3D7_1327600#InterPro">http://plasmodb.org/plasmo/app/record/gene/PF3D7_1327600#InterPro</a>

**SECUENCIA GENÓMICA**>*P. falciparum* NMNAT

ATGCATAAGAATATATGTATATATGGAGGGTCCTTTGATCCAATTACATATGCTCACGAAATGGT  
 TCTTGATAAAAATTAGTAATTTAAACTGGATTCATGAAATATGGGTAGTTATATGTAGATGTAGAA  
 ATGATAAATCCTTAACAGAATTTTCATCACAGACATAACATGTTTACCATAATAATAAATAACTCA  
 TCTAAAATAATAAAAAGTAAAATATTTTTAAAAGATCTTGAATCTCATAGTGAATGACTCCAAC  
 TTATGATTTATTA AAAACTCAAAAAGAATTACATCCTAATTACACCTTTTACTTTGGTCTTGGAT  
 CAGATTTGATATGTGATATATTTTCATGGGATGAAGGCGAAAACTAGTTT TAGAAAATGCATTC  
 ATAATTATTGAAAGAGGTCAC TTTAAAATAGATGAAAGTATATTAAGAAAATTTCCAAAATATTA  
 TTTAATTAATATACCCAAATTATCTTTTATCAATTTTATTTTCATCAAGTGAAGCCAGAAAATTTT  
 TAACCAAAGAAAATGATATAACGATATAAAAAAATATATTCACCCCTTACTATTGATTATATT  
 ATAAAGTATAACTTATATGATTTTAATTAG

**SECUENCIA DE LA PROTEÍNA**

MHKNICIIYGGSDPITYAHEMVLDKISNLNWIHEIWVVICRCRNDKSLTEFHHRNMFTIIINNS  
 SKIIKSKIFLKDLESHSEMPPTYDLLKTQKELHPNYTFYFGLGSDLICDIFSWDEGEKLVLENAF  
 I I I ERGHFKIDESILKKFPKYLINIPKLSFINFISSEARKFLTENDINDIKKYIHPLTIDYI  
 IKYNLYDFN

**Anexo 2: Secuencias de la PfnMNAT unida a las diferentes etiquetas****His+TF-PfnMNAT**

MQVSVETTQGLGRRVTITIAADSIETAVKSELVNAVKKVRIDGFRKGVPMNIVAQRYGASVRQD  
 VLGDLMRNFI DAIIKEKINPAGAPTYVPGEYKLGEDFTYSVEFEVYPEVELQGLEAIEVEKPIV  
 EVTDADV DGM LDTLRKQQATWKEKDGAVEAEDRVTIDFTGSVDGEEFEGGKASDFVLAMGQGRMI  
 PGFEDGIKGHKAGEEFTIDVTFPEEYHAENLKGKAAKFAINLKKVEERELPELTAEFIKRFGVED  
 GSVEGLRAEVRKNMERELKSAIRNRVKSQAIEGLVKANDIDVPAALIDSEIDVLRQAQRFGGN  
 EKQALELPRELFEEQARRVVVGLLLGEVIRTNELKADEERVKGLIEEMASAYEDPKEVIEFYK  
 NKELMNMRNVALEEQAVEAVLAKAKVTEKETTFNELMNQQASAGLEVLFQGPSAGLVPRGSGGI  
 EGRHME LGTLEGS MHKNICIIYGGSDPITYAHEMVLDKISNLNWIHEIWVVICRCRNDKSLTEFH  
 HRNMFTIIINNS SKIIKSKIFLKDLESHSEMPPTYDLLKTQKELHPNYTFYFGLGSDLICDIFS  
 WDEGEKLVLENAFI I I ERGHFKIDESILKKFPKYLINIPKLSFINFISSEARKFLTENDIND  
 IKKYIHPLTIDYI IKYNLYDFN

**His+SUMO-PfnMNAT**

MGSSHHHHHSGSLVPRGSASMSDSEVNQEAKEPVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTP  
 LRLMEAFAKRQ GKEMDSLRFYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIEAHREQIGGMHKNICIIYGGSD  
 PITYAHEMVLDKISNLNWIHEIWVVICRCRNDKSLTEFHHRNMFTIIINNS SKIIKSKIFL  
 KDLESHSEMPPTYDLLKTQKELHPNYTFYFGLGSDLICDIFSWDEGEKLVLENAFI I I ERGHFKID  
 ESILKKFPKYLINIPKLSFINFISSEARKFLTENDINDIKKYIHPLTIDYI IKYNLYDFN

MBP-PfNMNAT
<p>MKIEEGKLVIIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAH  DRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTW  EEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDIKDVGVNDAGAKAGLTF  LVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFV  GVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELVKDPRIAATMENA  QKGEIMPNI PQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSNNNNNNNNNNLGIEGRISH  MSMENLYFQGMHKNICIIYGGSFDPITYAHMVLDKISNLNWIHEI WVVICRCRNDKSLTEFHHRH  NMFTIIINSSKIIKSKIFLKDLESHSEMTPTYDLLKTQKELHPNYTFYFGLGSDLICDIFSWDE  GEKLVLENAFII IERGHFKIDESILKKFPKYLINIPKLSFINFISSEARKFLT KENDINDIKK  YIHPLTIDYIIKYNLYDFN</p>

### Anexo 3: Información del gen usado como control en la RT-PCR

INFORMACIÓN GENERAL DEL GEN	
PLASMO-DB	18S ribosomal RNA
	Pf18s
Nombre	18S ribosomal RNA <i>Plasmodium falciparum</i>
	RNA ribosomal de <i>Plasmodium falciparum</i>
Cromosoma	1
Cepa	3D7
Ubicación en el cromosoma	473,739 a 475,887
ID	PF3D7_0112300
Previo ID	MAL1_18s
Intrones	0
Tamaño con intrones	2149PB
Tamaño sin intrones	2149PB
Proteína	N.A.
Peso Molecular	N.A.
Punto isoeléctrico	N.A.
Link PlasmoDB	<a href="http://plasmodb.org/plasmo/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneReco">http://plasmodb.org/plasmo/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneReco</a>

[rdClass&source id=PF3D7\\_0112300&project id=PlasmoDB](#)

PRIMERS						
PRIMERS UNIVERSALES						
PRIMER	SEC. 5' -- 3'	nt	Ubicación	Tm° C	%GC	Ampliación
rPLU6	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	23	606 - 628	48,9	26,1	1132pb
rPLU5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC gaagtttaaggcaacaacagg	21	1717 - 1737	52,1	42,9	

#### SECUENCIA GENÓMICA (Ubicación de los primers)

```
>P.falciparum 18S ribosomal RNA
AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCACAGATTAAGCCATGCAAGTGAAAGTACATATGTAAGTAATATATTGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAATCTACTTGATGTTTTTAATATAAGGATAACTACGGAAAATCTGTAGCTAATACTTGTGAAAATACCTTTTGATATATACATATGTATGTATCATTAAGGTATGTATTTGTTAGATATAAGAATAAAATAAATATAATTGAATTATAACAAAGAAGAAACACATAAAATATGTGTATTATCAATCGAGTATCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGGTATTGACCTAACATGGCTATGACGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATTCTAAAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAATATCGAAAAATGATTTTGTAATTGGAATGATAGGAATTTACAAGGTTCCCTAGAGAAAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCATATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGTTTCGTAGTTGAATATTAAGAAATCCGATGTTTTCAATTAAGTGGTTTGGGAAAACCAAATATATTATATATTTTGCTTTGTTCAAAA  
TAAGGTTTTCTAATAAATTATGTTTTTATCAGATATGACAGAATCTTTTTTAAAATCTCTTCAATATGCTTTTATTGCTTTTGGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAAAATTAAGTGTTTATAACAGACGGGTAGTCATGATTGAGTTCATTGTGTTGAATACTACAGCATGGAATAACAAATATGAATAAGCTAATATTTTTTTTTTTCATAATTTTTTTTGATATTCTTATTAGCTTAGTTACGATTAATAGGAGTAGCTTTGGGGCATTTCGTATTCAGATGTCAGAGGTGAAATTCCTAAGATTTTCTGGAGACGGACTACTGCGAAAGCATTTCCTAATCTATTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGATACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATAACCGACTAGGTGTTGGATGAATATAAAAAATATA  
TAAATATGTAGCATTCTTAGGGAATGTTGATTTTATATTAGAATTGCTTCCTTCAGTACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGCAGATATTCGCGCAAGCGAGAAAGTTAAAAGAATTGACGGAAGGCACCACCAGGCGTGGAGCTTGC GGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTCACTAGTTTAAGACAAGAGTAGGATTGACAGATTAATAGCTCTTTCTTGATTTCTTGATGGTGATGCATG  
GCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGTAAGTACACTATATTTTTATTTGAAATTGAATATAGGTAATTATACATGTTTTAT
```



```

TCAGTGTTCAAATTAGGATATTTTTTTTATTAAAAATATTCTTTTCCCTGTTTTACTAATAATTTG
TTTTTTTTTACTCTATTTCTCTCTCTTTTTAAGAATGTACTTGCTTGATTAAATAAAGCTTCTTA
GAGGAACAGTGTGTATCTAACACAAGGAAGTTTAAGGCAACAACAGGCTGTGATGTCCTTAGAT
AAACTAGGCTGCACGCGTGCTACAATGATATATATAACAAGTTGTTAAAAATGTACTTATAAATA
AGTGTGTACAATTTTTTCCCTGTACTGAAAAGTATAGGTAATCTTTATCAGTATATATCGTAATTGG
GATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATTAGATTGT
GCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATAA
ATTGTTTGGATATGAATTAATAAATAATGAAATTTTATATTTCTGATTTTTTCTAGAAGAACTGTAA
ATCCTATCTTTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC
ATTA

```

#### BIBLIOGRAFÍA REPORTE DE PRIMERS

Snounou, G. Viriyakosola, S. Ping, X. Jarraa, W. Pinheirob, L. Rosariob, V. Thaithongc, S. Brown, N. (1993). *High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction*. Molecular and Biochemical Parasitology. 61: 315-320.

#### PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

94°C x 3min	1 ciclo
94°C x 30s	45 ciclos
55°C x 30s	
60°C x 1min	
60°C x 5min.	1 ciclo

#### Anexo 4: Buffers utilizados

##### Buffer lisis PfnMNAT

Concentración	Reactivo
50 mM	Buffer fosfato pH 7.8
400 mM	NaCl
100 mM	KCl
10%	Glicerol

1 mM	DTT
<b>Para lisis de His+SUMO y His+TF</b>	
10 mM	Imidazol
<b>Elución de His+SUMO y His+TF</b>	
35 mM, 70 mM, 150 mM, 300 mM	Imidazol
<b>Elución de MBP</b>	
20mM	Maltosa

**Buffer TMG para lisis de parásitos**

Concentración	Reactivo
10 mM	Tris-HCl pH 7.5
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	B-mercapto etanol
10%	Glicerol

**PBS 1X**

Concentración final	Reactivo
137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,8 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

## 10. Bibliografía

- Acharya, P., Pallavi, R., Chandran, S., Chakravarti, H., Middha, S., Acharya, J., ... Tatu, U. (2009). A glimpse into the clinical proteome of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Proteomics - Clinical Applications*, 3(11), 1314–1325. <https://doi.org/10.1002/prca.200900090>
- Balducci, E., Emanuelli, M., Raffaelli, N., Ruggieri, S., Amici, a, Magni, G., ... Natalini, P. (1995). Assay methods for nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of wide applicability. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1315>
- Belenky, P. A., Moga, T. G., & Brenner, C. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* YOR071C encodes the high affinity nicotinamide riboside transporter Nrt1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8075–8079. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800021200>
- Berger, F., Lau, C., Dahlmann, M., & Ziegler, M. (2005). Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 36334–36341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508660200>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(10), 3765–3770. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609211104>
- Berger, F., Ramírez-Hernández, M. H., & Ziegler, M. (2004). The new life of a centenarian: Signalling functions of NAD(P). *Trends in Biochemical Sciences*, 29(3), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.01.007>
- Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(2 Suppl 1), 3–8. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80077-3)
- Beutler, E. (2012). G6PD deficiency, 3613–3636.
- Birkholtz, L.-M., Blatch, G., Coetzer, T. L., Hoppe, H. C., Human, E., Morris, E. J., ... Louw, A. I. (2008). Heterologous expression of plasmodial proteins for structural studies and functional annotation. *Malaria Journal*, 7, 197. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-197>
- Boddey, J. A., & Cowman, A. F. (2013). *Plasmodium* nesting: remaking the erythrocyte from the inside out. *Annu Rev Microbiol*, 67, 243–269. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155730>

- Bogan, K. L., & Brenner, C. (2008). Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD<sup>+</sup> precursor vitamins in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 28, 115–130. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155443>
- Böhlke, K., Pisani, F. M., Vorgias, C. E., Frey, B., Sobek, H., Rossi, M., & Antranikian, G. (2000). PCR performance of the B-type DNA polymerase from the thermophilic euryarchaeon *Thermococcus aggregans* improved by mutations in the Y-GG/A motif. *Nucleic Acids Research*, 28(20), 3910–3917. <https://doi.org/10.1093/nar/28.20.3910>
- Bozdech, Z., & Ginsburg, H. (2005). Data mining of the transcriptome of *Plasmodium falciparum*: the pentose phosphate pathway and ancillary processes. *Malaria Journal*, 4, 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-4-17>
- Bozdech, Z., Llinás, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J., & DeRisi, J. L. (2003). The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biology*, 1(1), 85–100. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000005>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bustamante, L. Y., & Giralda, L. E. (1999). Cloroquina : hipótesis acerca de los mecanismos de resistencia en *Plasmodium falciparum*.
- Cappellini, M. D., & Fiorelli, G. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*, 371(9606), 64–74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60073-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60073-2)
- Caro, F., Ahyong, V., Betegon, M., & DeRisi, J. L. (2014). Genome-wide regulatory dynamics of translation in the *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *eLife*, 3, e04106. <https://doi.org/10.7554/eLife.04106>
- Contreras, L. E., Neme, R., & Ramírez, M. H. (2015). Identification and functional evaluation of *Leishmania braziliensis* Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase. *Protein Expression and Purification*, 115, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.08.022>
- Cossio, M. L. T., Giesen, L. F., Araya, G., Pérez-Cotapos, M. L. S., Vergara, R. L., Manca, M., ... Héritier, F. (2007). *Las bases farmacológicas de la terapéutica. Una ética para quantos?* (Vol. XXXIII). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Coulson, R., Hall, N., & Ouzounis, C. (2004). Comparative genomics of transcriptional control in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1101/gr.2218604>.
- Cui, L., Lindner, S., & Miao, J. (2016). Translational regulation during stage transitions in malaria parasites, 8(5), 583–592. <https://doi.org/10.1002/aur.1474.Replication>
- D'Angelo, I., Raffaelli, N., Dabusti, V., Lorenzi, T., Magni, G., & Rizzi, M. (2000). Structure of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase: A key enzyme in NAD<sup>+</sup> biosynthesis. *Structure*, 8(9), 993–1004. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00190-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00190-8)
- Doerig, C., Rayner, J. C., Scherf, A., & Tobin, A. B. (2015). Post-translational protein modifications in malaria parasites. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(3), 160–172.

- <https://doi.org/10.1038/nrmicro3402>
- Dolle, C., Skoge, R. H., Vanlinden, M. R., & Ziegler, M. (2013). NAD biosynthesis in humans - enzymes, metabolites and therapeutic aspects. *Curr Top Med Chem*, 13(23), 2907–2917. <https://doi.org/10.2174/15680266113136660206>
- Dong, L., Lv, L.-B., & Lai, R. (2012). [Molecular cloning of *Tupaia belangeri chinensis* neuropeptide Y and homology comparison with other analogues from primates]. *Zool. Res.* (Vol. 33). <https://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2012.01075>
- Duan, X., & Quioco, F. A. (2002). Structural evidence for a dominant role of nonpolar interactions in the binding of a transport/chemosensory receptor to its highly polar ligands. *Biochemistry*, 41(3), 706–712. <https://doi.org/10.1021/bi015784n>
- Duraisingh, M. T., Voss, T. S., Marty, A. J., Duffy, M. F., Good, R. T., Thompson, J. K., ... Cowman, A. F. (2005). Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Cell*, 121(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.036>
- EM, B., DW, C., M, H., N, P., A, S., J, P., ... Roch, L. (2014). Polysome profiling reveals translational control of gene expression in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, 1–18.
- Eren, D. (2003). *Plasmodium falciparum* enzymes involved in redox balancing of nicotinimide nucleotides. *Microbiology & Immunology*, (September).
- FF, L., WM, C., GR, C., & al, et. (1946). Activity of a new antimalarial agent, chloroquine (sn 7618): Statement approved by the board for coordination of malarial studies. *Journal of the American Medical Association*, 130(16), 1069–1070. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1946.02870160015006>
- Flick, K., & Chen, Q. (2004). var genes , PfEMP1 and the human host, 134, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.09.010>
- Foth, B. J., Zhang, N., Chahal, B. K., Sze, S. K., Preiser, P. R., & Bozdech, Z. (2011). Quantitative time-course profiling of parasite and host cell proteins in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 10(8), M110.006411. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.006411>
- Fox, J. D., Kapust, R. B., & Waugh, D. S. (2001). Single amino acid substitutions on the surface of Escherichia coli maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 10(3), 622–630. <https://doi.org/10.1110/ps.45201>
- Frank, M., & Deitsch, K. (2006). Activation, silencing and mutually exclusive expression within the var gene family of *Plasmodium falciparum*. *International Journal for Parasitology*, 36(9), 975–985. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.05.007>
- Garavaglia, S., D'Angelo, I., Emanuelli, M., Carnevali, F., Pierella, F., Magni, G., & Rizzi, M. (2002). Structure of human NMN adenylyltransferase: A key nuclear enzyme for NAD homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8524–8530. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111589200>

- Garavito, G., Arteaga, L., & Acebey, L. (2002). *La biocristalización del heme como una potencial diana farmacológica en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la malaria*.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., ... Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906), 498–511. <https://doi.org/10.1038/nature01097>
- Gazanion, E., Garcia, D., Silvestre, R., Gérard, C., Guichou, J. F., Labesse, G., ... Vergnes, B. (2011). The Leishmania nicotinamidase is essential for NAD + production and parasite proliferation. *Molecular Microbiology*, 82(1), 21–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07799.x>
- Gazanion, E., Seblova, V., Votypka, J., Vergnes, B., Garcia, D., Volf, P., & Sereno, D. (2012). Leishmania infantum nicotinamidase is required for late-stage development in its natural sand fly vector, Phlebotomus perniciosus. *International Journal for Parasitology*, 42(4), 323–327. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.007>
- Ghosh, S., George, S., Roy, U., Ramachandran, D., & Kolthur-Seetharam, U. (2010). NAD: A master regulator of transcription. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(10–12), 681–693. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.08.002>
- Ginsburg, H., & Abdel-Haleem, A. M. (2016). Malaria Parasite Metabolic Pathways (MPMP) Upgraded with Targeted Chemical Compounds. *Trends in Parasitology*, 32(1), 7–9. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.10.003>
- Good, M. F. (2005). Genetically modified *Plasmodium* highlights the potential of whole parasite vaccine strategies. *Trends in Immunology*, 26(6), 295–297. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.04.005>
- Hien, T. T., Day, N. P., Phu, N. H., Nguyen, T. H., Tran, T. H., Pham, P. L., ... White, N. J. (1996). A controlled trial of artemether or quinine in Vietnamese adults with severe falciparum malaria. *The New England Journal of Medicine*, 335(2), 76–83. <https://doi.org/10.1056/NEJM199607113350202>
- Hirose, S., Kawamura, Y., Yokota, K., Kuroita, T., Natsume, T., Komiya, K., ... Noguchi, T. (2011). Statistical analysis of features associated with protein expression/solubility in an in vivo Escherichia coli expression system and a wheat germ cell-free expression system. *Journal of Biochemistry*, 150(1), 73–81. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr042>
- INS, I. N. de S. (2016). *Boletín epidemiológico semana 52 de 2016*.
- Kapust, R. B., & Waugh, D. S. (1999). Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 8(8), 1668–1674. <https://doi.org/10.1110/ps.8.8.1668>
- Kato, M., & Lin, S. J. (2014). YCL047C/POF1 is a novel nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22), 15577–15587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.558643>
- Katoh, A., Uenohara, K., Akita, M., & Hashimoto, T. (2006). Early steps in the biosynthesis of NAD in Arabidopsis start with aspartate and occur in the plastid. *Plant Physiology*,

- 141(3), 851–857. <https://doi.org/10.1104/pp.106.081091>
- Kelen, K. Van Der, Beyaert, R., Inzé, D., Veylder, L. De, Van Der Kelen, K., Beyaert, R., ... De Veylder, L. (2009). Translational control of eukaryotic gene expression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(February), 143–168. <https://doi.org/10.1080/10409230902882090>
- Khan, J. a, Forouhar, F., Tao, X., & Tong, L. (2007). Nicotinamide adenine dinucleotide metabolism as an attractive target for drug discovery. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(5), 695–705. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.5.695>
- Krnajski, Z., Gilberger, T. W., Walter, R. D., Cowman, A. F., & Müller, S. (2002). Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 25970–25975. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203539200>
- Kumar Singh, S., Kurnasov, O. V., Chen, B., Robinson, H., Grishin, N. V., Osterman, A. L., & Zhang, H. (2002). Crystal structure of Haemophilus influenzae NADR protein. A bifunctional enzyme endowed with NMN adenylyltransferase and ribosylnicotinamide kinase activities. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33291–33299. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204368200>
- Kyes, S. A., Kraemer, S. M., & Smith, J. D. (2007). Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: Gene organization and regulation of the var multigene family. *Eukaryotic Cell*, 6(9), 1511–1520. <https://doi.org/10.1128/EC.00173-07>
- Lau, C. (2009). The NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) protein family. *Frontiers in Bioscience, Volume(14)*, 410. <https://doi.org/10.2741/3252>
- Lau, C., Dölle, C., Gossmann, T. I., Agledal, L., Niere, M., & Ziegler, M. (2010). Isoform-specific targeting and interaction domains in human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), 18868–18876. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107631>
- Le Roch, K. G., Zhou, Y., Blair, P. L., Grainger, M., Moch, J. K., Haynes, J. D., ... Winzeler, E. A. (2003). Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*, 301(5639), 1503–1508. <https://doi.org/10.1126/science.1087025>
- Ma, B., Pan, S.-J., Domergue, R., Rigby, T., Whiteway, M., Johnson, D., & Cormack, B. P. (2009). High-affinity transporters for NAD<sup>+</sup> precursors in *Candida glabrata* are regulated by Hst1 and induced in response to niacin limitation. *Molecular and Cellular Biology*, 29(15), 4067–4079. <https://doi.org/10.1128/MCB.01461-08>
- Magnan, C. N., Randall, A., & Baldi, P. (2009). SOLpro: Accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics*, 25(17), 2200–2207. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp386>
- Marín, C. & Ramírez, M. (2009). Identificación, expresión y caracterización de la Nicotinamida/nicotinato mononucleotido adenililtransferasa de *Plasmodium falciparum* (PfNMNA T), 31, 129.
- Marín, C. (2010). IDENTIFICACIÓN, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA NICOTINAMIDA/NICOTINATO MONONUCLEÓTIDO ADENILILTRANSFERASA DE

*Plasmodium falciparum* (PfNMNAT), 1–117.

- Mehlin, C., Boni, E., Buckner, F. S., Engel, L., Feist, T., Gelb, M. H., ... Hol, W. G. J. (2006). Heterologous expression of proteins from *Plasmodium falciparum*: Results from 1000 genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 148(2), 144–160. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.011>
- Mejía, L. M. S., & Ramírez-Hernández, M. H. (2011). OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE NICOTINAMIDA / NICOTINATO MONONUCLEÓTIDO ADENILIL TRANSFERASA DE *Plasmodium falciparum* (PfNMNAT), (4).
- Merrick, C. J., & Duraisingh, M. T. (2007). *Plasmodium falciparum* Sir2: An unusual sirtuin with dual histone deacetylase and ADP-ribosyltransferase activity. *Eukaryotic Cell*, 6(11), 2081–2091. <https://doi.org/10.1128/EC.00114-07>
- Montoya, P., Tobón, A., Blair, S., Carmona, J., & Maestre, A. (2007). Polimorfismos del gen *pfmrd1* en muestras clínicas de *Plasmodium falciparum* y su relación con la respuesta terapéutica a antipalúdicos y paludismo grave en Colombia, 204–215.
- Müller, S. (2004). Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 53(5), 1291–1305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04257.x>
- Nealon, C., Dzeing, A., Müller-römer, U., Planche, T., Sinou, V., Kombila, M., ... Mu, U. (2002). Intramuscular Bioavailability and Clinical Efficacy of Artesunate in Gabonese Children with Severe Malaria. *Intramuscular Bioavailability and Clinical Efficacy of Artesunate in Gabonese Children with Severe Malaria*, 46(12), 3933–3939. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3933>
- Nikiforov, A., Kulikova, V., & Ziegler, M. (2015). The human NAD metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 0(0), 1–14. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1028612>
- O'Hara, J. K., Kerwin, L. J., Cobbold, S. A., Tai, J., Bedell, T. A., Reider, P. J., & Llinás, M. (2014). Targeting NAD<sup>+</sup> metabolism in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094061>
- O'Neill, P. M., Bray, P. G., Hawley, S. R., Ward, S. A., & Park, B. K. (1998). 4-Aminoquinolines—Past, present, and future; A chemical perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 77(1), 29–58. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(97\)00084-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(97)00084-3)
- Olszewski, K. L., Morrissey, J. M., Wilinski, D., Burns, J. M., Vaidya, A. B., Rabinowitz, J. D., & Llinás, M. (2009). Host-Parasite Interactions Revealed by *Plasmodium falciparum* Metabolomics. *Cell Host and Microbe*, 5(2), 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.004>
- Onseca, J. A. C. A., & Lair, S. I. B. (2006). Colombia Médica Seguridad hepática y hemática de la amodiaquina en el tratamiento Colombia Médica, 37, 258–265.
- Palmieri, F., Rieder, B., Ventrella, A., Blanco, E., Do, P. T., Nunes-Nesi, A., ... Neuhaus, H. E. (2009). Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD<sup>+</sup> carrier proteins. *Journal of Biological*



- Chemistry*, 284(45), 31249–31259. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041830>
- Pease, B. N., Huttlin, E. L., Jedrychowski, M. P., Talevich, E., Harmon, J., Dillman, T., ... Chakrabarti, D. (2013). Global analysis of protein expression and phosphorylation of three stages of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development. *Journal of Proteome Research*, 12(9), 4028–4045. <https://doi.org/10.1021/pr400394g>
- Pei-quan, C., Guo-qiao, L., Xing-bo, G., Kun-rong, H., Yong-xin, F., Lin-chun, F., & Yu-zong, S. (1994). The infectivity of gametocytes of *Plasmodium falciparum* from patients treated with artemisinin. *Chinese Medical Journal*, 107(9), 709–711.
- Pföh, R., Pai, E. F., & Saridakis, V. (2015). Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase displays alternate binding modes for nicotinamide nucleotides. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71, 2032–2039. <https://doi.org/10.1107/S1399004715015497>
- Plata, G., Hsiao, T.-L., Olszewski, K. L., Llinás, M., & Vitkup, D. (2010). Reconstruction and flux-balance analysis of the *Plasmodium falciparum* metabolic network. *Molecular Systems Biology*, 6(408), 408. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.60>
- Prusty, D., Mehra, P., Srivastava, S., Shivange, A. V., Gupta, A., Roy, N., & Dhar, S. K. (2008). Nicotinamide inhibits *Plasmodium falciparum* Sir2 activity in vitro and parasite growth. *FEMS Microbiology Letters*, 282(2), 266–272. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01135.x>
- Ralph, S. A., Scheidig-Benatar, C., & Scherf, A. (2005). Antigenic variation in *Plasmodium falciparum* is associated with movement of var loci between subnuclear locations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), 5414–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408883102>
- Randall, L. L., Topping, T. B., Smith, V. F., Diamond, D. L., & Hardy, S. J. S. (1998). SecB: A chaperone from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, 290(1985), 444–459. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(98\)90037-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(98)90037-4)
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1760–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>
- Reddy, B. P. N., Shrestha, S., Hart, K. J., Liang, X., Kemirembe, K., Cui, L., & Lindner, S. E. (2015). A bioinformatic survey of RNA-binding proteins in *Plasmodium*. *BMC Genomics*, 16(1), 890. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2092-1>
- Restrepo-Pineda, E., Arango, E., Maestre, a, Do Rosário, V. E., & Cravo, P. (2008). Studies on antimalarial drug susceptibility in Colombia, in relation to Pfmdr1 and PfCRT. *Parasitology*, 135(5), 547–53. <https://doi.org/10.1017/S0031182008004307>
- Roche, L. (2008). LARIAM brand of mefloquine hydrochloride. *East*, 1–6.
- Roth, E. (1990). *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. *Blood Cells*, 16(2–3), 453–66.
- Roth, E. F. (1987). Malarial parasite hexokinase and hexokinase-dependent glutathione

- reduction in the *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocyte. *Journal of Biological Chemistry*, 262(32), 15678–15682.
- Roth, F., Raventos-suarez, C., Nagel, R. L., & Annenberg, P. (1982). GLUTATHIONE STABILITY AND OXIDATIVE STRESS IN *P. FALCIPARUM* INFECTION IN VITRO: RESPONSES OF NORMAL AND G6PD DEFICIENT CELLS, 109(2), 355–362.
- Sánchez-Lancheros, D. M., Ospina-Giraldo, L. F., & Ramírez-Hernández, M. H. (2016). Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of *Trypanosoma cruzi* (TcNMNAT): a cytosol protein target for serine kinases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(11), 670–675. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160103>
- Sasaki, Y., Araki, T., & Milbrandt, J. (2006). Stimulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthetic pathways delays axonal degeneration after axotomy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(33), 8484–91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2320-06.2006>
- Schweiger, M., Hennig, K., Lerner, F., Niere, M., Hirsch-Kauffmann, M., Specht, T., ... Ziegler, M. (2001). Characterization of recombinant human nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase (NMNAT), a nuclear enzyme essential for NAD synthesis. *FEBS Letters*, 492(1–2), 95–100. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02180-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02180-9)
- Sharff, A. J., Rodseth, L. E., Spurlino, J. C., & Quijcho, F. A. (1992). Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry*, 31(44), 10657–10663. <https://doi.org/10.1021/bi00159a003>
- Singh, A., Upadhyay, V., & Panda, A. K. (2014). Solubilization and refolding of inclusion body proteins. *Insoluble Proteins: Methods and Protocols*, 99(4), 283–291. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_15)
- Smialowski, P., Doose, G., Torkler, P., Kaufmann, S., & Frishman, D. (2012). PROSO II - A new method for protein solubility prediction. *FEBS Journal*, 279(12), 2192–2200. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08603.x>
- Spurlino, J. C., Lu, G. Y., & Quijcho, F. A. (1991). The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 266(8), 5202–5219. <https://doi.org/2002054>
- Stanek, M., Schnell, R., & Rydén-Aulin, M. (2005). Analysis of *Escherichia coli* nicotinate mononucleotide adenylyltransferase mutants in vivo and in vitro. *BMC Biochemistry*, 6, 16. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-6-16>
- Sturm, A., Amino, R., Sand, C. Van De, Regen, T., Rennenberg, A., Krueger, A., ... Heussler, V. T. (2016). Fission of a merogony; PVM biological mutant silencing of the detached end of the Hoechst-schroeder detached oocyst (sergreen, wide) - the parasite in the oocyst - DNA Oocyst - Exploring the life cycle; \_\_, 313(5791), 1287–1290.
- Targett, G., Drakeley, C., Jawara, M., Von Seidlein, L., Coleman, R., Deen, J., ... Milligan,

- P. (2001). Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(8), 1254–1259. <https://doi.org/10.1086/319689>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Todisco, S., Agrimi, G., Castegna, A., & Palmieri, F. (2006). Identification of the mitochondrial NAD<sup>+</sup> transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1524–1531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510425200>
- Tonkin, C. J., Carret, C. K., Duraisingh, M. T., Voss, T. S., Ralph, S. A., Hommel, M., ... Cowman, A. F. (2009). Sir2 paralogs cooperate to regulate virulence genes and antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biology*, 7(4), 0771–0788. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000084>
- Tonkin, C. J., Van Dooren, G. G., Spurck, T. P., Struck, N. S., Good, R. T., Handman, E., ... McFadden, G. I. (2004). Localization of organellar proteins in *Plasmodium falciparum* using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 137(1), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.05.009>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4. <https://doi.org/10.1002/bies.950190612>
- Trager, W., & Jensen, J. B. (1976). Human Malaria Parasites in Continuous Culture., 91(3), 484–486.
- Vickerman, K. (2005). The lure of life cycles: Cyril Garnham and the malaria parasites of primates. *Protist*, 156(4), 433–49. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.09.003>
- Wells, T. N., & Poll, E. M. (2010). When is enough enough? The need for a robust pipeline of high-quality antimalarials. *Discovery Medicine*, 9(48), 389–398.
- Werner, E., Ziegler, M., Lerner, F., Schweiger, M., & Heinemann, U. (2002). Crystal structure of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase in complex with NMN. *FEBS Letters*, 516(1–3), 239–244. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02556-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02556-5)
- WHO, W. H. O. (2016). *World Malaria Report*.
- Winstanley, P. A., Ward, S. A., & Snow, R. W. (2002). Clinical status and implications of antimalarial drug resistance. *Microbes and Infection*, 4(2), 157–164. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01523-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01523-4)
- Zerez, C. R., Roth, E. F., Schulman, S., & Tanaka, K. R. (1990). Increased nicotinamide adenine dinucleotide content and synthesis in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood*, 75(8), 1705–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2183889>

- Zhai, R. G., Cao, Y., Hiesinger, P. R., Zhou, Y., Mehta, S. Q., Schulze, K. L., ... Bellen, H. J. (2006). *Drosophila* NMNAT maintains neural integrity independent of its NAD synthesis activity. *PLoS Biology*, 4(12), 2336–2348. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040416>
- Zhang, X., Kurnasov, O. V., Karthikeyan, S., Grishin, N. V., Osterman, A. L., & Zhang, H. (2003). Structural characterization of a human cytosolic NMN/NaMN adenylyltransferase and implication in human NAD biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 13503–13511. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300073200>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- Zhou, T., Kurnasov, O., Tomchick, D. R., Binns, D. D., Grishin, N. V., Marquez, V. E., ... Zhang, H. (2002). Structure of human nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase. Basis for the dual substrate specificity and activation of the oncolytic agent tiazofurin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 13148–13154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111469200>