



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio molecular de la miosina B de *Plasmodium falciparum*

Paula C. Hernández Atehortúa, MSc.

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

2016

Estudio molecular de la miosina B de *Plasmodium falciparum*

Paula C. Hernández Atehortúa

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctora en Ciencias- Química

Director:

PhD Moisés Wasserman Lerner

Asesora:

PhD Jacqueline Chaparro Olaya

Línea de Investigación:

Biología Molecular de *Plasmodium*

Grupo de Investigación:

LIBBIQ UN /

Laboratorio de Parasitología Molecular, Universidad El Bosque

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2016

*A mi Samuel, el motor que impulsa mi vida
todos los días.*

En memoria de mi hermana Lulú.

Agradecimientos

A las instituciones que financiaron este trabajo:

- Colciencias. Programa Nacional de Formación de Investigadores "Generación del Bicentenario", modalidad Doctorados en Colombia (Convocatoria 511).
- Colciencias. Proyecto 110152128729.
- Universidad El Bosque proyecto UB-271-2010. Por concederme la comisión de estudios de doctorado 2011-2015.
- DIB- Dirección de Investigación de la Sede Bogotá - Universidad Nacional de Colombia. Proyecto 19106.

A las personas:

- Al Profesor Moisés Wasserman por su dirección.
- A la Profesora Jacqueline Chaparro-Olaya por creer en mí, por apoyarme y ayudarme en toooooo. Gracias por tu tiempo, por tu cerebro, por tu dedicación y por tu amor.
- Al Doctor Otero, Vicerrector de Investigaciones de la Universidad El Bosque por la confianza y el apoyo.
- A la Profesora Célia García, Investigadora del Instituto de Biociencias de la Universidad de São Paulo (São Paulo), por permitirme realizar la pasantía en su laboratorio, por su confianza y generosidad. Y a todo su grupo de investigadores, en especial a Miriam Santos por su constante ayuda y amor, a Kênia V. Lopes, a Fahyme Costa, a Myna Nakabashi, a Mateus Fila, a Gepoliano Chaves, a Giuliana Tessarin y a Julio Liévano.
- A Liliana Morales de mi super grupo de Parasitología Molecular por toda su ayuda, compañía y afecto.

- A Myriam Velandia, mujer amorosa e inteligente que siempre está ahí para ayudarme, gracias a su amistad incondicional, me ayudaste muchisimooooo.
- Al Profesor Chuck Farah del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo (São Paulo), por su asesoría.
- A Ladys Sarmiento del laboratorio de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud por toda su ayuda, tiempo y trabajo en el procesamiento de las muestras de microscopía electrónica.
- A Isabel Castellanos y Katherine León por su ayuda, trabajo y amistad.
- A Magda, Ariel, Carlos, Elizabeth, Caroline, Glorry y Rosalba por todos los favores, pero especialmente por su cariño.
- A mi familia amorosa que siempre me apoya en todo: mi mamá y mis hermanos.
- A mi esposo Julián Rodríguez por su amor y su apoyo incondicional, por patrocinar en todo sentido este doctorado.

Resumen

La invasión celular es un proceso importante para muchos microorganismos patógenos incluidos algunos parásitos ya que es parte esencial de su ciclo de vida. Los parásitos apicomplexa, *phylum* al cual *Plasmodium falciparum* pertenece, son organismos de vida intracelular obligada y utilizan una estrategia de locomoción llamada *gliding* para desplazarse e invadir las células del huésped y causar enfermedad. El *gliding* es llevado a cabo por un grupo de proteínas (glideosoma) que incluye un motor actina-miosina. Hasta la fecha se han identificado seis miosinas en *P. falciparum* (PfMyoA-B-C-D-E y F), pero sólo se ha podido establecer la función de PfMyoA, de la que se sabe hace parte del *glideosoma* y está involucrada en el proceso de invasión a eritrocitos y células del mosquito vector. Con base en análisis y observaciones anteriores nos preguntamos si PfMyoB podría ser funcionalmente redundante con PfMyoA. Para confrontar esa hipótesis, buscamos las potenciales interacciones *in vitro* entre PfMyoB y el *partner* natural de PfMyoA, MTIP. Para ello fue imprescindible obtener un juego completo de proteínas recombinantes que expresaran diferentes dominios de las proteínas de interés unidas a proteínas “etiqueta” o *tags* diversos y producir anticuerpos a partir de estas proteínas recombinantes en diferentes especies animales. Con esas herramientas las proteínas pudieron ser detectadas en forma específica y simultánea en el mismo ensayo y también se hicieron experimentos de competencia entre PfMyoA y PfMyoB por el sitio de unión a MTIP, así como ensayos de inhibición de unión usando péptidos específicos. Igualmente, se pudo detectar la proteína PfMyoB únicamente en el estado de esquizonte maduro, concentrada específicamente en la parte apical de los merozoítos. Nuestros resultados sugieren que PfMyoB tiene una estructura muy similar a PfMyoA y que eventualmente podría unirse a MTIP cuando en una reacción de competencia se disminuye la cantidad de PfMyoA, planteándose aquí un evento de redundancia funcional.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, miosina, bioinformática, proteína recombinante, interacción proteína-proteína, esquizonte, merozoíto.

Abstract

Cell invasion is an important process for many pathogens including some parasites as it is an essential part of their life cycle. The *apicomplexa* parasites, phylum to which *Plasmodium falciparum* belongs, are obligate intracellular organisms that use a strategy called *gliding* locomotion to move and invade host cells and cause disease. The *gliding* is carried out by a group of proteins (glideosome) including a myosin-actin motor. To date, it has been identified six myosins in *P. falciparum* (PfMyoA, B, C, D, E and F), but it has only been able to establish the role of PfMyoA, which we know is part of glideosome and is involved in the process of erythrocytes invasion and also in the invasion of vector mosquito cells. Based on previous observations, we wonder if PfMyoB could be functionally redundant with PfMyoA. To challenge this hypothesis, we search for potential *in vitro* interactions between PfMyoB and the natural partner of PfMyoA, MTIP. To develop this hypothesis, it was mandatory to obtain a complete set of different recombinant proteins binded to several tags and to obtain antibodies from these recombinant proteins in different animal species. With these molecular tools, we could be able to detect specifically and simultaneously in the same competition assay to PfMyoA and PfMyoB against to binding site of MTIP and also in inhibition assays using specific binding peptides.

Similarly, we obtained specific detection of PfMyoB with our antibody only in mature schizont stage, concentrated specifically on the apical side of the merozoites. Our results suggest that PfMyoB has a structure very similar to PfMyoA and could eventually interact to MTIP when in a competition reaction the amount of PfMyoA is decreased, considering here an event of functional redundancy.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, myosin, gliding, recombinant protein, bioinformatics, protein-protein interactions, schizont, merozoite.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract.....	X
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVII
Introducción	1
1. Marco teórico.....	3
1.1 La malaria.....	3
1.2 Ciclo de vida de <i>P. falciparum</i>	6
1.3 Miosinas	8
1.3.1 Mecanismo molecular del motor.....	14
1.3.2 Funciones de las miosinas	16
1.3.3 Miosinas de <i>Plasmodium</i>	17
1.3.4 El caso de <i>Toxoplasma</i>	20
1.3.5 Invasión y movimiento.....	21
1.3.6 El <i>Glideosoma</i>	23
2. Objetivos.....	27
2.1 Objetivo general.....	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. Materiales y métodos	29
3.1 Materiales y técnicas generales.....	30
3.1.1 Anticuerpos	30
3.1.2 Vectores plasmídicos	31
3.1.3 Detección y revelado en Western Blot (WB).....	31
3.2 Producción de proteínas recombinantes	32
3.2.1 Obtención de los fragmentos de ADNc por RT-PCR	33
3.2.2 Subclonación en el vector de expresión	34
3.2.3 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	35
3.3 Producción de anticuerpos policlonales anti-miosina	39
3.4 Anticuerpos policlonales contra péptidos sintéticos de PfMyoB	40
3.5 Cultivo de parásitos y obtención de extractos proteicos.....	40
3.5.1 Cultivo de <i>P. falciparum</i>	40

3.5.2	Obtención de extractos de proteínas	41
3.5.3	Detección de la proteína PfMyoB en extractos y en células	42
3.6	Ensayo de inmunoprecipitación	43
3.7	Ensayos de interacción in vitro de proteínas	44
3.7.1	Far Western Blot.....	44
3.7.2	<i>Pulldown</i>	46
3.7.3	Experimento de competencia de PfMyoB y PfMyoA por el sitio de unión a MTIP	48
3.8	Experimento de inhibición de la interacción MTIP-MyoB por medio de péptidos sintéticos	50
3.9	Bioinformática	51
3.9.1	Predicción de estructura tridimensional de PfMyoB	51
3.9.2	Predicción de la interacción entre MTIP y PfMyoB.....	52
3.9.3	Predicción de posibles cadenas livianas de miosina en el genoma de <i>P. falciparum</i>	52
4.	Resultados y discusión	54
4.1	Bioinformática I: modelamiento tridimensional de las miosinas PfMyoB y PfMyoA.....	54
4.2	Herramientas moleculares para la detección y localización de PfMyoB en extractos y células.....	61
4.2.1	Producción de proteínas recombinantes	62
4.2.2.	Evaluación de la especificidad de los anticuerpos anti-PfMyoB y PfMyoA	74
4.3	Bioinformática II: Búsqueda <i>in silico</i> de posibles lugares de interacción entre PfMyoB y MTIP	90
4.4	Ensayos de <i>far western blot</i> y <i>pulldown</i>	94
4.5	Bioinformática III: Búsqueda de cadenas livianas o proteínas similares a CaM en el genoma de <i>P. falciparum</i>	107
5.	Conclusiones	115
A.	Anexo: Secuencia de <i>primers</i>	103
B.	Anexo: Mapas de vectores	104
C.	Anexo: Reporte de diseño de péptidos para obtención de anticuerpos policlonales de PfMyoB	107
D.	Anexo. Secuencia de fragmentos	110
	Bibliografía	113

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Mapa de distribución de los casos de malaria en Colombia en el año 2015. ..	4
Figura 1-2 Diagrama del ciclo de vida del parásito de la malaria.	7
Figura 1-3 Esquema de las formas invasivas de <i>Plasmodium falciparum</i> (a escala).....	8
Figura 1-4 Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con las secuencias del dominio motor de las miosinas.	9
Figura 1-5 Modelo de cintas de una miosina clase II.	10
Figura 1-6 Diagrama que muestra la arquitectura de los dominios y motivos de las secuencias de proteínas representativas de las 31 clases de miosinas.....	11
Figura 1-7 Estructura de algunas miosinas.	14
Figura 1-8 Esquema de un ciclo de movimiento de una miosina clase V sobre un filamento de actina.	15
Figura 1-9 Esquema que muestra cómo el cambio conformacional en el dominio motor conduce al movimiento del amplificador mecánico o palanca alfa hélice (dominio de cuello-cola).....	16
Figura 1-10 Modelo esquemático de la invasión del eritrocito por el merozoíto de <i>Plasmodium</i>	22
Figura 1-11 Procesamiento de las proteínas de superficie de merozoíto antes, durante y después de la invasión.	23
Figura 1-12 Esquema del <i>glideosoma</i> propuesto para <i>Plasmodium</i>	25
Figura 3-1 Constructos de PfMyoB.	33
Figura 3-2 Esquema de la secuencia de PfMyoB.	40
Figura 3-3 Diagrama del ensayo de Far Western Blot para analizar interacciones proteína-proteína.	45
Figura 3-4 Diagrama del ensayo de <i>pulldown</i> para analizar o confirmar interacciones proteína-proteína.	46
Figura 4-1 Alineamiento pareado de la secuencia de aminoácidos de PfMyoA y PfMyoB, obtenido mediante Clustal Omega.....	55
Figura 4-2 Modelo 3D de PfMyoA obtenido por medio de <i>threading</i> en I-Tasser.	56
Figura 4-3 Validación de la estructura tridimensional para PfMyoA.	57
Figura 4-4 Modelo 3D de PfMyoB obtenido por medio de <i>threading</i> en I-Tasser.	58
Figura 4-5 Validación de la estructura tridimensional para PfMyoB.	59
Figura 4-6 Superposición de las estructuras terciarias de PfMyoA y PfMyoB.	61
Figura 4-7 Obtención del fragmento MyoB4 y clonación en vector pJET.	63

Figura 4-8 Alineamiento de la secuencia del ARNm del fragmento del gen de PfMyoB con el resultado de la secuenciación del plásmido recombinante del pMAL-MyoB4.	64
Figura 4-9 Subclonación en vector de expresión pMAL.....	64
Figura 4-10 Expresión de la proteína recombinante MyoB4, inducida con IPTG.	65
Figura 4-11 Cromatografía de afinidad con resina de amilosa para purificación de la proteína recombinante MyoB4.	66
Figura 4-12 Expresión de la proteína recombinante MyoB1, inducida con IPTG por 3 horas.....	68
Figura 4-13 Expresión de la proteína recombinante MyoB2, inducida con IPTG por 3 horas.....	68
Figura 4-14 Expresión de la proteína recombinante MyoB3, inducida con IPTG por 3 horas.....	69
Figura 4-15 Expresión de la proteína recombinante MyoAMBP, inducida con IPTG.	70
Figura 4-16 Expresión de la proteína recombinante MyoAHis, inducida con IPTG.	71
Figura 4-17 Expresión de la proteína recombinante MTIP, inducida con IPTG.....	72
Figura 4-18 Expresión de las proteínas recombinantes MBP y GST, inducidas con IPTG.	73
Figura 4-19 WB de evaluación de anticuerpos policlonales producidos en rata contra proteínas recombinantes.....	74
Figura 4-20 Extendido de formas maduras de <i>P. falciparum</i>	75
Figura 4-21 WB de evaluación de anticuerpos policlonales antiMyoB producidos en rata en extractos de esquizontes.....	76
Figura 4-22 WB de IP anti-MyoB usando anticuerpos policlonales obtenidos en rata en extractos de esquizontes.	77
Figura 4-23 WB de evaluación de anticuerpos policlonales antiMyoA producidos en rata.	78
Figura 4-24 Esquema de PfMyoB con la posición de los péptidos inmunogénicos usados para obtener los anticuerpos en conejo AbP1 y AbP2.....	78
Figura 4-25 WB anti-MyoB usando anticuerpos policlonales obtenidos en conejo en extractos de esquizontes.	79
Figura 4-26 WB anti-MyoB usando anticuerpos policlonales obtenidos en conejo en extractos de glóbulos rojos.....	80
Figura 4-27 Reconocimiento de proteínas recombinantes de PfMyoB usando anticuerpos policlonales obtenidos en conejo.	80
Figura 4-28 Detección de PfMyoB en extractos de parásitos del estado intraeritrocítico.	81
Figura 4-29 Detección de PfMyoB y PfMyoA en extractos de esquizontes.....	82
Figura 4-30 IFA de detección de PfMyoB en esquizontes.	83
Figura 4-31 Localización inmunoelectrónica de PfMyoB en esquizonte de <i>P. falciparum</i> con anticuerpo AbP2.....	84
Figura 4-32 Detalle de localización inmunoelectrónica de PfMyoB en citoplasma de merozoíto de <i>P. falciparum</i> con anticuerpo AbP2.....	85
Figura 4-33 WB de IP anti-MyoB usando anticuerpo AbP2 sobre extractos de esquizontes.....	87

Figura 4-34 Gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie de ensayo de IP anti-MyoB usando anticuerpos AbP1y AbP2 sobre extractos de esquizontes.	88
Figura 4-35 Docking molecular entre motivos IQ de PfMyoB y MTIP.	91
Figura 4-36 Modelo tridimensional predicho de la proteína de fusión MBP-MyoB4.	93
Figura 4-37 Far Western Blot de cola de PfMyoB (MyoB4) y MTIP.	94
Figura 4-38 Far Western Blot de cola de PfMyoA (MyoAMBp) y MTIP.	96
Figura 4-39 Cultivos bacterianos que expresan proteínas recombinantes de los fragmentos de MyoB y MTIP.	97
Figura 4-40 Purificación de los complejos de interacción entre proteínas recombinantes de los fragmentos de MyoB y MTIP con resina de amilosa.	98
Figura 4-41 <i>Pulldown</i> para análisis de la interacción entre MTIP y MyoB4.	99
Figura 4-42 <i>Pulldown</i> para análisis de la interacción entre MTIP recombinante y las proteínas nativas PfMyoA y PfMyoB en un extracto de esquizontes.	100
Figura 4-43 <i>Pulldown</i> para análisis de la interacción entre PfMyoB recombinante y la proteína MTIP nativa de un extracto de esquizontes.	101
Figura 4-44 <i>Far western blot</i> de ensayo de competencia de las proteínas recombinantes PfMyoB y PfMyoA por la interacción con MTIP.	103
Figura 4-45 Intensidades relativas de las bandas de los ensayos de competencia de PfMyoB y PfMyoA por <i>far western blot</i>	103
Figura 4-46 <i>Far western blot</i> de ensayo de inhibición de la interacción de las proteínas recombinantes PfMyoB y MTIP con péptidos sintéticos.	105
Figura 4-47 Árbol filogenético de las secuencias de proteínas con motivos EF-Hand de <i>P. falciparum</i>	108
Figura 4-48 Alineamientos pareados de secuencias de cadenas livianas de <i>P. falciparum</i>	110
Figura 4-49 Modelos tridimensionales de cadenas livianas de <i>P. falciparum</i>	111

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1 Diversidad funcional de las miosinas.	17
Tabla 3-1 Anticuerpos comerciales usados	30
Tabla 3-2 Características de los vectores de expresión usados	31
Tabla 3-3 Fragmentos de PCR generados en este trabajo para producir las proteínas recombinantes del mismo nombre	34
Tabla 3-4 Secuencia de los péptidos sintéticos diseñados.	51
Tabla 4-1 Valores de calidad obtenidos para la evaluación de las estructuras 3D de PfMyoA y PfMyoB.	60
Tabla 4-2 Proteínas identificadas del ensayo de IP con anticuerpos AbP1 y AbP2 de extractos de esquizontes	89
Tabla 4-3 Resultado de cálculo de interacción usando PatchDock entre motivos IQ e IQ putativo de PfMyoB y MTIP.....	92
Tabla 4-4 Resultado de búsqueda de cadenas livianas de miosina sobre el genoma de <i>P. falciparum</i> por medio de HMM.	107

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
g	gramo
x g	gravedades
°C	grado centígrado
h	hora
kDa	kiloDalton
l	litro
μ	micro
m	mili
min	minuto
M	molar
U	unidades de enzima
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo

Abreviaturas

Abreviatura	Término
aa	Aminoácido
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CaM	Calmodulina
DAB	Diaminobencidina
GST	Glutación-S-Transferasa
HIS	Histidinas X 6
HMM	Modelo Oculto de Markov
MBP	Proteína de union a Maltosa
MTIP	Myosin Tail domain Interacting Protein
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Polifluoruro de Vinilindeno
RT-PCR	Retrotranscripción-PCR
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	<i>Buffer</i> salino de Tris
WB	Western Blot

Introducción

Una de las enfermedades infecciosas más devastadoras a nivel mundial es la malaria con 200 a 300 millones de casos y con cerca 500 mil muertes al año (WHO 2015). Dentro de las especies de *Plasmodium* que son responsables de infectar humanos las más importantes son *P. falciparum* y *P. vivax*. Estos parásitos tienen ciclos de vida que son una secuencia de estados replicativos e invasivos en hospederos: uno vertebrado, en el que el parásito infecta células de hígado y luego pasa al torrente sanguíneo estableciéndose en los glóbulos rojos; y otro en el mosquito en donde el parásito atraviesa la pared del intestino y llega hasta las glándulas salivares. En todos los estados invasivos el parásito está equipado con un repertorio de productos génicos compartidos y particulares que le permiten ser un exitoso organismo de vida intracelular obligada.

Una estrategia para controlar la malaria es disminuir la transmisión, lo cual se logra reduciendo las poblaciones de los mosquitos anófeles a través del uso de mosquiteros impregnados con insecticidas y de la fumigación de las viviendas con insecticidas tipo DDT o piretroides (WHO 2015). Sin embargo, en algunas zonas del mundo los mosquitos han desarrollado resistencia a estos compuestos haciendo complicado su manejo. La segunda estrategia de control es la eliminación del parásito por medio del tratamiento quimioterapéutico de personas infectadas; pero, también los parásitos han desarrollado resistencia a estos medicamentos antimaláricos (Antony y Parija, 2016). Sumando todo lo anterior a la inexistencia de una vacuna de uso clínico, nos enfrentamos a un panorama en el que tratar y prevenir la malaria no es un asunto fácil.

Con el propósito de encontrar nuevos blancos quimioterapéuticos para contrarrestar la enfermedad, en los últimos años se han generado grandes avances en el entendimiento de la biología celular y molecular del parásito *P. falciparum*. Estos avances se reflejan en un significativo desarrollo y disponibilidad de técnicas genéticas, moleculares y químicas para estudiar la enfermedad. Por ejemplo, la disponibilidad de las secuencias genómicas completas de *P. falciparum* (plasmodb.org), así como de bases de datos de expresión de mensajeros, permiten el análisis sistemático de la función de genes con el fin de priorizar y evaluar candidatos a blancos quimioterapéuticos y vacunas. Uno de los campos de

estudio de la biología básica del parásito que ha tomado una atención importante en los últimos años es el proceso de invasión de células hospederas. En este proceso están involucradas proteínas del parásito que activamente se coordinan en una maquinaria denominada glideosoma la cual genera movimiento por medio de un sistema motor de actina y miosina (Koch y Baum, 2016).

La invasión de *P. falciparum* a glóbulos rojos es central en el desarrollo de la enfermedad y por eso las proteínas involucradas en este proceso son un blanco de estudio muy atractivo. Dentro de estas proteínas envueltas en la invasión nos interesamos específicamente en el estudio de las miosinas. Las miosinas son motores moleculares eucarióticos dependientes de actina que tienen un amplio rango de funciones que incluyen la contracción muscular, participación en la visión, en la audición, en la movilidad celular y en la invasión de células hospederas como es el caso de los parásitos apicomplexa (Heintzelman, 2015). En el genoma de *P. falciparum* se han identificado un grupo de proteínas de tipo miosina, de las cuales la denominada miosina A (PfMyoA) ha sido la más estudiada y de la que se sospecha, participa en invasión del parásito a la célula hospedera. Sobre las restantes miosinas no hay mayor información, sin embargo, existe evidencia de nuestro laboratorio que sugiere que una segunda miosina llamada miosina B (PfMyoB) podría tener una función redundante con PfMyoA, dado que su tamaño, secuencia y patrón de expresión tanto a nivel de ARNm como de proteína, son similares. Por esto, el objetivo del trabajo fue contribuir a la caracterización molecular de la miosina B de *P. falciparum* (PfMyoB) y hacer un acercamiento a la función que esta proteína podría cumplir en el parásito y a su posible redundancia con la miosina A.

1. Marco teórico

1.1 La malaria

La malaria es una enfermedad que en humanos puede ser causada por cinco especies de parásitos pertenecientes al género *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*, todas transmitidas por la picadura de los mosquitos hembra del género anófeles. Se han descrito cerca de 400 especies diferentes de mosquitos anófeles, pero solo 30 de estos son vectores de importancia (WHO, 2015). *Plasmodium knowlesi* también causa malaria en monos que habitan el sudeste asiático y se sugiere que la infección en humanos puede ocurrir por transmisión zoonótica (Millar y Cox-Singh, 2015).

Por décadas, el número de casos de malaria estuvo en aumento constante, sin embargo, en los últimos cinco años las estadísticas muestran una notable disminución. El número de casos de malaria se redujo de un estimado de 262 millones a nivel mundial en el 2000, a 214 millones en el 2015, un descenso del 18%. El número de muertes por malaria a nivel mundial cayó de un estimado de 839 000 en el 2000, a 438 000 en el 2015, un descenso del 48%. A pesar de esta tendencia mundial a la disminución, la malaria sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública que afecta primordialmente a países en vía de desarrollo en África, Asia y Latinoamérica (WHO, 2015).

En Colombia, la malaria es una enfermedad endémica en gran parte del territorio nacional, en áreas localizadas por debajo de los 1500 m s.n.m. En el país, aproximadamente 12 millones de personas habitan en zonas de riesgo de transmisión de esta enfermedad, para el año 2015 se registraron más de 55000 casos por malaria (Figura 1-1). En el país, las especies más frecuentes en zonas endémicas son *P. vivax* y *P. falciparum*; la transmisión de *P. malariae* ocurre en focos dispersos a lo largo de la costa Pacífica, y no existe transmisión de *P. ovale*. También pueden ocurrir casos de infecciones mixtas, definidas como infecciones simultáneas por dos especies,

usualmente *P. vivax* y *P. falciparum*. Para la semana epidemiológica No. 41 del 2016 se han reportado en Colombia más de 71000 casos de malaria, incluidos los casos del brote que se registró en el departamento de Chocó en abril, lo que prendió las alarmas de las autoridades de salud del país ya que se presentaron más de 30 muertes y posteriormente un nuevo brote en octubre con más de 25 muertos que a la fecha sigue sin resolverse (SIVIGILA, 2016).

P. falciparum transmite la forma más letal de la malaria, cerca del 90% de las muertes son causadas por esta especie. *Plasmodium vivax* tiene una mayor distribución geográfica que *P. falciparum* porque puede sobrevivir en el mosquito anófeles a temperaturas más bajas y soportar altitudes mayores, además tiene un estado latente en el hígado llamado hipnozoíto que puede activarse meses después de la infección inicial, causando una recaída de los síntomas. Así como ocurre con algunas poblaciones en África, en el pacífico colombiano el riesgo de infecciones con *P. vivax* es bajo debido a que algunos individuos no tienen el gen Duffy, este gen produce una proteína necesaria para que *P. vivax* pueda invadir células rojas de la sangre (Langhi y Bordin, 2006).

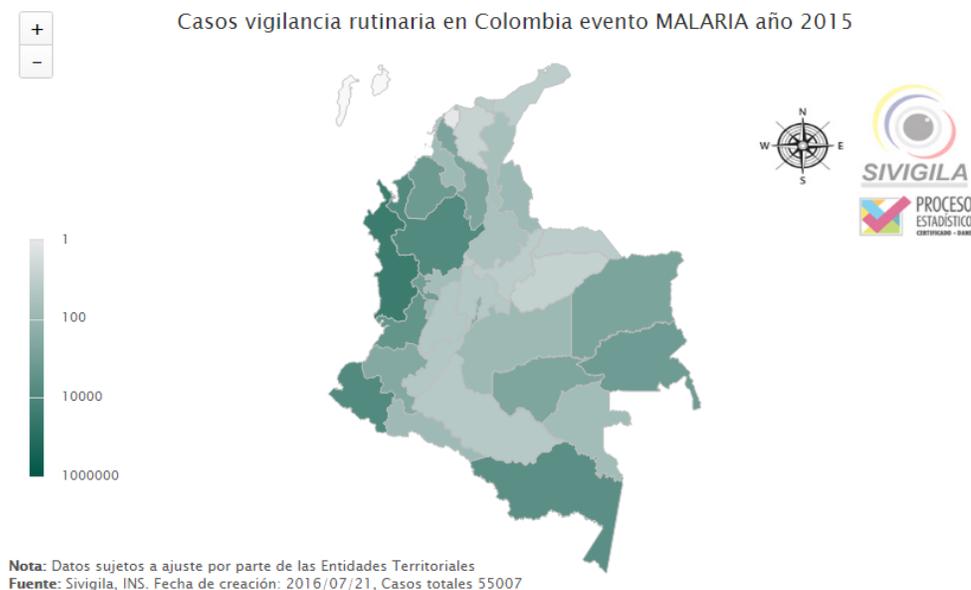


Figura 1-1 Mapa de distribución de los casos de malaria en Colombia en el año 2015.
Fuente: SIVIGILA, 2015.

La infección con malaria puede tener una presentación sintomática muy variada: puede ser asintomática, con síntomas muy leves y hasta una severa enfermedad que puede

llevar a la muerte. La enfermedad generalmente inicia con escalofrío o sensación de frío intenso y permanente, seguido de temblor, la persona enferma permanece con estos síntomas por una hora aproximadamente y posterior a esto inicia un período de fiebre alta que puede llegar a 41 grados centígrados, hasta que desaparece el escalofrío. El aumento de temperatura puede durar hasta 8 horas, este período puede acompañarse de otros síntomas como dolor de cabeza intenso, dolores musculares, dolores articulares, ganas de vomitar, vómito y malestar general, que se repiten cada 48 horas en el caso de *P. vivax* y cada 72 horas en el caso de *P. falciparum*. El diagnóstico definitivo se hace mediante la visualización del parásito en muestras de sangre o la detección de antígenos parasitarios mediante pruebas rápidas (PAHO, 2015).

Todos los síntomas de la enfermedad son causados por los parásitos del estado sanguíneo. Cuando el parásito se desarrolla en los eritrocitos se alimenta de hemoglobina y produce varias sustancias de desecho, una de ellas es la hemozoína que se acumula formando cristales. Cuando el parásito cambia de estado rompe el eritrocito, liberándose estas sustancias tóxicas que estimulan a los macrófagos, lo cual puede producir fiebre, temblores, anemia y otros patofisiologías asociadas con la malaria. La malaria causada por *P. falciparum* puede producir la complicación más severa de la enfermedad, conocida como malaria cerebral, que se atribuye a los eritrocitos infectados con trofozoítos que pueden adherirse al endotelio vascular de la pared de los vasos sanguíneos del cerebro y está asociada con un altísimo riesgo de muerte (CDC, 2016).

Hasta la fecha no existe una vacuna contra la malaria, sin embargo, se usan dos tipos de intervenciones para prevenir y controlar la enfermedad: una es el control del vector y otra es la administración de fármacos. En la primera se reduce la transmisión del parásito de humanos a mosquitos y viceversa, por medio del uso de mallas o mosquiteros impregnados de insecticidas o por medio de la fumigación de los espacios habitacionales. En la segunda, la quimioterapia, se usan fármacos dependiendo del tipo de parásito que infecta, la región geográfica en la que se haya infectado el paciente y de otras condiciones propias de la persona. Estos fármacos pueden ser: cloroquina, atovaquona-proguanil (Malarone®), artemeter-lumefantrina (Coartem®), mefloquina (Lariam®), sulfadoxina-pirimetamina, amodiaquina, quinina, quinidina, doxyciclina (en combinación con quinina), clindamicina (en combinación con quinina) y artesunato (CDC, 2016). Adicionalmente, en algunas zonas de África se administra un tratamiento preventivo intermitente en mujeres embarazadas y niños con sulfadoxina-pirimetamina (WHO, 2015).

A pesar de que existen formas de controlar la malaria, esta enfermedad representa un problema muy difícil de prevenir porque algunas poblaciones de parásitos se han vuelto resistentes a los medicamentos, así como algunas poblaciones de mosquitos se han vuelto resistentes a insecticidas y se han expandido por todo el mundo.

1.2 Ciclo de vida de *P. falciparum*

Plasmodium pertenece al grupo de parásitos llamados *apicomplexa*, filum de eucariotas unicelulares de vida intracelular obligada, condición que les asegura una fuente de nutrientes permanente y evasión de respuesta inmune del hospedero. Estos parásitos son de importancia médica y veterinaria; entre ellos se cuentan *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Babesia*, *Isospora* y *Teileria* (Ménard, 2001). En varios estados de su ciclo de vida estos parásitos invaden células, se desarrollan y proliferan y su capacidad infecciosa es muy efectiva. La malaria se transmite mediante la picadura de hembras del mosquito anófeles infectadas que inyectan el parásito en el torrente sanguíneo del hospedero en la forma llamada esporozoíto, la cual migra rápidamente al hígado e invade hepatocitos. Cada esporozoíto que ha invadido se diferencia y se divide miles de veces mitóticamente formando merozoítos que se liberan en la sangre, en donde pueden invadir eritrocitos iniciando un ciclo de vida asexual. El ciclo de vida asexual de *Plasmodium* comienza cuando un merozoíto invade un glóbulo rojo, allí se alimenta de hemoglobina y se desarrolla en una forma llamada anillo, que posteriormente madura y adquiere la forma de trofozoíto. El trofozoíto sufre cambios metabólicos importantes y después de múltiples divisiones nucleares se convierte en esquizonte. En este estado el parásito produce membranas y orgánulos que son distribuidos entre las células hijas (merozoítos), las cuales finalmente se liberan y quedan disponibles para invadir nuevos eritrocitos (Figura 1-2).

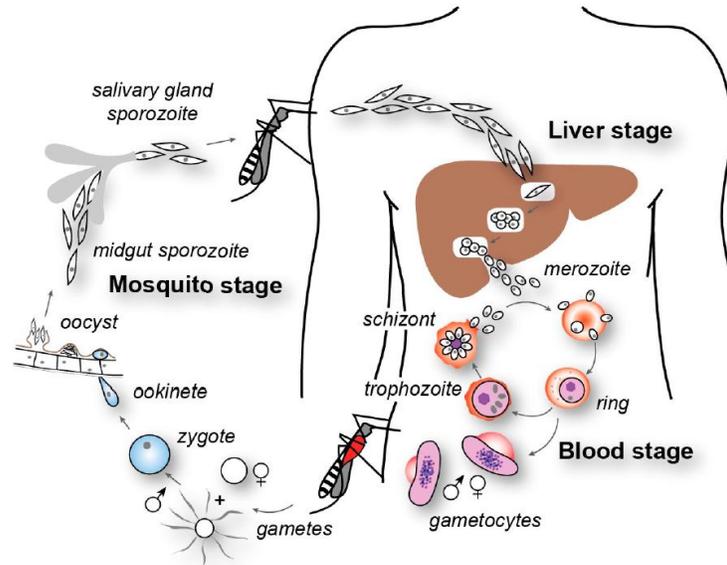


Figura 1-2 Diagrama del ciclo de vida del parásito de la malaria.
Tomado de Cowman et al. 2012.

Las formas invasivas de *P. falciparum* (ookinetos, esporozoitos y merozoitos) reciben el nombre genérico de zoitos y tienen en común una polarización celular (en donde son claramente distinguibles el polo anterior o apical y el polo posterior) y la presencia de orgánulos apicales que secretan su contenido durante la invasión celular (Ménard, 2001). Los zoitos mantienen su forma gracias a un grupo de microtúbulos (Figura 1-3) anclados al anillo polar que recorren longitudinalmente al parásito debajo de la denominada “película”, la cual consiste de la membrana plasmática y dos membranas internas llamadas complejo interno de membranas (IMC). El complejo apical tiene roptrias y micronemas, que son orgánulos que liberan proteínas cuando el parásito se adhiere y penetra la célula hospedadora. Finalmente, cuando el parásito entra en la célula forma una invaginación denominada vacuola parasitófora, que le permite crecer y proliferar dentro de la célula hospedera sin fusionarse con lisosomas o endosomas (Cowman y Crabb, 2006).

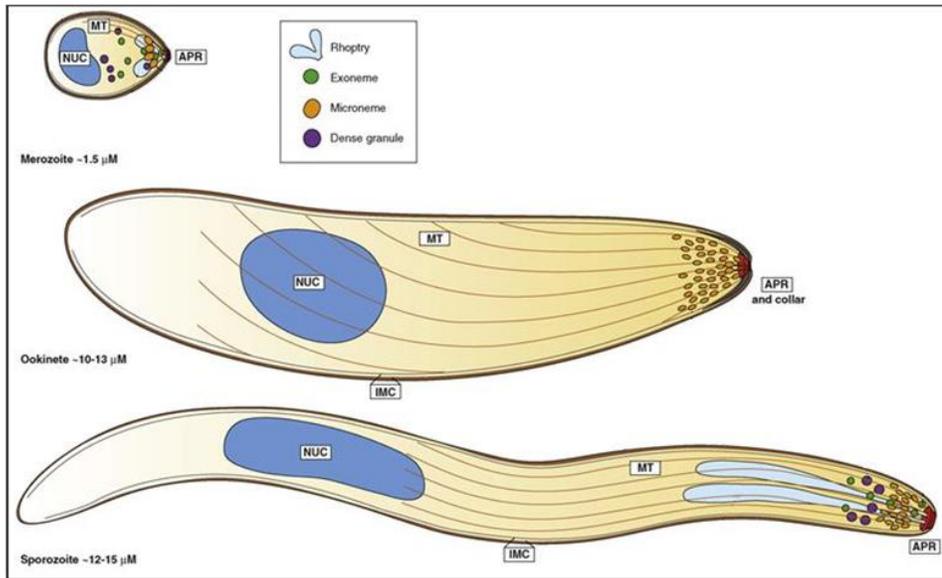


Figura 1-3 Esquema de las formas invasivas de *Plasmodium falciparum* (a escala). NUC núcleo, complejo interno de membranas (IMC), microtúbulos subpelliculares (MT) y anillos polares apicales ricos en tubulina (APR). Modificado de Baum et al. 2008.

1.3 Miosinas

La mayoría de los movimientos que realizan las células son llevados a cabo por los motores moleculares. Estos motores son complejos de proteínas coordinados en una maquina molecular encargados de transportar orgánulos (y otras cargas en la célula), de la contracción muscular, el movimiento flagelar, la mitosis, entre otras muchas funciones. Existen tres diferentes clases de motores: basados en kinesina, en dineína y en miosina (Hammer y Sellers, 2011).

Las miosinas son una familia de proteínas muy diversa (figura 1-4), que pueden moverse a lo largo de filamentos de actina utilizando energía liberada de la hidrólisis de ATP.

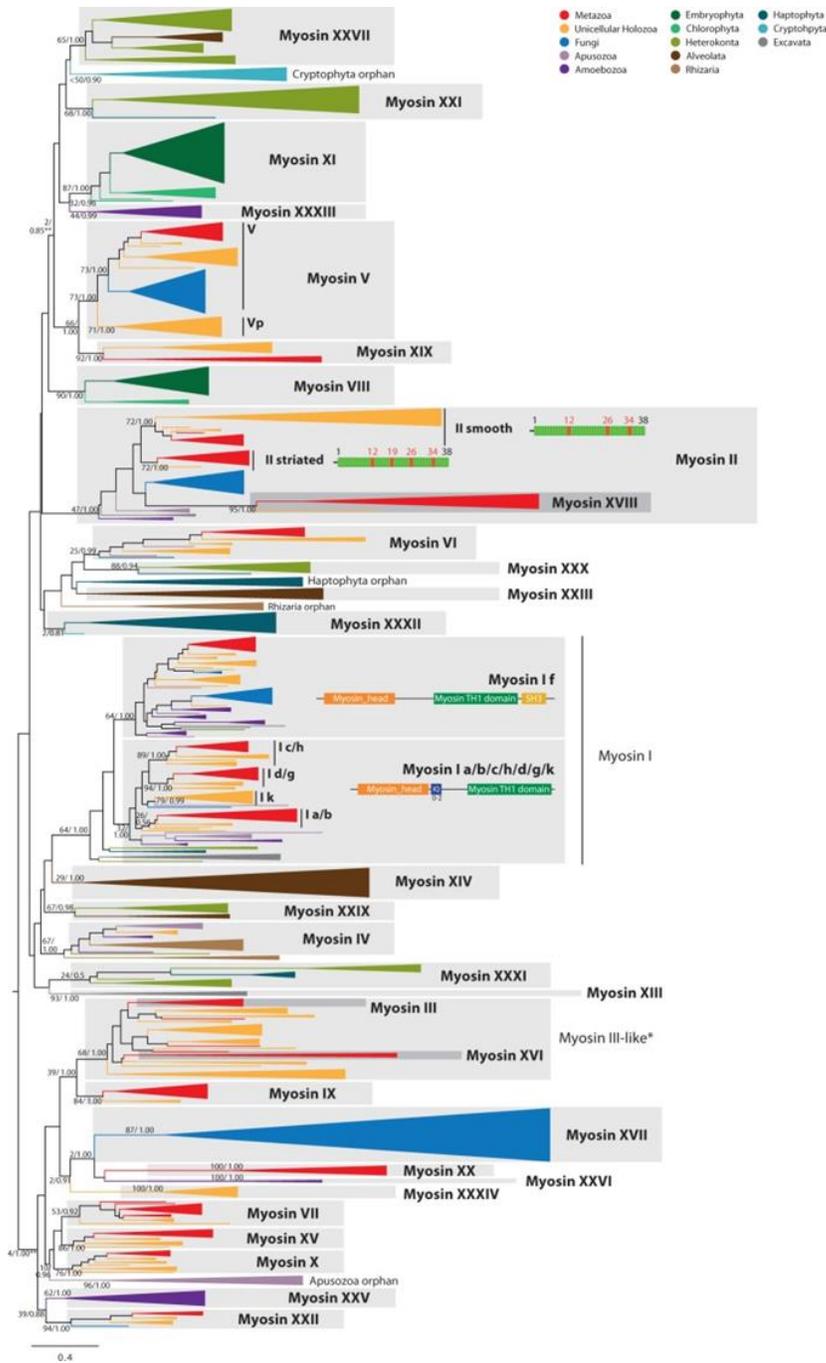


Figura 1-4 Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con las secuencias del dominio motor de las miosinas. Se utilizaron 725 secuencias en el alineamiento múltiple. Se muestran las 31 clases de miosinas y el código de color correspondiente con los diferentes taxones mostrados en la parte superior derecha. Tomado de Sebé-Pedrés et al. 2014

Las miosinas participan en diferentes funciones celulares como la citoquinesis, adhesión celular, movilización de ARNm, endocitosis, exocitosis, movimiento de orgánulos y movilidad celular. Algunas miosinas se adaptan para transportar cargas y otras tienen como función servir de sensores de tensión. Esto ocurre porque tienen diferentes propiedades cinéticas y adaptaciones estructurales (Odrionitz y Kollmar, 2007). Las miosinas están compuestas de tres dominios distintos: cabeza, cuello y cola:

- La “cabeza” o dominio motor, está ubicada en el N-terminal y su secuencia es altamente conservada en todas las miosinas. Este dominio consta de alfa hélices y algunas hojas beta, tiene un sitio de unión a ATP que consiste de un P-loop característico de los sitios activos de las ATPasas, este motivo estructural se identificó inicialmente en proteínas de unión a GTP que tienen funciones en algunas rutas de señalización intracelular. La cabeza también tiene un sitio de unión a actina que se abre y cierra en respuesta a la unión con ATP. Adicionalmente tiene un dominio denominado convertidor que es el sitio de unión con el brazo palanca C-terminal, este dominio tiene una estructura de tipo bisagra que amplifica los cambios en la estructura del dominio motor inducido por la entrada y la hidrólisis del ATP (figura 1-5) (Holmes, 2008).

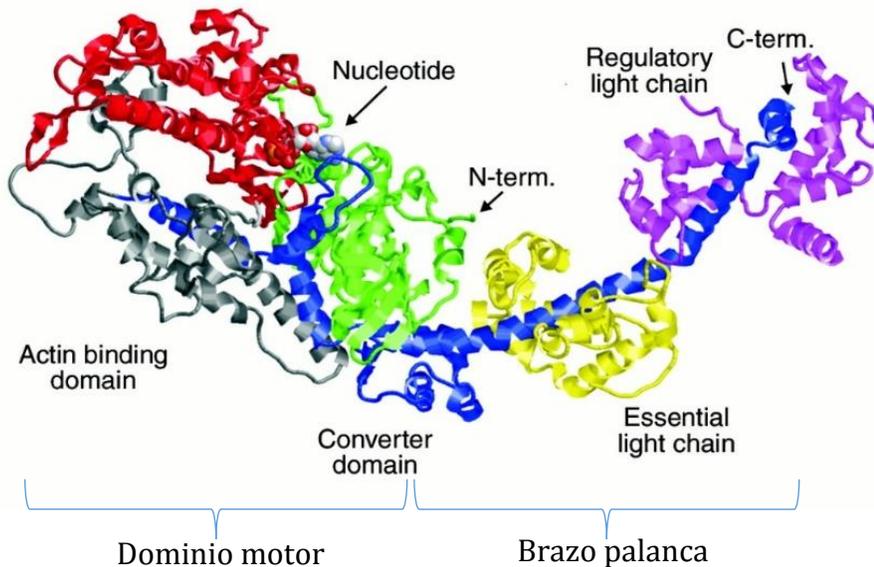


Figura 1-5 Modelo de cintas de una miosina clase II. Se muestran los dominios de cabeza (motor) y cuello (brazo palanca). Tomado de Rüegg et al. 2002.

- El “cuello” o brazo palanca, es un dominio de alfa hélice de longitud variable, contiene motivos llamados IQ cuya secuencia consenso es A-X[3]-I-Q-X[2]-F-R-X[4]-K-K (Rhoads y Friedberg, 1997). Allí se puede unir calmodulina (CaM) u otras proteínas de tipo cadena liviana de miosina que le sirven a la miosina como un punto de palanca para unir y mover el último dominio denominado “cola”.
- La “cola” es una extensión de alfa hélice con la capacidad de unir una variedad de cargas como proteínas, ácidos nucleicos, vesículas, orgánulos, entre otros. Este

dominio determina la especificidad funcional del motor (Hartmann et al., 2011) y es extremadamente variable entre las diferentes miosinas, en longitud, secuencia, composición de motivos y organización (Figura 1-6).

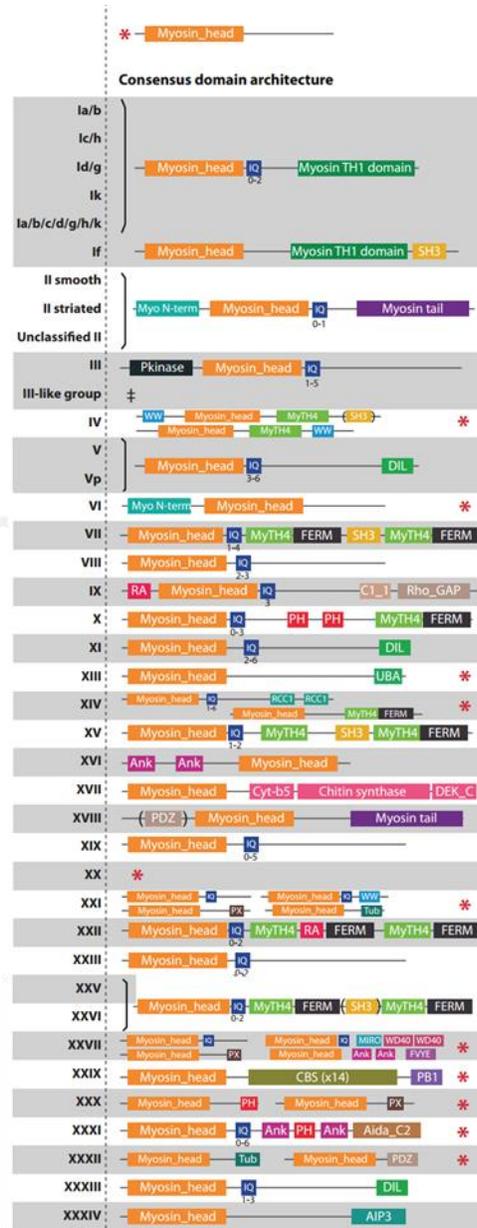


Figura 1-6 Diagrama que muestra la arquitectura de los dominios y motivos de las secuencias de proteínas representativas de las 31 clases de miosinas. No se incluyen las miosinas huérfanas. El asterisco rojo indica que dentro de algunas clases de miosina se encuentran secuencias con sólo el dominio de cabeza o motor. Tomado de Sebé-Pedrós et al. 2014.

Por medio de estudios de secuencia y análisis filogenéticos del dominio de “cabeza”, las miosinas se agrupan en clases. Se reconocen actualmente cerca de 31 clases de miosinas (Sebé-Pedrós et al., 2014) (Figura 1-4). Esta clasificación ha sufrido muchos cambios a través del tiempo, porque se han descubierto más secuencias, especialmente

aquellas de organismos cuyo genoma no había sido secuenciado. Dentro de la clasificación de las miosinas se encuentran las llamadas miosinas huérfanas que corresponden a secuencias encontradas en un solo organismo, y que en algunos casos corresponden a eucariotes inferiores o que simplemente están pendientes por clasificar (Sebé-Pedrés et al., 2014). Se han encontrado genes que codifican para miosinas en casi todos los eucariotes, a excepción de *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* y el alga roja *Cyanidioschyzon merolae*; en contraste, el genoma humano y el del alga unicelular *Emiliania huxleyi* tienen la mayor cantidad de genes de miosina reportados, con 39 y 52 respectivamente (Mooseker y Foth, 2008; Sebé-Pedrés et al., 2014).

Las cadenas livianas de miosina son miembros de la familia de CaMs y genes relacionados con CaM y se asocian de forma no covalente con los motivos IQ, localizados en el dominio de cuello de las miosinas. El número de cadenas livianas que puede unir una sola cadena pesada de miosina puede variar entre 1 y 17 (Heissler y Sellers, 2014). Se necesitan 2 cadenas livianas para la integridad estructural de la miosina, ellas tienen funciones regulatorias en la actividad mecanoenzimática de ese complejo proteico. Las miosinas de la clase II forman filamentos y se han llamado históricamente “convencionales”, fueron las primeras miosinas aisladas de músculo, pero luego se descubrió que estaban presentes en la mayoría de células eucariotas. Estudios estructurales y bioquímicos han mostrado que cada miosina II tiene 2 motivos IQ y se asocian exclusivamente con dos cadenas livianas referidas como cadena liviana esencial (ELC) y cadena liviana regulatoria (RLC). La ELC se une al motivo IQ más cercano al dominio motor y RCL se une al motivo IQ adyacente (Figura 1-5). Las miosinas de todas las otras clases diferentes a la II se denominan “no convencionales”, ellas no forman filamentos y exhiben una gran diversidad en sus dominios de cola que determinan su localización y la interacción con proteínas o cargos. El número de motivos IQ encontrados en las miosinas no convencionales es variable y no siempre se conserva dentro de una clase. La composición de cadenas livianas de algunas miosinas no convencionales se ha determinado experimentalmente por medio de copurificación acoplada con análisis inmunológicos y proteómicos y en la mayoría de ellas la CaM es la cadena liviana, en algunos casos, de forma exclusiva (Heissler y Sellers, 2014). Las cadenas livianas son reguladas por unión de Ca^{2+} y otros cationes, también por fosforilación y mediante ella se comunican alostéricamente con la cadena pesada de miosina. Adicionalmente, las cadenas livianas pueden mediar la asociación de una

miosina con una proteína de unión para formar un complejo ternario o determinar la localización intracelular de la miosina (Heissler y Sellers, 2014). Se ha visto que algunas mutaciones en genes que codifican para cadenas livianas causan eventos de splicing alternativo del pre-ARNm y niveles de expresión aberrante de ellas mismas y están relacionados con condiciones patológicas en humanos (Heissler y Sellers, 2014). Un ejemplo de ellas es la subregulación post-transcripcional del gen de cadena liviana de miosina MYL7 en el corazón de ratones quiméricos con un cromosoma 21 extra humano, condición que también se ha encontrado en tejido cardíaco de neonatos humanos con síndrome de Down, y se asocia con anomalías del desarrollo en estados tempranos de la cardiogénesis. La expresión alterada y la subregulación asociada del nivel de proteína juega un papel clave en la enfermedad congénita cardíaca observada en pacientes con síndrome de Down (Nishigaki et al., 2002).

La figura 1-7 muestra la estructura de algunas miosinas, la miosina II y V son dímeros, que se asocian por medio de los dominios de cola para formar una estructura *coiled coil* de tipo bastón; como la miosina VI no tiene esta estructura en la cola, funciona como un monómero. Las tres miosinas mostradas en la figura 1-7 difieren en el número y el tipo de cadenas livianas unidas a la región de cuello. Las cadenas livianas de las miosinas V y VI son calmodulinas, la miosina tipo II tiene dos diferentes tipos de cadenas livianas ELC y RLC (Kneussel y Wagner, 2013).

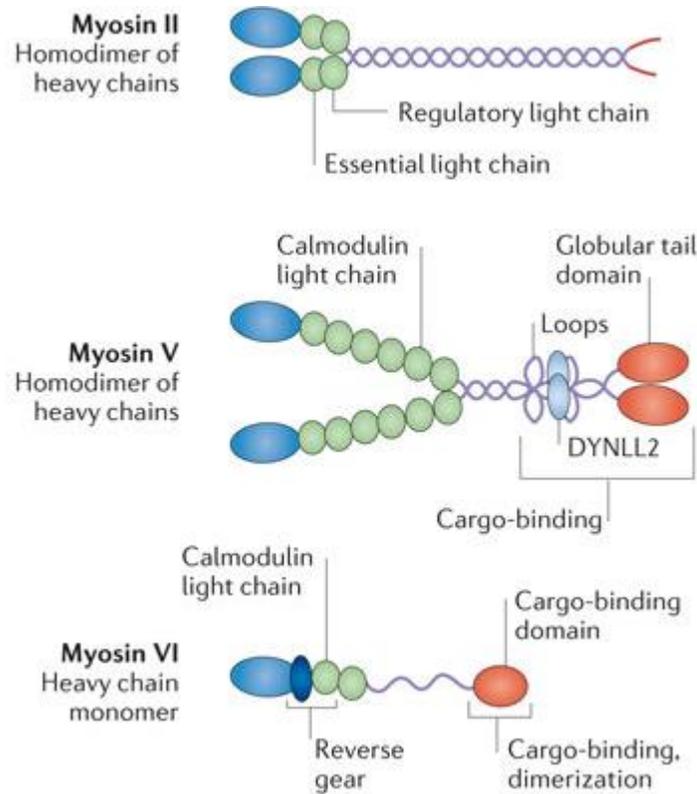


Figura 1-7 Estructura de algunas miosinas.

En azul se presenta el dominio motor, en verde las cadenas livianas unidas a la región de cuello, en púrpura la región *coiled coil* y en rojo, la región el C-terminal. En el caso de la miosina V se muestran proteínas de unión a la región de cola (en azul claro). Tomado de Kneussel y Wagner, 2013.

1.3.1 Mecanismo molecular del motor

Las miosinas convierten la energía química en movimiento ya que el dominio de cabeza es una ATPasa especializada que es capaz de acoplar la hidrólisis de ATP con el desplazamiento. Una característica de esta actividad ATPasa es que es activada por actina, esto asegura que la miosina actúe a su máxima capacidad; en experimentos con miosina en solución se ha probado que en ausencia de actina la hidrólisis de ATP ocurre muy lentamente. Las miosinas pueden realizar ciclos de movimiento de acuerdo con la siguiente secuencia de eventos que se muestra en la figura 1-8: en ausencia de ATP o en la presencia de ADP, la cabeza de miosina se puede unir a la actina en un estado de "rigor" o de rigidez (pasos 1 y 2). Cuando el ATP se une, se abre una hendidura en la cabeza interrumpiendo el sitio de unión a actina y debilitando la interacción con ella (paso 3). Seguidamente la miosina hidroliza el ATP y causa un cambio conformacional en la

cabeza que se mueve a una nueva posición, en dirección al extremo positivo (+) del filamento de actina, uniéndose a ella de nuevo. Un grupo fosfato se disocia del sitio de unión a ATP y la miosina sufre otro cambio conformacional que se denomina el “power stroke” o la carrera de trabajo, en donde la miosina vuelve a su estado de “rigor” (pasos 4 y 5) (Hammer y Sellers, 2011).

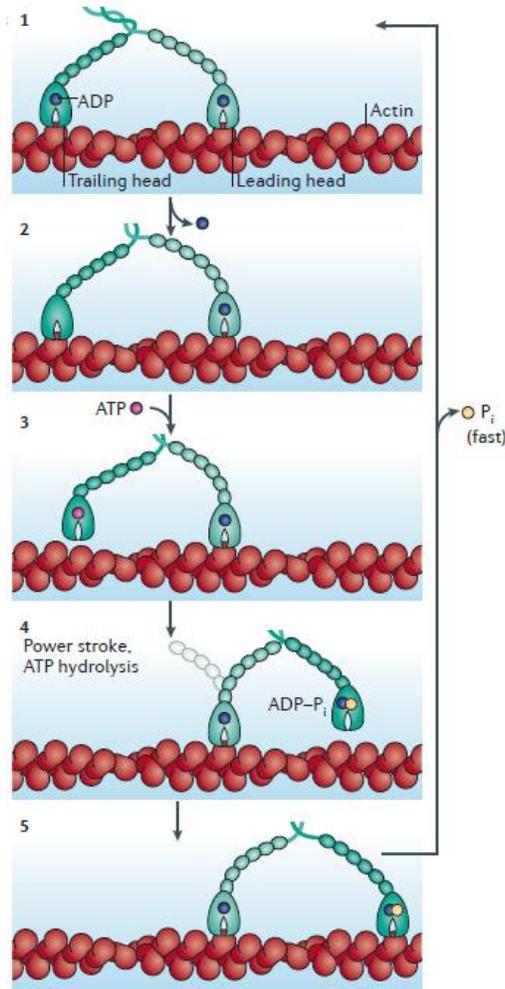


Figura 1-8 Esquema de un ciclo de movimiento de una miosina clase V sobre un filamento de actina. Tomado de Hammer y Sellers, 2011.

Este ciclo tiene un nivel de amplificación superior que involucra la comunicación entre el cambio conformacional en el sitio activo de la cabeza y la cola mediante un amplificador mecánico. Este amplificador es la alfa hélice del cuello estabilizada por las cadenas livianas que se unen a él. Estudios de estructuras cristalinas muestran que esta estructura actúa como una palanca que se mueve en un ángulo de 70° (Figura 1-9). Este movimiento de palanca es la consecuencia del llamado “power stroke”, de aquí que

miosinas con cuellos largos puedan realizar pasos más largos y más rápidos (Schliwa y Woehlke, 2003). Las miosinas de clase VI son la excepción con respecto a la dirección de movimiento, ya que lo hacen hacia el extremo negativo (-) del filamento de actina, todas las demás miosinas lo hacen hacia el extremo positivo (Cramer, 2000).

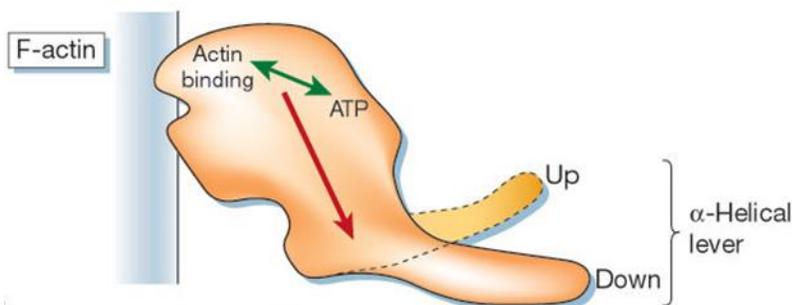


Figura 1-9 Esquema que muestra cómo el cambio conformacional en el dominio motor conduce al movimiento del amplificador mecánico o palanca alfa hélice (dominio de cuello-cola). Tomado de Schliwa y Woehlke 2003.

1.3.2 Funciones de las miosinas

Las miosinas convencionales incluyen a las miosinas que participan en la contracción del músculo cardíaco, a las responsables de la contracción del músculo liso y a otras como las miosinas de las plaquetas encargadas del transporte intracelular y la migración celular. Las miosinas no convencionales tienen funciones entre las que se cuentan el transporte de cargas a través de microfilamentos o vías de citoesqueleto; estos cargos pueden ser macromoléculas como ARNm u orgánulos como por ejemplo, mitocondrias. Otra función es el anclaje y fijación de organelos como Golgi o melanosomas, de igual forma, las miosinas tienen un papel en la resistencia a la deformación de las membranas celulares como respuesta a la tensión mecánica. Además de llevar a cabo su función motora sobre filamentos de actina, las miosinas también participan en la organización misma de la actina, afectando su distribución y estructura (Sirotkin et al., 2005). Otro de los papeles importantes que han sido propuestos para las miosinas no convencionales es el de la generación de la fuerza para el movimiento celular y para la adhesión como es el caso de las miosinas clase XIV que se encuentran los parásitos apicomplexa (Hartman et al., 2011). La tabla 1-1 resume las funciones que se han propuesto para algunas miosinas destacando la clase a la que pertenecen.

Tabla 1-1 Diversidad funcional de las miosinas.

Función	Miosina Clase
Generación de tensión	I, II, VII, VIII
Movimiento celular / Adhesión	I, II, V, VI, VII, X, XIV
Endocitosis	
Mediada por clatrina	I, II, VI
Macropinocitosis	I, VI
Fagocitosis	I, II, VI, VII, X
Exocitosis	I, II, V, VI
Movimiento de orgánulos	V, VII, XI, VII
Localización/transporte de ARNm	V
Comunicación con el citoesqueleto	V, X
Transducción de señales	I, III, V, VI, VII, IX, X, XV, XVI
Polaridad celular	I, VI
Función/ transcripción nuclear	I, VI, XVIII

Tomado de Mooseker y Foth, 2008.

1.3.3 Miosinas de *Plasmodium*

Dentro de la clasificación de miosinas realizada por Sebé-Pedrós y col. en 2014, las miosinas de los *apicomplexa* se sitúan dentro de las clases XIV, XXII y XXIII. Durante la invasión a una célula huésped, éstos parásitos exhiben un movimiento denominado *gliding*, el cual depende críticamente de una miosina de clase XIV. Para el caso de *Toxoplasma gondii* esta miosina es TgMyoA, cuya participación en el “gliding” ha sido contundentemente demostrada de manera experimental. Muchos parásitos apicomplexa tienen un ortólogo de esta proteína pero solo para algunos se ha estudiado su función. En *P. falciparum* se han encontrado seis genes que codifican para miosinas, nombrados de la A a la F. Las proteínas codificadas por estos genes se han nombrado y clasificado de la siguiente forma: PfMyoA, PfMyoB y PfMyoE, pertenecen a la clase XIV; PfMyoC a la clase XXII y PfMyoD y PfMyoF a la clase XXIII (Foth et al., 2006; Sebé-Pedrós et al., 2014).

- PfMyoA

La primera miosina descubierta en *Plasmodium* fue MyoA, esta proteína se identificó en ensayos de inmunoblots sobre extractos de parásitos de *P. falciparum* con anticuerpos monoclonales reactivos contra miosina de músculo de conejo (Webb et al., 1996; Forero

y Wasserman, 2000) y se sugirió que estaba implicada en la invasión celular por su homología con TgMyoA (Pinder et al., 1998).

PfMyoA es una proteína pequeña comparada con las demás miosinas de *P. falciparum*, tiene 818 aminoácidos (aa) y un peso molecular de 92.3 kDa; se expresa en las formas invasivas del parásito: en esquizontes tardíos, en merozoítos y en ooquinetes (Pinder et al., 1998). En *P. yoelii*, por medio de experimentos de doble híbrido usando como “carnada” la cola de MyoA, se encontró una proteína de interacción de 24 kDa y fue nombrada MTIP (Myosin Tail Domain Interacting Protein) (Bergman et al., 2003). En ese estudio se encontró que las dos proteínas se localizaban en el IMC y que solo eran necesarios 14 aa del extremo C-terminal de MyoA para que la interacción pudiera ocurrir. Posteriormente se obtuvo la estructura cristalina del complejo MyoA-MTIP de *P. knowlesi* (Bosch et al., 2006) y se determinó que la interacción ocurría a través de una zona de bolsillos hidrofóbicos del dominio C-terminal de MTIP y la cola de MyoA. En otro estudio se observó que MTIP se expresaba en merozoítos de *P. falciparum* y se confirmó su localización celular periférica junto con PfMyoA; también se realizaron experimentos de movilidad *in vitro* de PfMyoA sobre actina y se comprobó que esta proteína puede moverse sobre un sustrato sólido (Green et al., 2006). A través de un estudio de mutagénesis se encontró que una histidina y una lisina de PfMyoA eran indispensables en la unión, adicionalmente, se obtuvo la estructura cristalina del complejo para *P. falciparum* (Bosch et al., 2007). También se ha establecido que en MTIP son importantes y necesarias dos fosforilaciones para la estabilidad de la interacción (Thomas et al., 2010; Douse et al., 2012) y se propusieron varias moléculas inhibitoras que pueden bloquear esta unión (Kortagere et al., 2010; Douse et al., 2015). Este complejo constituye un blanco potencial para el diseño de antimaláricos ya que su inhibición podría bloquear la invasión e interrumpir el ciclo de vida del parásito.

El motivo en la secuencia de la cola de PfMyoA involucrado en la interacción se encuentra ubicado en el extremo C-terminal (residuos 803 a 818, NLQLAQAYFRKYKYI) y ha sido llamado motivo IQ no convencional, ya que estrictamente no cumple con la secuencia consenso de los IQ (Bosch et al., 2007). Puesto que los motivos IQ son la marca que caracteriza el dominio de cuello, la proteína no tiene dominio de cola en el sentido estricto. Sin embargo, la literatura tradicionalmente ha llamado “cola” a la región C-terminal de PfMyoA, por eso, en este texto se usará el término “cola” para referir al extremo C-terminal de las miosinas PfMyoA y PfMyoB. Así mismo, se postuló que

PfMyoA tiene un segundo motivo IQ aún más degenerado que el anterior (VSVIEAAILKHK), al cual podría unirse una cadena liviana (Farrow et al., 2011).

Actualmente sólo se conoce un reporte sobre el análisis funcional del gen de MyoA: en el estudio de Siden-Kiamos y col. de 2011, el gen de MyoA de *P. berghei* fue puesto bajo la influencia del promotor de AMA-1 (Apical Membrane Antigen) y se apagó su expresión durante la transmisión al insecto Anófeles, lo que generó que los ookinetos no completaran su ciclo de vida en el mosquito debido a que la invasión fue completamente abolida (Siden-Kiamos et al., 2011).

- PfMyoB

PfMyoB se reportó en un estudio en el 2003 de Chaparro y col., en donde se detectó la proteína en el estado de esquizonte únicamente y no en anillos ni en trofozoítos, en ese estudio se usó un anticuerpo policlonal específico producido en conejo usando como inmunógeno un fragmento de PfMyoB. Igualmente se detectó la proteína por inmunofluorescencia en merozoítos, sin embargo la técnica no ofreció una resolución que permitiera definir con claridad la localización subcelular de PfMyoB (Chaparro et al., 2003). PfMyoB es una proteína de 92.3 kDa, tiene un dominio de cabeza canónico, no se reconoce un cuello y tiene una cola muy pequeña similar a la de PfMyoA. También se sabe que el gen que codifica para PfMyoB es transcripcionalmente activo en todos los estados intraeritrocíticos del parásito y tiene un pico de expresión en esquizontes (Chaparro et al., 2005). Recientemente surgió un reporte de Yusuf y col. en donde estudiaron la proteína MyoB en *P. berghei*, *P. falciparum* y *P. knowlesi*. Este acercamiento lo hicieron marcando el gen de MyoB con un *tag* de GFP (Green Fluorescent Protein) y con HA (hemaglutinina), evaluando su expresión en los estados intraeritrocíticos y en todo el ciclo de vida en el caso de *P. berghei*. Ellos encontraron que la proteína se localiza discretamente en el lado apical de los zoítos y por medio de inmunoprecipitaciones hallaron una proteína de tipo cadena liviana asociada a MyoB (Yusuf et al., 2015).

- PfMyoC, D, E y F

La caracterización de la miosina PfMyoC se ha limitado al estudio de sus niveles de transcripción en algunos estados del ciclo intraeritrocítico del parásito. Esta miosina se transcribe principalmente en trofozoítos (Chaparro et al., 2005), tiene 2160 aa y un peso molecular teórico de 250 kDa. Por su parte, la miosina PfMyoD tiene 2274 aa, un peso molecular de 271 kDa, se localizó en el citoplasma de trofozoítos y esquizontes maduros, no se encontró en merozoítos libres y el pico de expresión de su mensajero se detectó en trofozoítos (Chaparro et al. 2005). Por otro lado, el gen que codifica para PfMyoE se transcribe en la fase final de la esquizogonia al igual que muchas de las proteínas involucradas en la invasión, mientras que PfMyoF se transcribe progresivamente durante el ciclo asexual (LeRoch et al., 2003; Chaparro et al., 2005). A través de estudios de interacciones proteína-proteína a gran escala se ha propuesto que la miosina PfMyoE interactúa con antígenos de superficie, proteínas hipotéticas que pueden estar involucradas en invasión y con precursores de la proteína de membrana del merozoíto MSP, que es indispensable en la invasión (LaCount et al., 2005). La proteína PfMyoE tiene 2153 aa y un peso molecular de 255 kDa mientras que PfMyoF tiene 1738 aa y un peso de 208 kDa.

1.3.4 El caso de *Toxoplasma*

Toxoplasma gondii fue el primer apicomplexa para el cual se estableció que la estrategia de movilidad e invasión dependía de un motor de actina y miosina propio del parásito (Dobrowolski y Sibley, 1997; Dobrowolski et al., 1997). Hasta hoy se han identificado 11 miosinas en *T. gondii* (TgMyoA a TgMyoK) (Foth et al., 2006) y entre ellas a TgMyoA como la miosina del *gliding* (Meissner et al., 2002). TgMyoA es una miosina pequeña (93 kDa) de la clase XIV que en el glideosoma interactúa de forma directa con dos cadenas livianas de miosina denominadas MLC1 (Myosin Light Chain 1) y ELC1 (Essential Light Chain 1) (Meissner et al., 2002; Nebel et al., 2011). En 2002, un *knockout* condicional de TgMyoA demostró que esta miosina era esencial para la movilidad y supervivencia de *T. gondii* (Meissner et al., 2002). Sin embargo, en un estudio posterior se aisló una línea de parásitos *knockout* para TgMyoA que pudo ser mantenida en cultivo permanentemente, lo cual sugirió la existencia de mecanismos alternativos de invasión y la potencial participación de otra miosina en este proceso (Andenmatten et al., 2013). En efecto, en

2014 se describió para *T. gondii* un segundo glideosoma (MyoC-glideosoma) en el que la miosina involucrada era TgMyoC, otro miembro de la clase XIV de miosinas. Las cadenas livianas de TgMyoC resultaron ser las mismas de TgMyoA (MLC1 y ELC1) y a diferencia del MyoA-glideosoma que se ubica en la periferia y en el polo apical del parásito, el MyoC-glideosoma se encontró en el polo basal. Adicionalmente, se encontró que en ausencia de TgMyoA, TgMyoC se reubicaba en la periferia del parásito y en la región apical, sugiriendo que TgMyoC puede reemplazar parcialmente a TgMyoA (Fréchal et al., 2014).

1.3.5 Invasión y movimiento

La invasión es un proceso fundamental para el desarrollo del parásito en los diferentes hospederos, la mayor parte de la investigación que tiene como fin encontrar una solución para contrarrestar la malaria se ha centrado en el estudio de las proteínas de superficie de merozoítos y esporozoítos de *P. falciparum*, su papel en la invasión de la célula huésped y su procesamiento antes, durante y después de la invasión (Beeson et al., 2016). Las proteínas más importantes en la invasión a glóbulos rojos están presentes en la superficie del merozoíto o están contenidas dentro de organelos conocidos como roptrias y micronemas en el ápice del merozoíto. Entre estas proteínas se encuentran la proteína de superficie del merozoíto (MSP), el antígeno apical de merozoíto (AMA), el homólogo de proteína de unión a reticulocito (Rh), el complejo de proteínas RON y los antígenos de unión a eritrocito (EBA). Algunas de estas proteínas son translocadas desde la zona apical hasta el extremo posterior y cumplen la función de adhesinas durante la invasión (Riglar et al., 2011). Se han hecho estudios en los cuales se inhibe la interacción de la proteína AMA1 con RON4, y el resultado es que los merozoítos no pueden invadir, lo cual demuestra el papel crítico que tiene la formación de este complejo durante la entrada al eritrocito (Lamarque et al., 2011).

El contacto inicial entre el merozoíto y el eritrocito es un paso crucial, ya que el parásito debe distinguir entre eritrocitos competentes para la invasión y otras células. Este contacto ocurre en algún punto de la superficie del parásito, luego hay una reorientación (figura 1-10) con el fin de que el extremo apical del parásito se contraponga con la membrana del eritrocito. Para entrar en la célula se forma la llamada “unión estrecha” o *tight junction* entre el parásito y la membrana de la célula hospedera. La “unión estrecha”

se mueve del extremo apical hacia la parte posterior del merozoíto en una serie de eventos complejos que realiza el glideosoma. Otro de los eventos característicos del ingreso es la remoción de la cubierta proteica de la superficie del merozoíto, un evento proteolítico que involucra una serina proteasa localizada en los micronemas apicales. A medida que el parasito “empuja” hacia dentro de la célula hospedera, crea una vacuola parasitófora para sellarse a sí mismo desde el citoplasma del eritrocito y formar un ambiente propicio para su desarrollo (Cowman y Crabb, 2006).

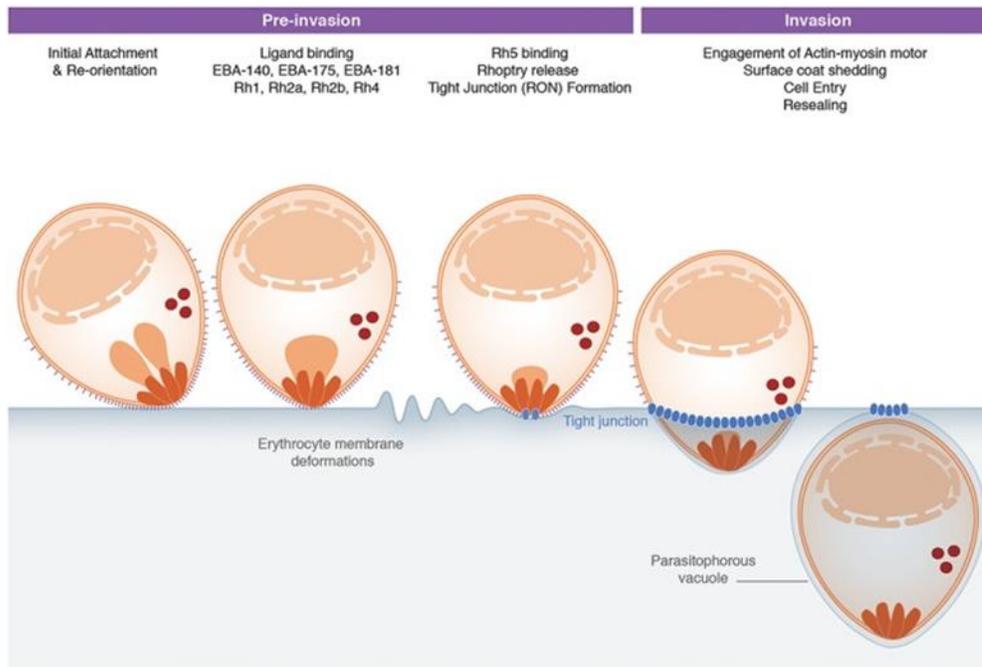


Figura 1-10 Modelo esquemático de la invasión del eritrocito por el merozoíto de *Plasmodium*. Tomado de Koch y Baum, 2016

Los merozoítos tienen una maquinaria sofisticada que lleva a cabo el procesamiento de sus proteínas de superficie antes, durante y después de la invasión, en algunos casos los eventos de procesamiento y las proteasas involucradas están bien definidos, pero en otros casos los mecanismos precisos y las proteasas todavía no se conocen (Beeson et al., 2016). La mayor parte de conocimiento que se tiene al respecto actualmente está derivado de estudios en *P. falciparum* y *P. knowlesi*, un resumen sobre los mecanismos y proteasas involucradas en el procesamiento se muestra en la figura 1-11.

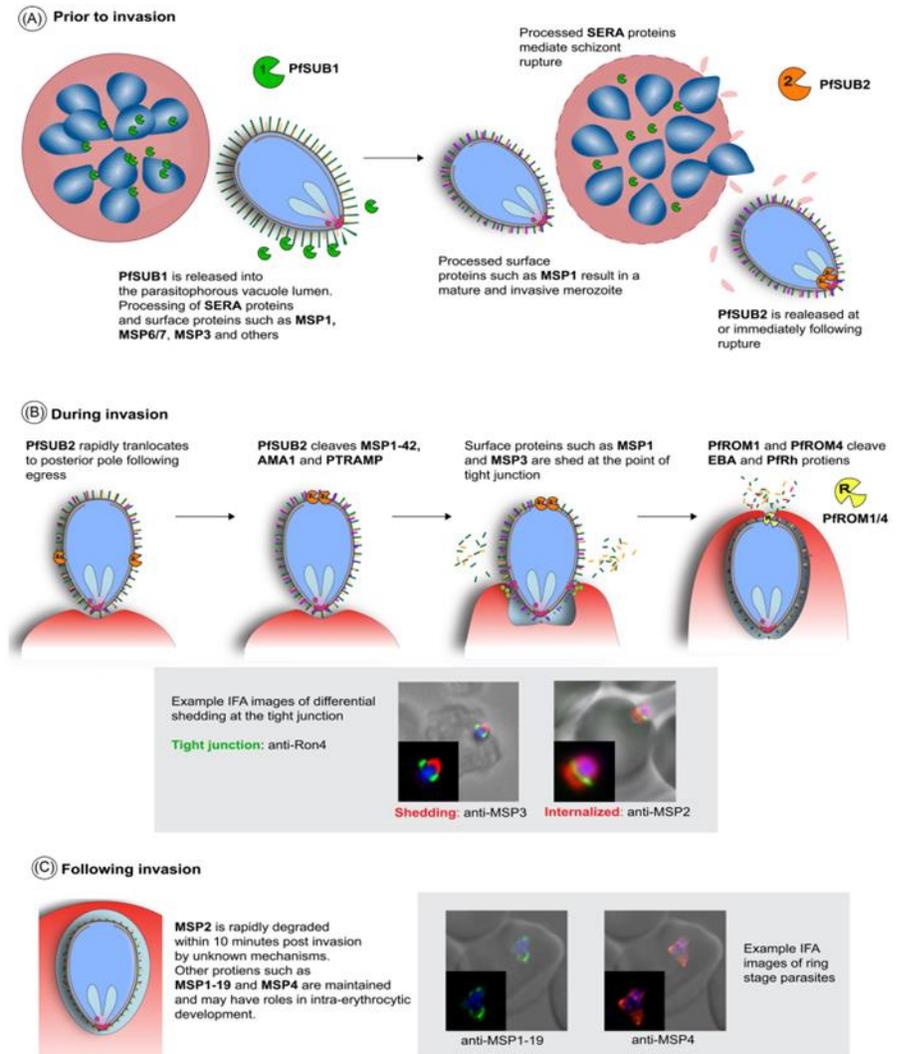


Figura 1-11 Procesamiento de las proteínas de superficie de merozoíto antes, durante y después de la invasión.
Tomado de Beeson et al., 2016.

1.3.6 El *Glideosoma*

Para moverse y para invadir, los parásitos apicomplexa han desarrollado un tipo de locomoción denominado *gliding* o deslizamiento. Este tipo de movimiento se caracteriza porque el parásito puede deslizarse sobre un sustrato sólido sin un cambio aparente de su forma, cabe anotar que estos parásitos no poseen cilios o flagelos para nadar en un medio líquido. En el *gliding* tampoco ocurre lo que se presenta en el movimiento por arrastre que tienen algunas amebas, en donde se requiere de un continuo

remodelamiento de pseudópodos o lamelipodios en la dirección del movimiento (Heintzelman, 2015). Aunque el movimiento por *gliding* es muy rápido y se alcanzan velocidades de 10 $\mu\text{m/s}$, probablemente los apicomplexas no usan el *gliding* para alcanzar el órgano o la célula blanco, en vez de esto usan pasivamente los fluidos en las vías digestivas y circulatorias. Una vez alcanzada la célula blanco, el parásito debe moverse para poder invadirla y este movimiento lo hace mediante el *gliding* (Ménard, 2001). El *gliding* es realizado por un complejo proteico llamado *glideosoma*, basado en un motor actina-miosina y ubicado en la periferia del parásito (Keeley y Soldati, 2004; Sibley, 2004; Heintzelman, 2015). Se ha observado que el movimiento y la invasión de los zoítos son bloqueados por la acción de la citocalasina D, compuesto que inhibe la polimerización de los filamentos de actina. Los zoítos tratados con citocalasina D son incapaces de invadir células aun cuando permanecen unidos a la superficie de la célula y secretan los componentes necesarios para la invasión y la formación de la vacuola parasitófora. Estudios con parásitos móviles resistentes a citocalasina D que presentan mutaciones en el gen de actina, han permitido proponer que el motor molecular involucrado en la invasión es un motor dependiente de actina e independiente de la dinámica de los microtúbulos del parásito (Sibley, 2004).

La actina es la proteína más abundante dentro de las células eucarióticas y juega papeles importantes en una amplia gama de funciones estructurales y dinámicas, que incluyen la contracción muscular, el remodelamiento de la forma celular y el movimiento. (Pollard y Cooper, 2009). La actina de los apicomplexa es muy divergente a la de otros eucariotas a nivel de secuencia (Wesseling et al., 1988) y difiere significativamente de actinas canónicas en sus propiedades funcionales (Skillman et al., 2011; Vahokoski et al., 2014). En *P. falciparum* se distinguen dos variantes de actina, actina 1 y actina 2 (Wesseling et al., 1988), la actina 2 forma filamentos similares a la F-actina canónica, mientras que la actina 1 forma frágiles y cortos filamentos de 100 nm de longitud (Vahokoski et al., 2014) que integran la pista lineal del glideosoma.

Por otra parte, se ha observado que la inhibición de la actividad ATPasa de las miosinas con 2,3-butanodiona monoxima (BDM) bloquea tanto el movimiento como la invasión, pero no afecta la asociación a la superficie del hospedero (al igual que el tratamiento con Citocalasina D), por lo cual se ha propuesto que las miosinas ancladas a la superficie del parásito hacen parte del motor molecular involucrado en el *gliding* (Sibley et al., 1998; Pinder et al., 2000; Morrissette y Sibley, 2002).

En relación con los otros componentes del glideosoma, en la mayoría de los zoítos de *Plasmodium sp.* se han identificado adhesinas transmembranales de la familia de las proteínas TRAP (Thrombospondin-Related Adhesive Protein). Estas proteínas se caracterizan por tener dominios extracelulares adhesivos tipo trombospondina 1 que son los posibles responsables de la interacción con receptores en la célula hospedera y tienen un dominio citoplasmático que se asocia al motor molecular actina–miosina del parásito (Sultan et al., 1997; Ménard, 2001; Morrissette y Sibley, 2002). Sin embargo la proteína TRAP no presenta sitios de interacción con actina o miosina por lo que se supone la existencia de proteínas que sirven de conectores. Estudios recientes en esporozoítos han sugerido que la enzima de la glicólisis aldolasa puede reclutar los filamentos de actina y la proteína TRAP dado que presenta dominios de unión a actina y a los residuos ácidos del dominio citoplasmático de TRAP (Buscaglia et al., 2003; Sibley, 2004; Soldati y Meissner, 2004).

Teniendo en cuenta los diferentes componentes del glideosoma que han sido caracterizados, se han propuesto varios modelos sobre la topología de la maquinaria para el movimiento en *Plasmodium sp.* y en otros apicomplexa (Soldati y Meissner, 2004). Uno de estos modelos (Figura 1-12) sugiere que las miosinas necesarias para el movimiento y la invasión se encuentran ancladas en el IMC y a través de interacciones proteína–proteína se conectan con los microtúbulos y demás componentes del citoesqueleto (Bergman et al., 2003). Las miosinas se mueven a lo largo de pequeños filamentos de actina ubicados entre el IMC y la membrana plasmática y a su vez los filamentos de actina se conectan con el dominio citoplasmático de las adhesinas a través de proteínas conectoras. Las adhesinas, ubicadas en la membrana, reconocen la superficie de la célula hospedera y se traslocan en dirección opuesta al movimiento del parásito por la acción del motor molecular. Finalmente, su interacción con el receptor en las células y la membrana plasmática se rompe por proteólisis permitiendo así el movimiento.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Hacer un acercamiento a la posible función de la miosina B en parásitos del estado intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*.

2.2 Objetivos específicos

- Establecer la localización de PfMyoB en parásitos de *P. falciparum*.
- Identificar proteínas que interactúan con PfMyoB.
- Intentar establecer la topología del complejo de las proteínas identificadas de unión a PfMyoB.
- Hacer un estudio estructural *in silico* de la proteína MyoB y de sus posibles cadenas livianas.

3. Materiales y métodos

Con el fin de cumplir con los objetivos planteados en el proyecto, se construyó una metodología que consistió de una parte experimental retroalimentada con resultados de estudios *in silico* (trabajo de bioinformática); así, el trabajo experimental y el trabajo computacional convergieron para desarrollar la investigación propuesta.

Se describe el proceso técnico y científico que se siguió para cumplir los objetivos:

1. Establecer la localización de PfMyoB en parásitos de *P. falciparum*:

Se planteó la obtención de proteínas recombinantes solubles de PfMyoB en un sistema de expresión procarionte; para ello se probó el sistema pMAL (New England Biolabs, NEB) que produce proteínas fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP). Algunas de esas proteínas recombinantes se usaron como inmunógenos para obtener anticuerpos policlonales en rata con el fin de usarlos para detectar la proteína tanto en células (ensayos de inmunofluorescencia) como en extractos celulares (ensayos de Western Blot e inmunoprecipitación). También se usó un servicio técnico para ordenar la síntesis de péptidos inmunogénicos de PfMyoB y la producción de anticuerpos policlonales.

2. Identificar proteínas que interactúen con PfMyoB:

Para ello se planteó hacer experimentos de inmunoprecipitación con los anticuerpos anti PfMyoB sobre extractos proteicos de esquizontes de *P. falciparum* y consecuentemente, analizar por medio de proteómica el complejo obtenido. También se realizaron análisis computacionales de la estructura de PfMyoB y se indagó la posibilidad de su interacción con MTIP. Con el fin de retar esa hipótesis se realizaron experimentos *in vitro* con proteínas recombinantes de PfMyoB y MTIP con el fin de demostrar interacciones proteína-proteína.

3. Establecer la topología del complejo de las proteínas identificadas de unión a PfMyoB:

Se planteó el uso de péptidos inhibidores con el fin de evaluar las interacciones proteína-proteína encontradas en el punto anterior.

4. Hacer un estudio estructural *in silico* de la proteína PfMyoB y de sus posibles cadenas livianas:

Este trabajo se hizo usando programas de bioinformática de modelamiento tridimensional de proteínas, de predicción de interacciones proteína-proteína y minería de datos en el genoma de *P. falciparum*, este último para encontrar *in silico* posibles cadenas livianas de miosina.

A continuación se describen algunos materiales generales que se usaron a lo largo del desarrollo de la tesis. Posteriormente se hará una descripción detallada de todos los procedimientos creados, adaptados y mejorados en este trabajo.

3.1 Materiales y técnicas generales

3.1.1 Anticuerpos

Seguidamente se muestra una lista de los anticuerpos comerciales usados en WB e inmunofluorescencia:

Tabla 3-1 Anticuerpos comerciales usados

Anticuerpo	Descripción	Marca
Anti-MBP desarrollado en ratón	Monoclonal, Isotipo IgG2a	New England Biolabs
Anti-GST desarrollado en ratón	Monoclonal, Isotipo IgG2b	Abcam
Anti-HIS desarrollado en ratón	Monoclonal, Isotipo IgG1	Novagen
Anti-MTIP ¹ desarrollado en conejo	Policlonal	Producido en el laboratorio
Anticuerpo secundario anti-rata desarrollado en cabra	Policlonal, acoplado a biotina	Thermo
Anticuerpo secundario anti-conejo desarrollado en cabra	Policlonal, acoplado a biotina	Sigma
Anticuerpo secundario anti-conejo desarrollado en cabra	Policlonal, acoplado a peroxidasa	Thermo
Anticuerpo secundario anti-	Policlonal, acoplado a	Thermo

¹ Anti-MTIP: este anticuerpo no es comercial, fue producido en el laboratorio.

rata desarrollado en cabra	peroxidasa	
Anticuerpo secundario anti-ratón desarrollado en cabra	Policlonal, acoplado a peroxidasa	Thermo
Anticuerpo secundario anti-rata, desarrollado en cabra	Policlonal, acoplado a Alexa Fluor 488	Molecular Probes
Anticuerpo secundario anti-conejo, desarrollado en cabra	Policlonal, acoplado a Alexa Fluor 546,	Molecular Probes
Anticuerpo secundario anti-conejo desarrollado en cabra	Policlonal, acoplado a esferas de oro de 10 nm	Sigma

3.1.2 Vectores plasmídicos

El vector de clonación usado fue el pJET1.2/blunt (Thermo); hospedero: *E. coli*; resistencia: ampicilina; promotor: T7. En la tabla 3-2 se muestran algunas de las características de los vectores de expresión usados. Los mapas de todos los vectores se presentan en el Anexo B.

Tabla 3-2 Características de los vectores de expresión usados

Nombre del vector	Descripción	Tamaño del tag	Resistencia a antibiótico	Fuente
pMALc5X	El gen clonado se inserta corriente abajo del gen malE, para generar una proteína de fusión a MBP (proteína de unión a maltosa) de <i>E. coli</i> . Promotor tac, represor lacI ^q	42 kDa	Ampicilina	New England Biolabs
pGEX4T2	El gen clonado se inserta corriente abajo del gen GST (glutación-S-transferasa) para generar una proteína de fusión a GST de <i>Schistosoma japonicum</i> . Promotor tac, represor lacI ^q	24kDa	Ampicilina	GE Healthcare
pET15b	El gen clonado se inserta corriente abajo de 6 codones CAT para producir una proteína con una extensión de 6 histidinas en el N-terminal. Promotor T7, represor lacI ^q	1 kDa	Ampicilina	Novagen

3.1.3 Detección y revelado en Western Blot (WB)

Se usaron anticuerpos secundarios unidos a biotina para hacer la detección de WB en algunos ensayos de producción de proteínas. El procedimiento que se siguió fue el siguiente: Las membranas se incuban con el anticuerpo primario correspondiente, luego con el anticuerpo secundario biotinilado por 1 hora, se realizan lavados y sigue la adición

del complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina en una dilución 1:3000. Posteriormente se adiciona el sustrato cromogénico NBT/BCIP (nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt); la producción de color se inicia cuando un grupo fosfato del BCIP es clivado por la fosfatasa alcalina resultando en una coloración azul que conlleva a la precipitación del NBT de color púrpura.

En los demás ensayos de WB se usaron anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa (HRP), y el procedimiento para usarlos fue el siguiente: después de la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, la membrana se incubó por 1 hora con el anticuerpo-HRP (dilución 1:5000 para anticuerpos anti-ratón y anti-rata y 1:30000 para anticuerpos anti-conejo), luego se le adicionó el sustrato DAB (3,3'-Diaminobenzidine) que en presencia de peróxido de hidrógeno se oxida por la acción de la peroxidasa y forma un compuesto de color café. De la misma forma se usó alternativamente el sistema de revelado con un sustrato quimioluminiscente para la peroxidasa. Este sustrato se presenta como un kit de revelado llamado ECL (Enhanced chemiluminescence, Pierce o Amersham) y está basado en luminol (3-aminophthalhydrazide) y peróxido, que en contacto con la peroxidasa produce un compuesto luminiscente que puede ser detectado por medio de un equipo analizador de imágenes con el filtro adecuado para quimioluminiscencia o por medio de la exposición de la luz emitida sobre una película de rayos X, en este trabajo se usaron los dos métodos y en cada resultado se mencionará cual se usó.

3.2 Producción de proteínas recombinantes

Se produjeron proteínas recombinantes de diferentes regiones de PfMyoB (ver figura 3-1 y tabla 3-3), que incluyeron la cabeza y la cola, usando el vector de expresión pMAL (NEB) (Goh et al., 2003), algunas de estas proteínas se usaron como inmunógenos para producir anticuerpos en rata. Igualmente, sobre la secuencia de PfMyoA se tomó la secuencia de la cola (residuos 457 a 518) y se produjeron dos proteínas recombinantes con dos *tags* (proteína de fusión) diferentes usando los vectores pMAL y pET (tabla 3-3) y una de ellas fue usada como inmunógeno para la producción de anticuerpos en rata. Se produjo la proteína MTIP completa en el vector de expresión pGEX (tabla 3-3). Todas las proteínas fueron purificadas por medio de cromatografía de afinidad. Adicionalmente se obtuvieron proteínas recombinantes exclusivamente de los *tags*: MBP y GST.

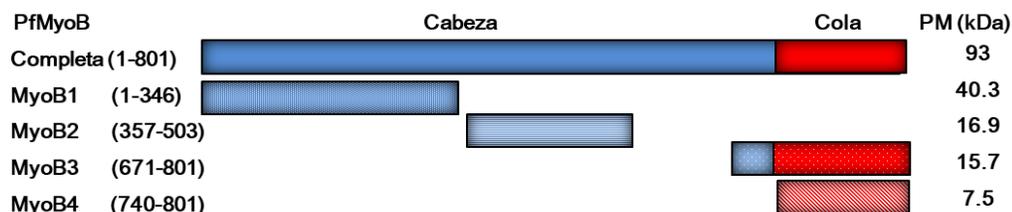


Figura 3-1 Constructos de PfMyoB.

La proteína completa se muestra con su dominio de cabeza (aminoácidos 1-739) y dominio de cola (740-801). PM, peso molecular calculado. aa: aminoácido. B1, B2, B3 y B4 corresponden a las cuatro proteínas recombinantes producidas.

De forma general, se siguió esta secuencia de procedimientos: Obtención del fragmento de ADNc por RT-PCR - Clonación del fragmento - Subclonación en vector de expresión - Expresión y purificación de la recombinante, estos procesos se describen a continuación:

3.2.1 Obtención de los fragmentos de ADNc por RT-PCR

Se hizo el diseño de los *primers* sobre los genes PfMyoB (PlasmobID: PF3D7_0503600), PfMyoA (PF3D7_1342600) y MTIP (PF3D7_1246400) usando el software Primer Designer v.1.01 (Scientific & Educational Software Program) (Secuencias en la tabla del Anexo A).

Para la síntesis de ADNc se usó ARN del estado de esquizontes de la cepa 3D7 de *P. falciparum* (40 h aproximadamente), disponible en el laboratorio. La reacción se llevó a cabo de la siguiente forma: incubación a 72°C por 5 minutos de 1 µg de ARN y 0.6 µg de Oligo dT. Luego, una extensión a 72°C por 1 h con 200 U de enzima M-MLV (Promega), 200 U de RNAsin (Promega) y 0.5 mM de dNTPs (Promega). La reacción de PCR se realizó sobre el ADNc anterior más 1 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0.5 µM de *primers* y 0.5 U de ADN polimerasa Taq Platinum (Invitrogen). El programa de amplificación comprendió una denaturación inicial de 95°C x 3 min, 35 ciclos de 94°C x 30 s, temperatura de anillamiento (según tabla Anexo A) x 30 s y 72°C x 30 s, seguido por una extensión final de 72°C x 5 min, en un termociclador T100 de BIORAD. El producto de amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 o 1.5%, se tiñó sumergiendo el gel en una solución 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (Promega) por 20 minutos y se visualizó en el analizador de imágenes BioDoc-It®210 Imaging System, UVP™.

El producto de PCR fue cortado desde el gel, purificado con el kit Wizard® SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega) y clonado en el vector pJET1.2/blunt (Thermo) siguiendo las condiciones del CloneJet PCR Cloning kit (Thermo). Con el vector recombinante se transformaron bacterias *E. coli* TOP10² (Stratagene), se sembraron en platos de LB-agar-Ampicilina (100 µg/ml) (Amresco) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las colonias positivas fueron verificadas por PCR usando oligonucleótidos específicos del vector (pJET1.2 sentido y pJET1.2 antisentido, Anexo A) (Thermo) y a partir de una de ellas se purificó el ADN del constructo transformante (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification, Promega).

Tabla 3-3 Fragmentos de PCR generados en este trabajo para producir las proteínas recombinantes del mismo nombre

Nombre del fragmento	Primer sentido	Primer antisentido	Vector de expresión	Tamaño calculado de la proteína recombinante, fragmento + tag = kDa
MyoB1	MyoB1F	MyoB1R	pMAL	40.3 + 42 = 82.3
MyoB2	MyoB38F	MyoB38R		16.9 + 42 = 58.9
MyoB3	MyoB3F	MyoB3R		15.7 + 42 = 57.7
MyoB4	MyoBColaF	MyoBColaR		7.5 + 42 = 49.5
MyoAMB	MyoAMBPF	MyoAMBPR		7.3 + 42 = 49.3
MyoAHis	MyoAMBPF	MyoAHisR	pET	7.3 + 1 = 8.3
MTIP	MTIPF	MTIPR	pGEX	23.5 + 24 = 47.5

3.2.2 Subclonación en el vector de expresión

Se liberó el fragmento de interés del constructo transformante por medio de digestión con el par de enzimas de restricción escogidas (NEB) y fue purificado desde el gel. Simultáneamente, el vector pMALc5x (NEB), o pGEX4T.2 (GE Healthcare) o pET15b (Novagen) fue sometido a digestión con las mismas enzimas, purificado y luego en una reacción de ligación, se unió al fragmento liberado para dar lugar al constructo

² **E. coli Top 10 (Stratagene)**, genotipo: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

transformante en cada uno de los vectores. Con ese constructo se transformaron bacterias *E. coli* NEB Express³ (NEB) o BL21CodonPlusRIL⁴ y las colonias positivas se confirmaron por PCR usando oligonucleotidos específicos del vector correspondiente (Anexo A). Para confirmar la identidad del inserto, el ADN del plásmido recombinante fue purificado mediante minipreps con Wizard™ Plus SV Minipreps DNA Purification) (Promega) y secuenciado (Macrogen™).

3.2.3 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

El método general para chequear la producción de las proteínas fue SDS-PAGE – Transferencia – WB y se realizó de la siguiente forma: La muestra de proteínas se mezcló con *buffer* Laemmli⁵ y se sometió a electroforesis de SDS-PAGE en geles al 8, 10 o 12%, según la necesidad. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Thermo) por medio de transferencia húmeda por 1.5 h a 90V. Luego, la membrana se bloqueó en *buffer* TBS⁶-Tween (TBST) 0.1%-Leche descremada 5%, por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario a la concentración determinada en *buffer* de bloqueo por 2 h, luego se hicieron 3 lavados con *buffer* TBST por 10 minutos y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a biotina o a HRP (Thermo) por 1 h a temperatura ambiente.

Finalmente, el revelado se hizo con el sustrato cromogénico NBT/BCIP en los casos en los que se usaron anticuerpos secundarios acoplados a biotina. Cuando se usaron anticuerpos acoplados a HRP se hizo el revelado con el sustrato DAB o por quimioluminiscencia usando el kit Super Signal West Pico Chemiluminiscent substrate (Thermo) y la visualización se hizo sobre película de rayos-X.

³ **E. coli NEB Express Competent Cells** (NEB), genotipo: fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--TetS) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10

⁴ **E coli BL21-CodonPlus-RIL**, genotipo: *E. coli* B F- ompT hsdS(rB – mB –) dcm+ Tetr gal endA Hte [argU ileY leuW Camr]. Resistencia: cloranfenicol

⁵ Buffer Laemmli: SDS 2%, Glicerol 10%, TrisHCl 60 mM, Azul de bromofenol 0.01%

⁶ Buffer TBS: Tris 50 mM, NaCl 155 mM, EDTA 3 mM, pH 7.6.

- Expresión y purificación de las proteínas recombinantes con el *tag* MBP

Se inoculó una colonia positiva para cada constructo pMAL-Miosina (los cuales daban lugar a la expresión de las proteínas MyoB1, MyoB2, MyoB3, MyoB4 y MyoAMBp, ver Tabla 3-3) en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) y el cultivo se mantuvo en crecimiento toda la noche a 37°C con agitación constante (180 rpm). Al día siguiente, se hizo una dilución de 1:5 en 10 ml de medio fresco y se permitió el crecimiento bacteriano hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5. En ese momento se tomó una alícuota de cultivo (tiempo cero de inducción T_0), luego se indujo la expresión con 0.3 mM de isopropil-beta-tiogalactopiranosido (IPTG) (Promega) y a partir de ese momento se tomaron muestras cada hora, durante 3 h. Las alícuotas recolectadas fueron preparadas con *buffer* Laemmli y sometidas a SDS-PAGE para monitorear la expresión de la proteína recombinante. El cultivo fue centrifugado a 10000 rpm por 20 min a 4°C. El pellet de bacterias fue resuspendido en *buffer* de columna⁷ con 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Alfa Aesar) y sonicado con pulsos de 30 s ON y 10 s OFF por 5 min. El extracto se centrifugó a 20000 x g por 20 minutos y el sobrenadante y el pellet obtenidos fueron analizados mediante SDS-PAGE para establecer si la proteína recombinante estaba en la fracción soluble o en la insoluble.

La purificación de la proteína se realizó por cromatografía de afinidad con resina de amilosa. Se realizó una inducción de expresión a mayor escala (500 ml) y el sobrenadante del extracto bacteriano (fracción soluble) fue mezclado con 1 ml de resina de amilosa (NEB) y se puso en agitación durante toda la noche a 4°C. Luego, la mezcla fue empacada en una columna de polipropileno de 2 ml (Qiagen), se hicieron varios lavados y finalmente la proteína recombinante se recuperó agregando *buffer* de columna suplementado con 10 mM de maltosa (Sigma). Se tomaron fracciones de 500 µl, se monitorearon mediante SDS-PAGE y se cuantificaron mediante el método de microBradford. En este método (Bradford, 1976) una alícuota de 10µl de proteína o extracto se mezcló con 190 µl de una dilución 1:5 del reactivo de Bradford (BioRad) en placas de 96 pozos, se dejó en incubación en oscuridad por 10 min y se observó el desarrollo de color a 595 nm en el lector de microplacas TECAN Infinite 200. Se realizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) y sobre ésta se interpolaron

⁷ Buffer columna de amilosa: Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, DTT 1mM

los valores de absorbancia de las muestras con el fin de obtener el valor de concentración.

Como proteína control se produjo el *tag* MBP de la siguiente forma: a partir de una colonia de bacterias que contenía el vector pMALc5X sin inserto alguno, se hizo la inducción de la expresión y la purificación de la proteína tal como se describió anteriormente.

- Expresión y purificación las proteínas recombinantes con el *tag* GST

Se inoculó una colonia positiva para el constructo pGEX-MTIP en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (50 µg/ml) y el cultivo se mantuvo en crecimiento toda la noche a 37°C con agitación constante (180 rpm). Al día siguiente, se hizo una dilución de 1:5 en 10 ml de medio fresco y se permitió el crecimiento bacteriano hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,8. En ese momento se tomó una alícuota de cultivo (tiempo cero de inducción T₀), luego se indujo la expresión con 0.1 mM de IPTG (Promega) y a partir de ese momento se tomaron muestras cada hora, durante 3 h. Las alícuotas recolectadas fueron preparadas con *buffer* Laemmli y sometidas a SDS-PAGE para monitorear la expresión de la proteína recombinante. El cultivo fue centrifugado a 4000 x g por 20 min a 4°C. El pellet de bacterias fue resuspendido en *buffer* de columna GST⁸ con 1 mM de PMSF (Alfa Aesar) y sonicado con pulsos de 30 seg ON y 10 seg OFF por 5 minutos. El extracto se centrifugó a 20000 x g por 20 minutos y el sobrenadante y el pellet obtenidos fueron analizados mediante SDS-PAGE para establecer si la proteína recombinante estaba en la fracción soluble o en la insoluble.

La purificación de la proteína se realizó por cromatografía de afinidad con resina de glutatión. Se realizó una inducción de expresión a mayor escala (500 ml) y el sobrenadante del extracto bacteriano (fracción soluble) fue mezclado con 1 ml de resina de glutatión agarosa (Pierce) y se puso en agitación durante toda la noche a 4°C. Luego, la mezcla fue empacada en una columna de polipropileno de 2 ml (Qiagen), se hicieron varios lavados y finalmente la proteína recombinante se recuperó agregando *buffer* de elución⁹. Se tomaron fracciones de 500 µl y se monitorearon mediante SDS-PAGE, se

⁸ Buffer columna de GST: NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.3

⁹ Buffer de elución GST: Tris-HCl 50 mM, glutatión reducido 10 mM, pH 8.0

cuantificaron mediante el método de microBradford y se conservaron a -70°C hasta su posterior uso.

Como proteína control se produjo el *tag* GST: a partir de una colonia de bacterias que contenía el vector pGEX4T2 sin inserto alguno, se hizo la inducción de la expresión y la purificación de la proteína tal como se describió anteriormente.

- Expresión y purificación las proteínas recombinantes con el *tag* HIS

Se inoculó una colonia positiva para el constructo pET-MyoA en medio LB líquido con ampicilina ($100\ \mu\text{g/ml}$) y el cultivo se mantuvo en crecimiento toda la noche a 37°C con agitación constante ($180\ \text{rpm}$). Al día siguiente, se hizo una dilución de 1:5 en 10 ml de medio fresco y se permitió el crecimiento bacteriano hasta alcanzar una densidad óptica a $600\ \text{nm}$ de 0,6. En ese momento se tomó una alícuota de cultivo (tiempo cero de inducción T_0), luego se indujo la expresión con $0.4\ \text{mM}$ de IPTG (Promega) y a partir de ese momento se tomaron muestras cada hora, durante 3 h. Las alícuotas recolectadas fueron preparadas con *buffer* Laemmli y sometidas a SDS-PAGE para monitorear la expresión de la proteína recombinante. Se hicieron varios ensayos cambiando condiciones como tipo de bacterias, tiempo de inducción temperatura de inducción, con el fin de obtener la proteína soluble, sin embargo, siempre se localizaba en el pellet. Por tanto, se decidió hacer una purificación denaturante a partir de los cuerpos de inclusión del pellet. El procedimiento usado fue el siguiente:

Se realizó una inducción de expresión a mayor escala (1 litro) por 3 h a 30°C . Luego, el cultivo fue centrifugado a $4000\ \times\ \text{g}$ por 20 min a 4°C . El pellet de bacterias fue resuspendido en *buffer* denaturante¹⁰ con $1\ \text{mM}$ de PMSF (Alfa Aesar) y por una hora se dejó en agitación. Posteriormente se sonicó con pulsos de 30 s ON y 10 s OFF por 5 minutos y se centrifugó a $10000\ \text{g}$ x 25 min. La purificación de la proteína se realizó por cromatografía de afinidad con resina de níquel. Las proteínas denaturadas de la fase líquida se mezclaron con 1.5 ml de resina de Ni-NTA-Agarosa (Thermo) y se pusieron en agitación durante toda la noche a 4°C . Luego, la mezcla fue empacada en una columna de polipropileno de 5 ml (Qiagen), se hicieron varios lavados con *buffer* de lavado

¹⁰ Buffer denaturante: Tris $10\ \text{mM}$, NaH_2PO_4 $100\ \text{mM}$, úrea $8\ \text{M}$, pH 8.0

denaturante¹¹ y finalmente la proteína recombinante se recuperó agregando *buffer* de elución 1 y 2¹². Se tomaron fracciones de 500 μ l y se monitorearon mediante SDS-PAGE. La fracciones que contenían la proteína recombinante fueron reunidas y filtradas usando el filtro Vivaspín 4 (Sartorius) con un tamaño de poro de 3 kDa por medio de centrifugación a 3000 rpm hasta obtener 1 ml de solución, finalmente, se pasó PBS varias veces con el fin de reducir la concentración de urea de la fracción, este proceso es denominado desalado o desalting.

3.3 Producción de anticuerpos policlonales anti-miosina

Este procedimiento se realizó en los bioterios de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. El trabajo con animales fue aprobado por los comités de ética del Instituto Nacional de Salud (acta 09 de octubre 07 de 2010) y de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (acta 05 de octubre 11 de 2010). Se utilizaron dos ratas Wistar macho de 5 semanas de edad por cada proteína (Wakayama et al., 2006); se hizo la inoculación intraperitoneal de las proteínas MyoB1, MyoB2, MyoB4 y MyoAMBIP (tabla 3-3). Una rata más se usó como control (no fue inoculada). El esquema de inmunización inició con una dosis de sensibilización en la que se inyectó intraperitonealmente 200 μ l de sólo adyuvante Imject Alum Adjuvant (Thermo). Ocho días después de la sensibilización, se inoculó intraperitonealmente la primera dosis de antígeno con 200 μ g de la proteína mezclada con 200 μ l de adyuvante. Los refuerzos de la inmunización se realizaron a los 14 y 28 días después de la primera dosis de antígeno con 100 μ g de la proteína recombinante en adyuvante. La sangría total de las ratas se realizó el día 35; las ratas fueron inyectadas con una mezcla de anestésicos (Ketamina 50 mg/kg y Xilazina 15 mg/kg), se hizo apertura de la cavidad torácica, se cortó la arteria aorta y de allí se tomó la sangre. La sangre fue recolectada en tubos con citrato y se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min, se tomó el suero y se almacenó a -20°C. Se monitoreó la producción de los anticuerpos usando los sueros para detectar la proteína recombinante por medio de WB.

¹¹ Buffer de lavado denaturante: Tris 10 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, urea 8M, pH 6.3

¹² Buffer de elución 1: Tris 10 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, urea 8M, pH 5.9; Buffer de elución 2: Tris 10 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, urea 8M, pH 4.5.

3.4 Anticuerpos policlonales contra péptidos sintéticos de PfMyoB

Se obtuvieron dos anticuerpos policlonales dirigidos contra dos péptidos sintéticos de 14 aa cada uno ubicados en dos regiones diferentes de PfMyoB, según se muestra en la figura 3-2. Estos anticuerpos se compraron a una empresa de biotecnología privada (GenScript, Piscataway, NJ, USA), fueron producidos en conejos y purificados por afinidad (Brown et al., 2015).

La secuencia de los péptidos usados como antígenos se eligió con base en los valores antigenicidad, baja hidrofobicidad, facilidad de síntesis, solubilidad y especificidad para el genoma de *P. falciparum* (plasmodb.org), el reporte del diseño de estos péptidos se adjunta en el anexo C.

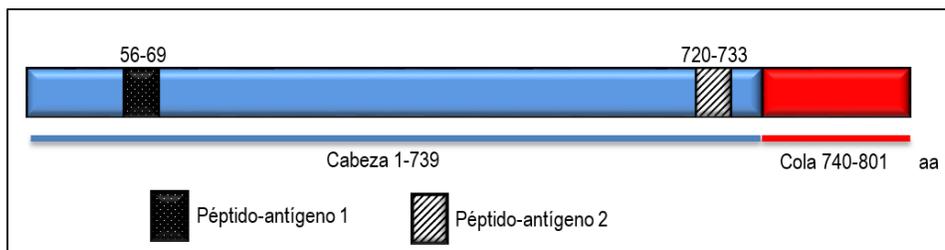


Figura 3-2 Esquema de la secuencia de PfMyoB. Se muestran los dominios principales y la posición de los péptidos usados para la obtención de los anticuerpos policlonales.

3.5 Cultivo de parásitos y obtención de extractos proteicos

3.5.1 Cultivo de *P. falciparum*

Los parásitos de la cepa 3D7 de *P. falciparum*, fueron cultivados *in vitro*, en frascos de cultivo celular de 175 cm² CellStar (Greiner), con eritrocitos humanos O+, en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 10% de suero humano inactivado y recalcificado, 24 mM de HEPES, 360 µM de hipoxantina, 24 mM de bicarbonato de sodio y 10 µg/ml de gentamicina a 37°C en incubadora con una atmosfera de CO₂ al 5% (Trager y Jensen, 1976). Se manejó un hematocrito del 3% y se obtuvieron parasitemias cercanas al 20%,

este seguimiento se realizó por medio de tinción y conteo de láminas de los cultivos; las láminas de eritrocitos extendidos se trataron con las soluciones del kit Panótico rápido (Laborclin, Brasil). El panótico rápido se basa en el principio de tinción hematológica establecida por Romanowsky (Gurr, 1964) y se realiza en 15 segundos, sumergiendo la lámina por 5 segundos en cada solución; la primera solución es metanol con triarilmetano al 0.1% para fijar las células, la segunda es una tinción de xantenos al 0.1% y la tercera es una solución de tiazinas al 0.1%. Así, se observaron los eritrocitos y los parásitos infectados.

Los cultivos se mantuvieron sincronizados por medio de un tratamiento con sorbitol al 5% en intervalos de 48 h (Lambros y Vanderberg, 1979), con este tratamiento se obtuvieron anillos y se eliminaron las formas maduras (trofozoítos y esquizontes).

Para la separación y aislamiento de esquizontes, se hizo una purificación del cultivo por medio de Percoll™ (Sigma) según el protocolo previamente reportado por Rivadeneira y col. en 1983. Brevemente, los eritrocitos infectados se lavaron y el pellet resultante se resuspendió en *Buffer* fosfatos¹³ (PBS), luego en un tubo de 15 ml se dispusieron 5 ml de una solución estéril de Percoll™ al 65% y sobre ella se agregó muy lentamente la suspensión de eritrocitos infectados. El tubo se centrifugó en centrífuga de ángulo libre a 3200 rpm por 20 min. Los esquizontes aislados se recuperaron de la interfase superior formada en el gradiente, aspirándolos por medio de pipeta pasteur.

3.5.2 Obtención de extractos de proteínas

Los parásitos se aislaron de los cultivos sincronizados por medio de lisis de los eritrocitos infectados con saponina al 0.15%; brevemente, el cultivo se centrifugó a 2500 rpm y las células se lavaron con PBS, se incubaron por 15 min con la solución de saponina y se dejaron a 37°C. Posteriormente se recuperó un pellet de parásitos por medio de centrifugación a 11000 rpm por 5 min; este pellet se lavó con PBS 3 veces. El pellet se resuspendió en *buffer* RIPA, que contenía: 20mM de *buffer* Tris pH 7.5, 100 mM de NaCl, 1% de NP40, 0.5% de deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1mM EDTA, 1 mM de EGTA, coctel de inhibidores 1X (SIGMA: AEBSF 104 mM, Aprotinina 80 µM, Bestatina 4 mM, E-64 1.4 mM, Leupeptina 2 mM y Pepstatina A 1.5 mM) y 1mM de PMSF. El pellet

¹³ Buffer PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4

resuspendido se mantuvo en hielo y en agitación por 30 min y luego se sonicó brevemente por 10 segundos. El lisado resultante se centrifugó a 12000 rpm por 10 min y posteriormente se cuantificó por medio del método de microBradford.

3.5.3 Detección de la proteína PfMyoB en extractos y en células

- Detección en extractos de proteínas

Se sembraron 50 o 100 µg de extracto de proteínas de esquizontes en geles de poliacrilamida al 8%. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Thermo) por medio de transferencia húmeda por 1.5 h a 90V. Luego, la membrana se bloqueó en *buffer* TBST 0.05%-Leche descremada 3%, toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario a la concentración determinada en *buffer* de bloqueo, toda la noche a 4°C, luego se hicieron 3 lavados con *buffer* TBST por 10 min y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa (Thermo) por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, el revelado se hizo mediante quimioluminiscencia usando el kit Super Signal West Pico Chemiluminiscent substrate (Thermo) y la visualización se hizo en analizador de imágenes ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare), o sobre película de rayos-X, o con el sustrato DAB.

- Inmunofluorescencia (IFA)

Las IFAs fueron realizadas de acuerdo a la técnica mejorada de Tonkin y col. en 2004, que se describe a continuación: un pellet de 100 µl de eritrocitos infectados se lavó 2 veces con PBS, se fijó con una solución de 4% paraformaldehído - 0.0075% glutaraldehído (Sigma) por 30 min y luego se lavó 2 veces con PBS. Las células se permeabilizaron con una solución de Tritón X100 (Sigma) al 0.1% en PBS por 10 min, seguidamente se realizaron dos lavados con PBS. Se hizo un tratamiento con una solución de NaBH₄ 0.1 mg/ml en PBS por 10 min con el fin de reducir los grupos aldehído de la fijación, luego se lavó dos veces con PBS. Se hizo un bloqueo con una solución de BSA al 3% en PBS por 1 h, seguidamente se incubó con el anticuerpo primario anti-PfMyoB 1:100 en la misma solución de bloqueo y se dejó reaccionar por 1 h. Se hicieron 3 lavados de 5 min en PBS luego de los cuales se incubó con el anticuerpo secundario

acoplado a AlexaFluor™ por 1 h en *buffer* de bloqueo en concentración 1:1000. Diez minutos antes de terminado el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, se adicionó el marcador fluorescente de núcleos DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Thermo) a una concentración de 5 ng/μl. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se montaron con VectaShield HardSet (Vector) en láminas de vidrio pre-tratadas con una solución de poli-L-lisina al 0.1% (Sigma). Las láminas se visualizaron en el microscopio Nikon Eclipse Ti C1Plus del Laboratorio de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá.

- Microscopía inmunoelectrónica

El protocolo que se siguió fue el reportado por Bannister y Kent en 1993 con modificaciones y fue realizado en el laboratorio de Morfología celular del Instituto Nacional de Salud en Bogotá: esquizontes concentrados con Percoll™ se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron por 30 min con una solución de paraformaldehído al 2%-glutaraldehído al 0.1% (Sigma) en medio RPMI 1640, luego se lavaron 3 veces con medio RPMI mediante centrifugación. El pellet se deshidrató por medio de incubación en etanol en concentración creciente de 0 al 95% a -20°C por un período de 2 h, luego, se infiltró con resina LR White (Polysciences) a -20°C toda la noche y se polimerizó a temperatura ambiente por 48 h bajo luz ultravioleta. Los bloques se cortaron en ultramicrotomo y se fijaron en rejillas de níquel de 400 mesh. Para bloquear el marcaje inespecífico las rejillas se incubaron con una solución de BSA al 1% en PBS, luego se incubaron con el anticuerpo primario anti-PfMyoB (dilución 1:50) por 2 h. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario goat anti-rabbit IgG conjugado a partículas de oro de 10 nm (Sigma). Como control se usaron secciones en las cuales se omitió el anticuerpo primario. Para contrastar se utilizó acetato de uranilo al 2% por 2 min y finalmente una breve tinción con citrato de plomo al 0.2%. Las secciones se visualizaron en el microscopio electrónico JEOL 1400 Plus de la Fundación Santafé de Bogotá.

3.6 Ensayo de inmunoprecipitación

Con el fin de establecer qué proteínas se unen a PfMyoB se planteó inmunoprecipitar el complejo con los anticuerpos antiPfMyoB desde extractos de cultivo enriquecido de

esquizontes. La metodología usada fue la siguiente (Harlow y Lane, 2006): Se obtuvieron extractos de proteínas de esquizontes evaluando dos *buffers* de lisis: uno, *buffer* RIPA como se describió anteriormente en el apartado extractos y otro, con *buffer* NP40¹⁴. Los extractos se mezclaron con perlas de proteína A/G unidas a agarosa (GE Healthcare) y se dejaron incubando por 30 min a 4°C con agitación. Los extractos se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min, se recuperaron los sobrenadantes y se cuantificaron por el método de microBradford. Cada inmunoprecipitación se montó en tubo de 2 ml: a 1 mg de extracto se le adicionaron 4 µg de anticuerpo anti-MyoB (ya sea los desarrollados en rata o los obtenidos en GenScript) y se dejó en incubación por 15 h a 4°C con agitación. Se adicionó a cada tubo 25 µl de resina A/G-agarosa y se incubó en hielo con agitación orbital durante 2 h. Se centrifugó la suspensión a 3000 x g por 2 min para recuperar las perlas y los complejos formados sobre ellas, el sobrenadante se reservó para evaluar la fracción no unida. Las perlas se lavaron 4 veces con el correspondiente *buffer* de lisis adicionado con inhibidores de proteasas y 2 veces con PBS. Finalmente las perlas fueron resuspendidas en *buffer* Laemmli para hacer SDS-PAGE, transferencia y WB. Como control del experimento, se realizó una IP sin la adición del anticuerpo, es decir, sólo extracto de proteínas y perlas A/G.

Igualmente, se prepararon muestras de inmunoprecipitación tal y como se describió en el párrafo inmediatamente anterior, se sometieron a SDS-PAGE y el gel se tiñó con CoomassieR-250 (Sigma). Se cortaron bandas diferenciales con respecto al control y se mandaron a analizar por medio de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LS/MS/MS) en Taplin Mass Spectrometry Facility, Harvard Medical School en Boston Mass., USA.

3.7 Ensayos de interacción in vitro de proteínas

3.7.1 Far Western Blot

Este ensayo se basa en la detección por medio de WB de la interacción de dos proteínas; típicamente, una de ellas puede estar haciendo parte de un extracto celular o estar purificada y es llamada presa, y la otra con la que se quiere probar la interacción es

¹⁴ Buffer NP-40: Tris 50 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, NP40 (IGEPAL CA-630) 1%.

llamada carnada. La presa puede separarse por medio de SDS-PAGE (figura 3-3) y transferirse a una membrana, también puede fijarse directamente sobre la membrana en el caso de que esté pura, luego, la membrana se incuba en solución con la carnada con la que se quiere probar la unión. La detección de la interacción se hace por medio de WB usando un anticuerpo para detectar la carnada (Hall, 2004).

En este trabajo, se modificó el método descrito por Wu y col. en 2007, así:

Una membrana de PVDF se activó por medio de un lavado con metanol, luego se lavó con agua y por último se lavó con *buffer* TBS por 5 minutos. Seguidamente se ensambló esta membrana en el equipo de slot blot (MinifoldII, Schleicher and Schuell™) y se pasó *buffer* TBS por las ranuras con ayuda de una bomba de vacío. Se sembró en varias rendijas una de las proteínas recombinantes purificada (presa), en otras se sembró *buffer* TBS, BSA (como control negativo), otra proteína no relacionada (como control negativo) y 200 ng de la proteína que se usa como prueba (carnada) en la incubación como control positivo del WB. Se hizo vacío para permitir que las proteínas se adhirieran a la membrana y se lavó finalmente agregando *buffer* TBS. La membrana se sacó y se incubó

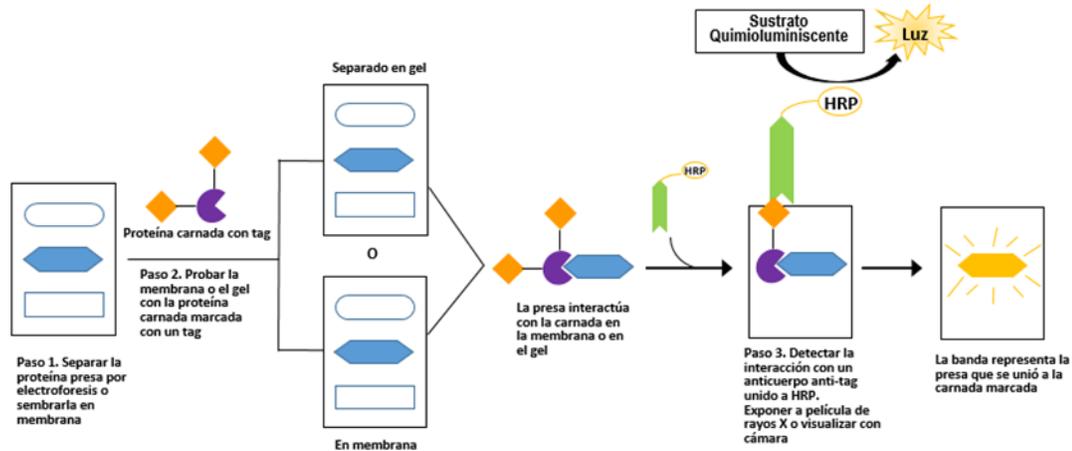


Figura 3-3 Diagrama del ensayo de Far Western Blot para analizar interacciones proteína-proteína. Adaptado de Pierce Protein methods www.thermofischer.com.

en *buffer* de bloqueo: TBST 0.1%- leche descremada al 2%, por una hora a temperatura ambiente. Luego se incubó con la proteína de prueba (carnada), en *buffer* de unión¹⁵, toda la noche a 4°C, con agitación. Después, se hicieron 3 lavados con *buffer* TBST por 10 minutos, se incubó con el anticuerpo primario en *buffer* de bloqueo por 1 h a

¹⁵ Buffer de unión de proteínas: 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.6, 0.5 mM EDTA, 10% glicerol, 0.1% Tween, 2% leche descremada.

temperatura ambiente, se lavó 3 veces con TBST por 10 min cada lavado. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se hicieron 3 lavados con TBST por 10 min y se hizo el revelado de la membrana por medio de DAB.

3.7.2 Pulldown

El ensayo de *pulldown* o de coprecipitación se usa para confirmar interacciones o para detectar interacciones desconocidas de tipo proteína-proteína, es una forma de purificación de afinidad que es similar a la inmunoprecipitación, excepto que en vez de usar un anticuerpo dirigido contra la proteína carnada. En este ensayo (figura 3-4) la proteína carnada está marcada con un *tag* y se captura sobre una resina de afinidad específica para ese *tag*, generando un soporte de afinidad secundario para purificar otras proteínas que interactúan con la proteína carnada. Luego, este soporte se incubó con la o las proteínas presa que se encuentran en solución, por ejemplo un lisado celular. El complejo de proteínas formado se eluye de la resina dependiendo del *tag* usando un analito competitivo o por medio de *buffers* reductores (Einarson et al., 2007).

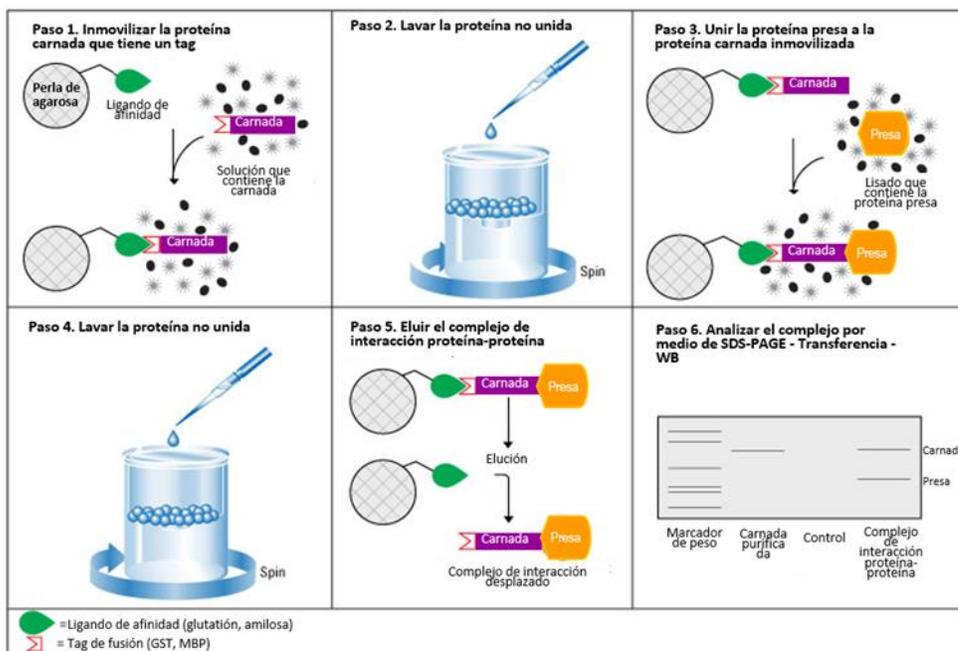


Figura 3-4 Diagrama del ensayo de *pulldown* para analizar o confirmar interacciones proteína-proteína.

Adaptado de Pierce Protein methods, www.thermofischerscientific.com.

- *Pulldown* de proteínas desde cultivos bacterianos

Este ensayo consiste en probar la interacción de dos proteínas recombinantes directamente desde las bacterias que están produciendo las proteínas, es decir, mezclando los cultivos de las bacterias inducidas, haciendo una lisis del pellet obtenido y a partir del sobrenadante capturar una de las proteínas por medio de su *tag* con una resina de afinidad y detectando finalmente la “otra” proteína involucrada mediante WB.

El método usado fue una adaptación del pull down clásico (Einarson et al., 2007):

Se indujeron con IPTG dos cultivos de bacterias transfectadas: uno con un constructo del vector pMAL (MyoB4 o MyoA) y otro con un constructo del vector pGEX (MTIP) cada uno en un volumen de 250 ml de medio LB adicionado con ampicilina y con ampicilina-cloranfenicol, respectivamente, como se describió antes en el apartado de expresión de proteínas recombinantes. Transcurridas 3 horas de inducción a 37°C, los dos cultivos fueron mezclados y se centrifugaron a 4000 rpm por 20 min. El pellet de bacterias obtenido se resuspendió en *buffer* de columna de amilosa, con inhibidores de proteasas (cóctel + PMSF) y se congeló a -20°C por 15 h. Luego, el pellet se descongeló y se sonicó con pulsos de 20 s ON – 10 s OFF por 10 min, a 4°C. Se obtuvo una suspensión clara del sonicado y se centrifugó a 10000 x g por 15 min. El extracto obtenido se incubó con 2 ml de resina de amilosa y se procedió con la purificación por cromatografía como anteriormente se explicó en el apartado 3.2.3. Las fracciones obtenidas se corrieron en gel de SDS-PAGE, se hizo transferencia y WB usando anticuerpos dirigidos contra el *tag* GST y MBP, con el fin de detectar o no las proteínas de interés.

Igualmente, se hizo el mismo experimento usando proteínas control, como MBP con MTIP, la proteína MyoB2 (no relacionada en la interacción con MTIP) con MTIP, la proteína MyoB4 con el *tag* de GST, con el fin de descartar uniones no-específicas o artefactos.

- *Pulldown* de proteínas recombinantes purificadas

Así como en el anterior apartado, el principio básico de este experimento es el mismo; evaluar posibles interacciones entre dos proteínas candidatas, en este caso, proteínas recombinantes purificadas con *tags* diferentes para poder ser reconocidas específica y diferencialmente.

El método seguido fue una modificación del método clásico de *pulldown* con proteínas de fusión al *tag* GST (Sambrook y Russell, 2006):

100 µg de proteína recombinante MTIP se mezclaron con 50 µl de resina de glutatión-agarosa (Thermo) en 500 µl de *buffer* de columna de GST y se incubó por 3 h a 4°C con agitación. Luego, se centrifugó por 2 min a 14000 rpm y esta resina se dividió en dos tubos: a uno de ellos se adicionó 100 µg de MyoB4 y al otro 100 µg de MBP y se incubaron por 15 h a 4°C con agitación. Después de 5 lavados con *buffer* columna GST más 0.5% de Tritón X-100, cada tubo se centrifugó, se eliminó el sobrenadante; la resina se mezcló con *buffer* Laemmli y se incubó a 94°C por 5 min. El sobrenadante se analizó por medio de SDS-PAGE, se transfirió a membrana de PVDF y se probó por WB con anticuerpo anti-MBP. Como control se usó la mezcla de resina GST con la proteína MyoB4 al igual que resina con MBP.

- *Pulldown* con extracto de proteínas de esquizontes.

Se obtuvo un extracto de proteínas de esquizontes usando el *buffer* de extracción con NP-40 (ver pie de página 14), con el fin de evitar el SDS que contiene el *buffer* de extracción RIPA, ya que interfiere con las interacciones proteína-proteína. El procedimiento que se siguió fue una adaptación del descrito por Douse y col. en 2012 y se describe a continuación:

Se mezclaron en tubo eppendorf: 100 µl de resina de amilosa con 100 µg de recombinante MyoB4 en 1 ml de *buffer* de columna de amilosa, y el tubo se incubó por 5 h con rotación a 4°C. Luego, se adicionaron 300 µg de extracto de esquizontes y el tubo se incubó por 15 h a 4°C con agitación. Después de 5 lavados con *buffer* NP-40, el tubo se centrifugó, se eliminó el sobrenadante; la resina se mezcló con *buffer* Laemmli y se incubó a 94°C por 5 min. El sobrenadante se analizó por medio de SDS-PAGE, se transfirió a membrana de PVDF y se probó por WB con anticuerpo anti-MTIP. Como control se usó la mezcla de resina de amilosa con la proteína MBP y el extracto de esquizontes y se procesó como se describió anteriormente.

3.7.3 Experimento de competencia de PfMyoB y PfMyoA por el sitio de unión a MTIP

Con el fin de evaluar la capacidad que tienen las colas de las proteínas PfMyoA y PfMyoB para unirse a MTIP bajo las mismas condiciones experimentales, se usó el

método de *Far Western Blot* para demostrar la interacción en el contexto de competencia.

La metodología que se usó fue una adaptación del trabajo de Williamson y Bass del 2015 y fue la siguiente:

Una membrana de PVDF se activó por medio de un lavado con metanol, luego se lavó con agua y por último se lavó con *buffer* TBS por 5 minutos. Seguidamente se ensambló esta membrana en el equipo de slot blot (MinifoldII, Schleicher and Schuell™) y se pasó *buffer* TBS por las ranuras con ayuda de una bomba de vacío. Se sembró como carnada la proteína MTIP en varias ranuras y en otras se sembró *buffer* TBS. Se sembraron unas ranuras adicionales con 200 ng de MyoAMBP y 200 ng de MyoB4 como controles positivos del WB. Se hizo vacío para permitir que las proteínas se adhirieran a la membrana y se lavó finalmente agregando *buffer* TBS. La membrana se sacó y se cortó de modo que se obtuvieron piezas con parejas que contenían un pozo con MTIP y otro con *buffer* TBS. Cada pieza de membrana se dispuso separadamente en una placa de 12 pozos y cada una se incubó en *buffer* de bloqueo: TBST 0.1%- leche descremada al 2%, por una hora a temperatura ambiente. Luego, a todos los pozos se adicionó la proteína MyoAHis a una cantidad fija de 1.25 nmoles y también la proteína MyoB4 en diferentes cantidades con *buffer* de unión (ver composición en pie de pagina 15) y se incubó toda la noche a 4°C, con agitación. Todo este montaje en las membranas se hizo por duplicado con el fin de tener 2 sets de membranas. Después, se hicieron 3 lavados con *buffer* TBST por 10 min, luego, un set de membranas se incubó con el anticuerpo primario anti-MBP y el otro set con anti-HIS en *buffer* de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con TBST por 10 min cada lavado. Luego, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se hicieron 3 lavados con TBST por 10 min y se hizo el revelado de las membranas por medio de DAB. En esta instancia cabe anotar que se tuvo mucho cuidado con el tiempo de revelado ya que como las membranas de este experimento son incubadas separadamente se revelaron todas bajo las mismas condiciones y a un tiempo fijo; esto, con el fin de generar resultados comparables entre las membranas.

3.8 Experimento de inhibición de la interacción MTIP-MyoB por medio de péptidos sintéticos

Se diseñaron 2 péptidos correspondientes a la secuencia de aminoácidos de los motivos IQ de PfMyoB (ver tabla 3-4). Para cada péptido se diseñó adicionalmente un péptido control con su secuencia dispuesta al azar usando los mismos aminoácidos. Estos péptidos se compraron a una empresa de biotecnología (GenScript, Piscataway, NJ, USA). El diseño experimental se planteó como un ensayo de *Far Western Blot* en donde se quiso monitorear la interacción MTIP-MyoB y la inhibición de esa interacción al incubar las proteínas con los péptidos candidatos.

El experimento se hizo con la siguiente metodología:

Una membrana de PVDF se activó por medio de un lavado con metanol, luego se lavó con agua y por último se lavó con *buffer* TBS por 5 min. Seguidamente se ensambló esta membrana en el equipo de slot blot (MinifoldIII, Schleicher and Schuell™) y se pasó *buffer* por las ranuras con ayuda de una bomba de vacío. Se sembró como carnada la proteína MTIP en varias ranuras y en otras se sembró *buffer* TBS. Se sembraron unas ranuras adicionales con 200 ng de MyoB4 como control positivo del WB. Se hizo vacío para permitir que las proteínas se adhirieran a la membrana y se lavaron finalmente con *buffer* TBS. La membrana se sacó y se cortó de modo que se obtuvieron piezas que contenían un pozo con MTIP. Cada pieza de membrana se dispuso separadamente en una placa de 12 pozos y cada una se incubó en *buffer* de bloqueo: TBST 0.1%- leche descremada al 2%, por una hora a temperatura ambiente. Luego, a todos los pozos se les adicionó *buffer* de unión (ver composición en pie de pagina 15) con la proteína MyoB4 a una concentración fija de 5 µg y los péptidos en diferentes cantidades; se incubaron toda la noche a 4°C con agitación. Cumplido este tiempo, se hicieron 3 lavados con *buffer* TBST por 10 min, luego, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-MBP en *buffer* de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con TBST por 10 min cada lavado. Luego, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se hicieron 3 lavados con TBST por 10 min y se hizo el revelado de las membranas por medio de DAB. En este ensayo también se tomaron las precauciones con el tiempo de revelado de las membranas como en el apartado anterior.

Tabla 3-4 Secuencia de los péptidos sintéticos diseñados. IQ (secuencia del IQ de PfMyoB), IQRAN (secuencia de aa al azar de IQ), IQp (secuencia del IQ putativo de PfMyoB), IQpRAN (secuencia de aa al azar de IQp).

Nombre	Secuencia	Descripción
IQ	LQLAQAYFRKYKYI	Modificaciones químicas: Acetilación N-terminal, Amidación C-terminal. Pureza: >95%. Eliminación del ácido fluoroacético
IQRAN	ALRYKAKQIYLQYF	
IQp	LCCITSALIMKIKKKR	
IQpRAN	KTACLKCKILKMKIRI	

3.9 Bioinformática

3.9.1 Predicción de estructura tridimensional de PfMyoB

Con herramientas de bioinformática se realizó un análisis de la secuencia de PfMyoB (PF3D7_0503600) extraída de la base de datos PlasmoDB (www.plasmodb.org): sobre la secuencia se definieron los motivos y dominios conservados usando Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), además se realizó la predicción de estructura secundaria usando PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Jones, 1999). La predicción de estructura 3D se hizo por multiple threading con el programa I-TASSER Versión 4.4 (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang et al., 2015). Con este acercamiento se usa la secuencia primaria de la proteína problema para buscar pequeñas plantillas estructurales en el Protein Data Bank (PDB) (www.pdb.org) y construir modelos atómicos completos por ensamblaje iterativo de las plantillas halladas. Finalmente, el modelo 3D obtenido se sometió a minimización de energía con el programa YASARA force field en www.yasara.org (Krieger y Vried, 2014) y su consistencia interna y confiabilidad fue validada usando PROCHECK (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>) (Laskowski et al., 1993), ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (Wiederstein y Sippl, 2007) y ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) (Colovos y Yeates, 1993).

También se realizó una comparación de la secuencia de PfMyoA (PF3D7_1342600) con PfMyoB por medio de un alineamiento pareado, las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal Omega versión 1.2.1, en el sitio <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Sievers y Higgins, 2014) y el alineamiento

resultante se preparó para su visualización por medio del programa Bioedit versión 7.2.5 (Hall, 1999). Al igual que para PfMyoB, se predijo la estructura en 2D y 3D para PfMyoA con las herramientas anteriormente descritas.

3.9.2 Predicción de la interacción entre MTIP y PfMyoB

Se realizó un estudio de simulación de *docking* con el fin de establecer si PfMyoB podía interactuar con MTIP. Primero, de la base de datos Protein Data Bank (www.pdb.org) se tomó el modelo 4AOM, el cual corresponde al complejo formado entre las proteínas PfMyoA (residuos 799 a 816) y MTIP (residuos 60 a 204), ambas de *P. falciparum*. A partir de él, se extrajo la estructura 3D de MTIP usando PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC). Luego, también usando PyMOL y a partir del modelo 3D obtenido para PfMyoB en este estudio, se extrajeron las regiones homólogas a los motivos IQ de PfMyoA propuestos por Farrow y col. en 2011. Los fragmentos extraídos fueron LQLAQAYFRKYKYI (IQ, residuos 784-797, LCCITSALIMKIKKR (IQ putativo, residuos 760-775) y otro fragmento que contenía los dos IQ (residuos 760-801).

A cada estructura extraída le fueron adicionados los hidrógenos y las cargas Gasteiger usando AutoDockTools4 (Morris et al., 2009) las estructuras fueron centradas usando el script `pdb_centermass.py` (<http://code.google.com/p/pdb-tools/>) y el *docking* molecular se hizo con la herramienta Patchdock (Schneidman-Duhovny et al., 2005). Los 100 mejores modelos para esta interacción se refinaron por medio de la aplicación Firedock (Andrusier et al., 2007) y se eligió el mejor modelo con base en los valores de energía.

3.9.3 Predicción de posibles cadenas livianas de miosina en el genoma de *P. falciparum*

Se usó el perfil Hidden Markov Model (HMM) PTHR23048 obtenido de la base de datos Panther (www.pantherdb.org), este perfil agrupa 168 secuencias de la familia de proteínas cadenas livianas de miosina. Con este perfil se realizó una búsqueda de proteínas similares en la base de datos de proteínas anotadas del genoma de *P. falciparum* versión 28 (plasmodb.org), usando el software HMMER v.3.1b2 en entorno LINUX. Se escogieron las secuencias con mejor score y a ellas se les realizó la predicción de estructura terciaria usando el servidor Swissmodel

(<https://swissmodel.expasy.org/>). Se realizó una comparación de las secuencias halladas por medio de un alineamiento múltiple en Clustal omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y se evaluaron por medio de un análisis filogenético realizado en MEGA7 (www.megasoftware.net). Se hizo una búsqueda de motivos y dominios conservados de algunas de las secuencias en el sitio Prosite (<http://prosite.expasy.org/>).

4. Resultados y discusión

PfMyoB es estructuralmente similar a PfMyoA

4.1 Bioinformática I: modelamiento tridimensional de las miosinas PfMyoB y PfMyoA.

En este estudio se usaron diferentes herramientas computacionales con el fin de analizar estructuralmente la proteína PfMyoB y compararla con la ya bien estudiada PfMyoA. A pesar de que se tienen datos estructurales de la cola de PfMyoA a nivel de cristalografía de rayos X, estos son sólo de una pequeña región de 17 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal (Douse et al., 2012). Ese péptido fué obtenido de forma recombinante y no se conocen modelos tridimensionales de la proteína completa. Estudiar la naturaleza estructural *in silico* de estas miosinas de *P. falciparum* para nosotros se constituyó en un punto de partida para el trabajo experimental que se presenta en este documento. Primero, se realizó un alineamiento pareado de las secuencias (Figura 4-1) el cual mostró que PfMyoA (818 aa) y PfMyoB (801 aa) tienen 35.8% de identidad y 71.2% de similaridad. En la figura 4-1 pueden verse zonas de alta conservación de secuencia sombreadas en colores negro y gris, y están señalados los motivos característicos de miosinas: el dominio clásico de miosinas (SGESG[A/S]GKTEA) (cuadro rojo), el sitio de unión a nucleótido (LEAFGNAKT) (cuadro azul) y el sitio de unión actina (FI[R/K]CIKPNE) (cuadro amarillo). Igualmente se señalan los motivos IQ (línea púrpura), que es la secuencia de PfMyoA a la cual se une MTIP (Bosch et al., 2006) e IQ putativo (línea verde), secuencia que fue propuesta en PfMyoA como posible sitio de interacción a cadenas livianas pero que aún no ha sido demostrado (Farrow et al., 2011). En el presente trabajo se tomaron esas mismas zonas en PfMyoB para estudiar su posible papel como motivos IQ, estos resultados serán mostrados posteriormente. Por otro lado, se hizo una simulación de estructura secundaria para las dos proteínas resultando que tienen una proporción de alfa hélices, hojas beta plegadas y estructuras

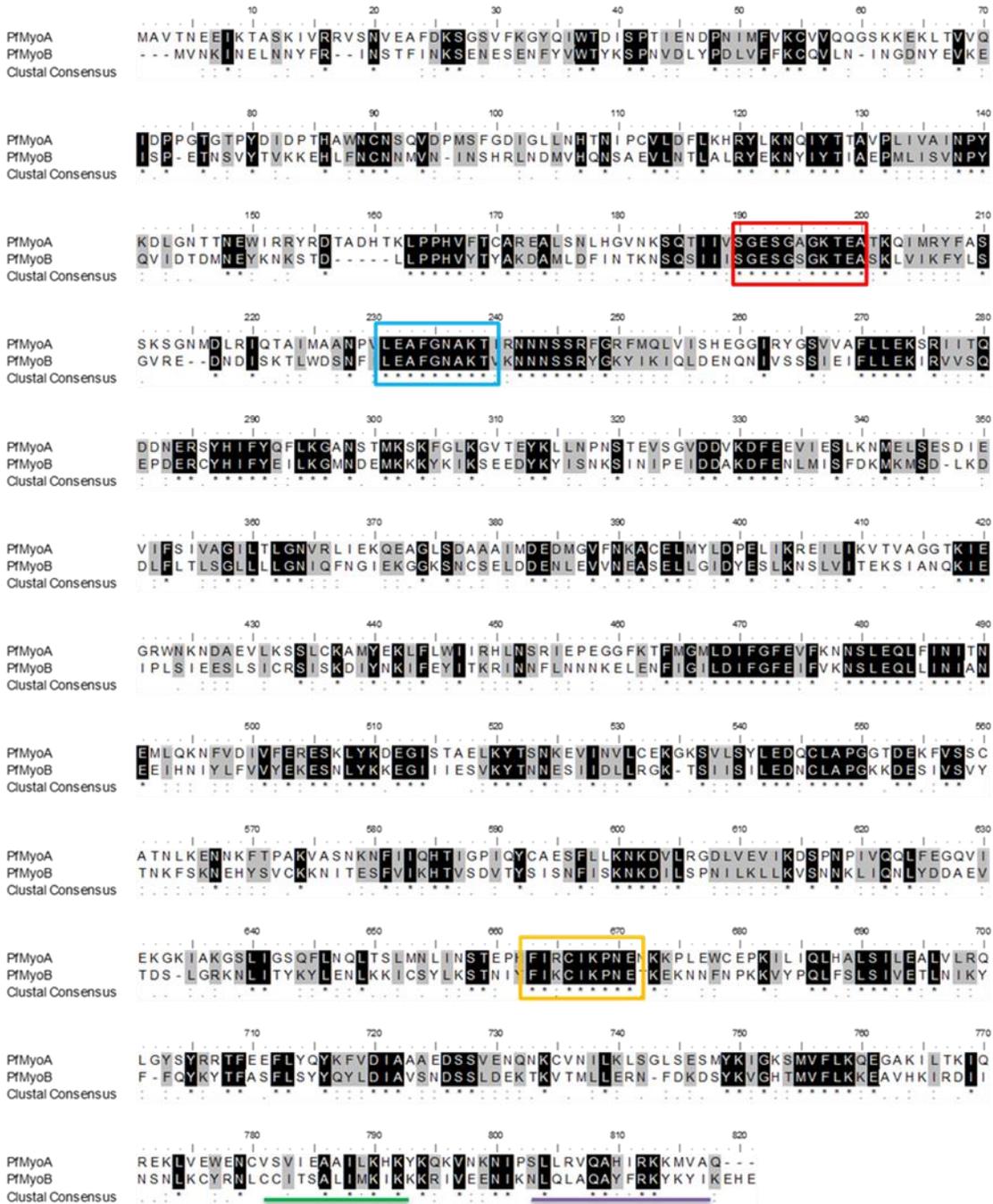


Figura 4-1 Alineamiento pareado de la secuencia de aminoácidos de PfMyoA y PfMyoB, obtenido mediante Clustal Omega.

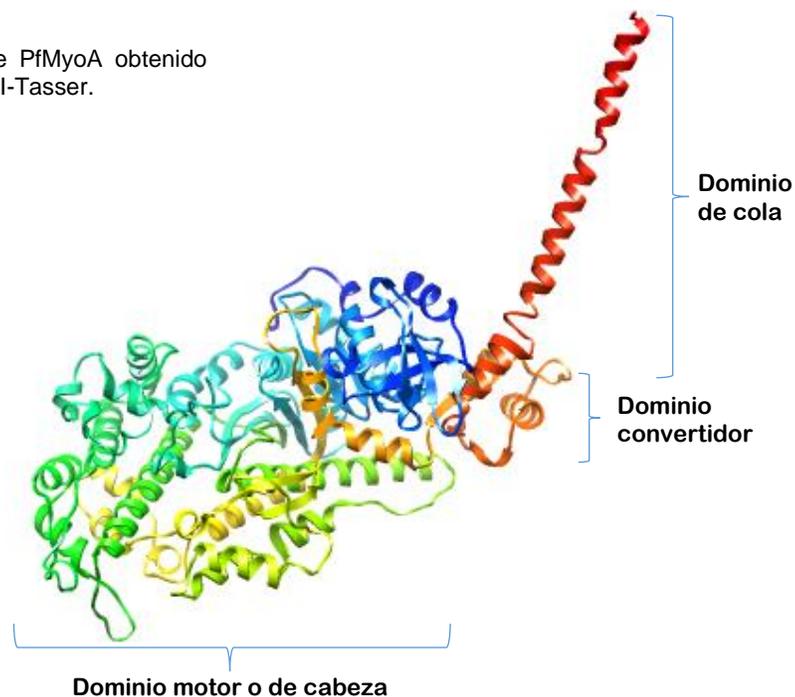
La imagen del alineamiento fue generada en Bioedit v. 7.2.5. Caja roja: dominio común de las miosinas, Caja azul: motivo de unión a nucleótido, Caja amarilla: motivo de unión actina. La línea purpura señala el motivo IQ1 (de unión a MTIP) y la línea verde señala otro posible motivo IQ, ambos asociados a PfMyoA (Farrow et al., 2011). El * indica aa idénticos, : indica aa conservados y . indica aa semiconservados.

coiled coil de 45%, 13% y 42% para PfMyoA, y de 44%, 13% y 43% para PfMyoB. Estos resultados indican que las estructuras tridimensionales de PfMyoA y PfMyoB son muy

similares, pese a las diferencias en su secuencia. Para la predicción de las estructuras terciarias de PfMyoA y PfMyoB se usaron programas basados en modelamiento por homología como SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) y Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>), sin embargo, en la base de datos que usan estos programas no hay proteínas plantilla adecuadas para hacer el modelamiento: la mejor plantilla para PfMyoA tenía una identidad de sólo el 27% y para PfMyoB del 28%. Igualmente, el tamaño de las proteínas no es admitido por algunos servidores de modelamiento, por ello se decidió usar la interfase I-Tasser, que utiliza el método de *threading* para el modelamiento de estructuras. El método de *threading* ofrece una gran ventaja para las proteínas que como en este caso no tienen homólogos de secuencia en las bases de datos, ya que el modelamiento se basa en el plegamiento de secciones de proteína y su alineamiento contra la estructura de pequeñas secciones de proteínas plantilla (Khor et al., 2015).

Se obtuvieron varios modelos para cada proteína, cada uno se sometió a minimización de energía antes de escoger aquellos con mejor score para PfMyoA y PfMyoB (figura 4-2 y 4-4). En la figuras 4-2 y 4-4 puede observarse que estas proteínas tienen regiones estructurales bien discriminadas, esto es, una zona globular conocida como dominio motor o cabeza de miosina y otra región de una única alfa hélice que corresponde a la

Figura 4-2 Modelo 3D de PfMyoA obtenido por medio de *threading* en I-Tasser.



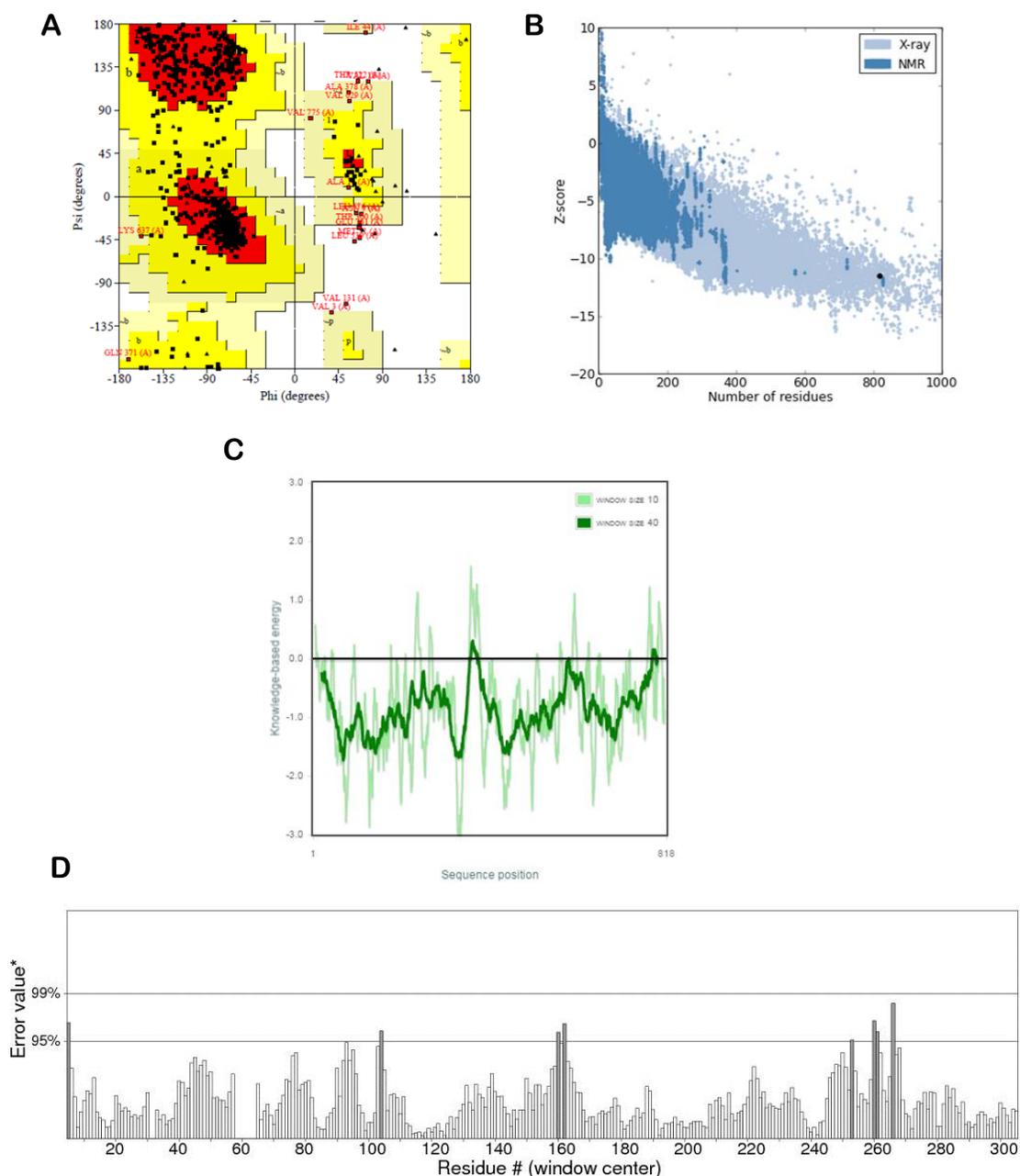
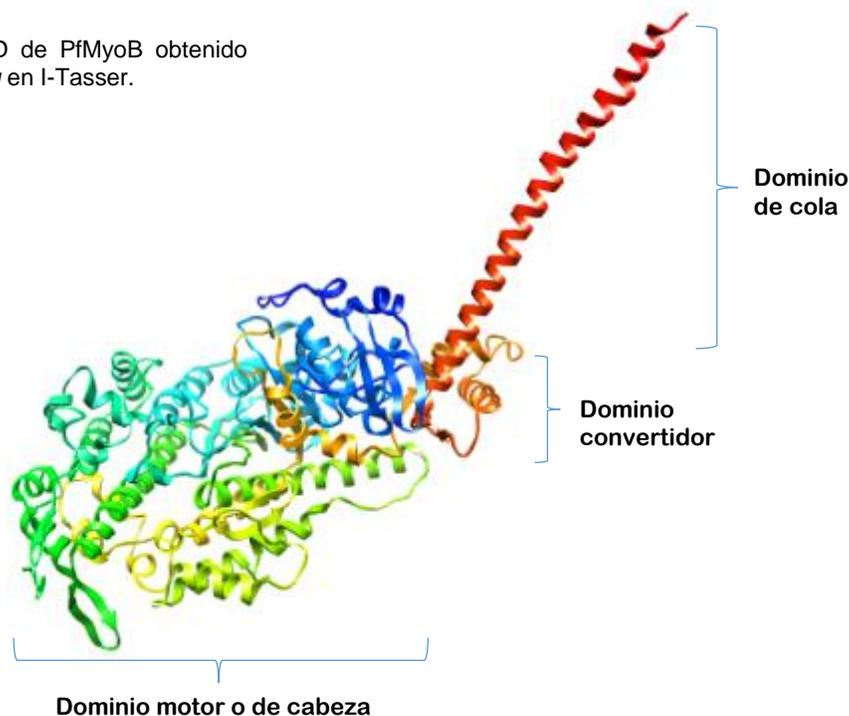


Figura 4-3 Validación de la estructura tridimensional para PfMyoA.

A: Diagrama de Ramachandran, los puntos negros indican los residuos que se encuentran en las regiones favorecidas (rojo), regiones permitidas (amarillo), regiones generosamente permitidas (amarillo claro) y regiones no permitidas (blanco). **B:** Z-Score obtenido con ProSA a partir del modelo 3D generado. El Z-Score es mostrado como un punto negro sobre un diagrama de Z-scores experimentales para proteínas que se encuentran en el PDB (Protein Data Bank). La zona de la gráfica en color azul claro corresponde a estructuras de proteínas obtenidas con rayos X y la zona azul oscura a estructuras determinadas por RMN. **C:** Gráfica de energías individuales de residuos obtenida con ProSA (tamaño de ventana de 40 residuos en línea verde oscura y ventana de 10 residuos en verde claro). Valores positivos indican partes erróneas o problemáticas de la estructura. **D:** Evaluación de la calidad total del modelo evaluado mediante el programa ERRAT. Se muestra una parte representativa de residuos de la proteína en el eje X. En el eje de error (Y) hay dos líneas horizontales que delimitan las regiones que pueden ser rechazadas con un 95 y un 99% de confiabilidad.

Figura 4-4 Modelo 3D de PfMyoB obtenido por medio de *threading* en I-Tasser.



zona de cuello y/o cola de miosina, igualmente se reconoce el dominio convertidor o de bisagra que comunica la cabeza y la cola y permite su movimiento (Holmes, 2008). Cuando se generan modelos tridimensionales de proteínas por medio de herramientas de bioinformática es necesario evaluar su validez, para ello, se usaron tres herramientas que invariablemente indicaron que los modelos propuestos tienen una buena calidad, esta evaluación se juzga con base en valores obtenidos de estas herramientas que pueden verse a modo de resumen en la tabla 4-1 y de forma gráfica en las figuras 4-3 y 4-5 para PfMyoA y PfMyoB, respectivamente. El análisis PROCHECK del diagrama de Ramachandran (Fig 4-3 y 4-5 A) reveló que los modelos tienen una buena consistencia geométrica. De acuerdo con el diagrama, cerca del 85% de los residuos están localizados en la región más favorecida para los valores de ángulo phi (Φ) y psi (Ψ) de sus enlaces peptídicos, entre 11% y 13% en regiones permitidas, entre 1.3% y 1.5% en las regiones generosamente permitidas y sólo 0.8% de los residuos están en las regiones no permitidas. Según Laskowsky y col. (1993) el G-factor de un buen modelo debe ser mayor a -0.5, las estructuras obtenidas presentan valores de 0.03 y 0.01, lo que indica que los modelos obtenidos son confiables.

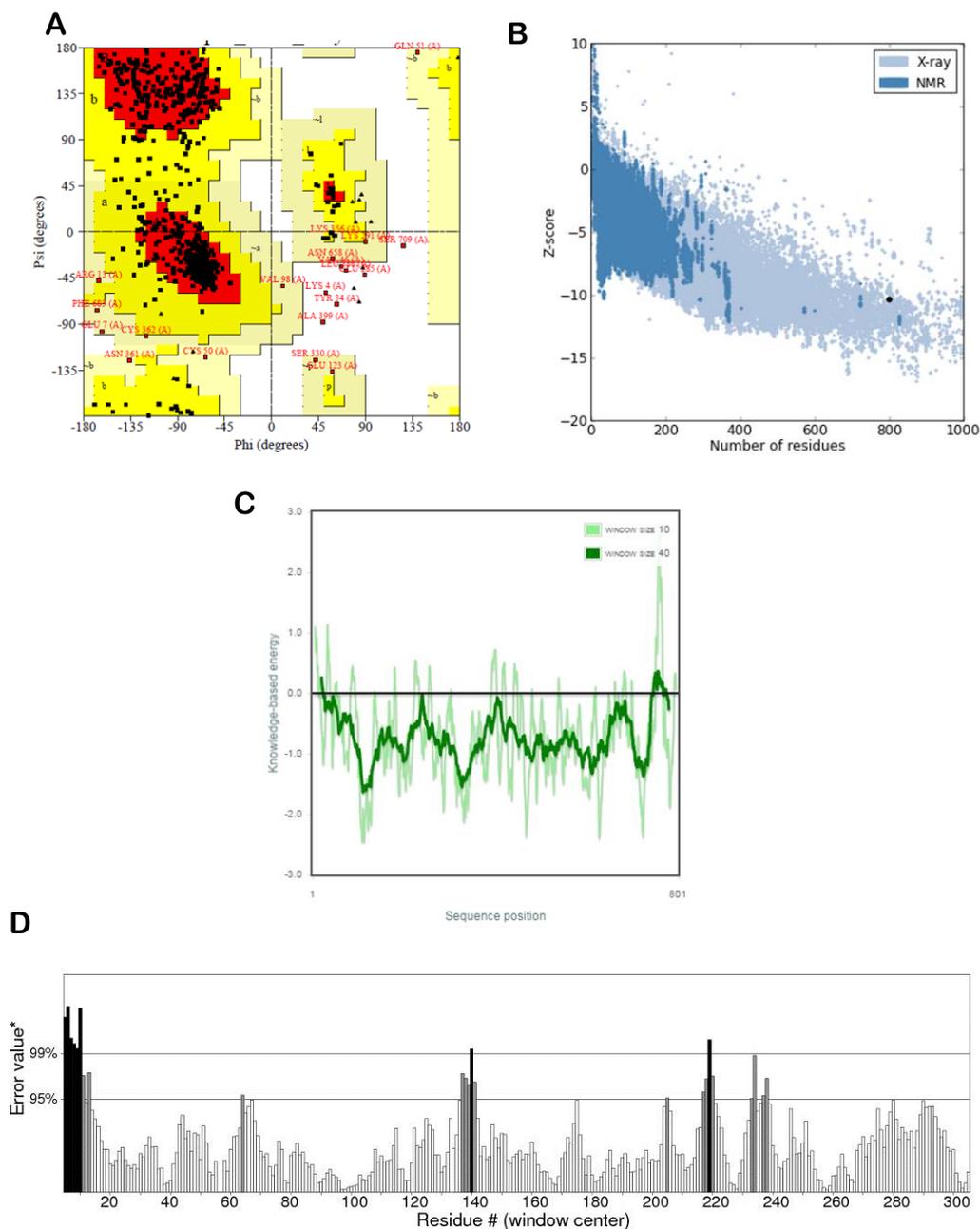


Figura 4-5 Validación de la estructura tridimensional para PfMyoB.

A: Diagrama de Ramachandran, los puntos negros indican los residuos que se encuentran en las regiones favorecidas (rojo), regiones permitidas (amarillo), regiones generosamente permitidas (amarillo claro) y regiones no permitidas (blanco). **B:** Z-Score obtenido con ProSA a partir del modelo 3D generado. El Z-Score es mostrado como un punto negro sobre un diagrama de Z-scores experimentales para proteínas que se encuentran en el PDB (Protein Data Bank). La zona de la gráfica en color azul claro corresponde a estructuras de proteínas obtenidas con rayos X y la zona azul oscura a estructuras determinadas por RMN. **C:** Gráfica de energías individuales de residuos obtenida con ProSA (tamaño de ventana de 40 residuos en línea verde oscura y ventana de 10 residuos en verde claro). Valores positivos indican partes erróneas o problemáticas de la estructura. **D:** Evaluación de la calidad total del modelo evaluado mediante el programa ERRAT. Se muestra una parte representativa de residuos de la proteína en el eje X. En el eje de error (Y) hay dos líneas horizontales que delimitan las regiones que pueden ser rechazadas con un 95 y un 99% de confiabilidad.

Tabla 4-1 Valores de calidad obtenidos para la evaluación de las estructuras 3D de PfMyoA y PfMyoB.

Indicador de validación	PfMyoA	PfMyoB
Diagrama de Ramachandran		
Residuos en las regiones más favorecidas	86.3%	84.3%
Residuos en regiones permitidas adicionales	11.4%	13.1%
Residuos en regiones generosamente permitidas	1.6%	1.7%
Residuos en regiones no permitidas	0.7%	0.9%
G-factor total	0.03	0.01
ProSA Z-Score	-11.54	-10.36
ERRAT	97.43	95.769

Por otra parte, el análisis ProSA para los modelos PfMyoA y PfMyoB reveló Z-scores de -11.54 y -10.36 respectivamente, los cuales están dentro del rango de calificación encontrada típicamente para estructuras de proteínas obtenidas experimentalmente de tamaño similar. Las figuras 4-3C y 4-5C muestran la calidad local de los modelos, expresada como la energía de cada residuo versus su posición en la secuencia. El programa calcula la energía promedio de cada 40 residuos (línea verde oscura) y la asigna al residuo central. En las figuras se observa que los valores de energía calculados para la gran mayoría de los aminoácidos fueron negativos, lo cual está en concordancia con estructuras correctamente plegadas (Wiederstein y Sippl, 2007). Se usó también el programa ERRAT que usa un algoritmo de verificación de estructuras, resultando que el factor de calidad de las estructuras propuestas fue del 97% para PfMyoA y del 95% para PfMyoB. Estructuras de muy alta resolución generalmente producen valores del 95% y superiores (Colovos y Yeates, 1993). Todas estas herramientas de validación sugieren que los dos modelos 3D son robustos y que pueden aceptarse como confiables. Una vez validados los modelos, se realizó la superposición de las dos estructuras tridimensionales (figura 4-6) y se encontró que son casi idénticas, con un RMSD (Root Mean Square Deviation) de 1.172. Valores de RMSD en el rango de 1 a 3 significan que las dos estructuras comparadas son similares (Bergeron, 2003).

Estos resultados predicen que las proteínas están estrechamente relacionadas dado que a nivel de estructura primaria y secundaria los porcentajes de similitud son altos y que en su estructura terciaria prácticamente se arreglan de forma idéntica, esto puede sugerir que las proteínas podrían realizar funciones similares (Gan et al., 2002; Watson et al., 2005; Lee et al., 2007).

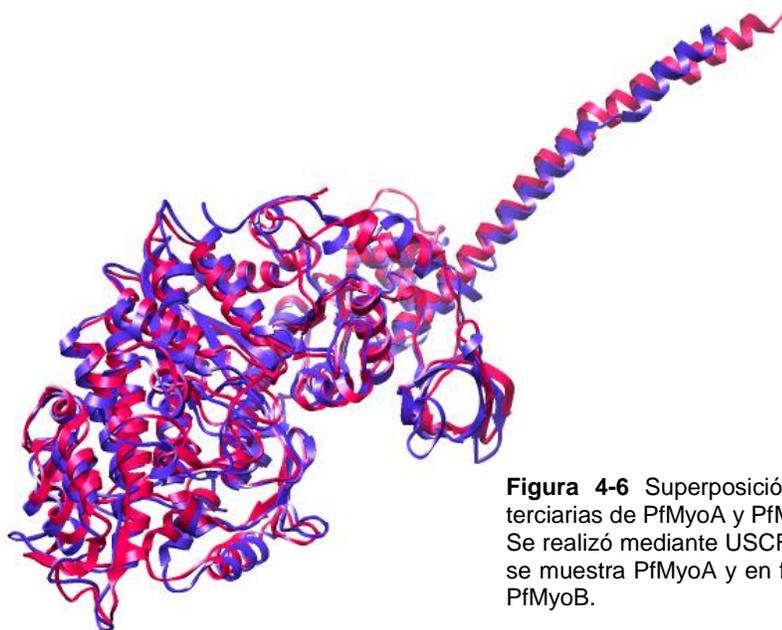


Figura 4-6 Superposición de las estructuras terciarias de PfMyoA y PfMyoB. Se realizó mediante USC-Chimera, en púrpura se muestra PfMyoA y en fucsia la estructura de PfMyoB.

4.2 Herramientas moleculares para la detección y localización de PfMyoB en extractos y células

Primero se presentan los resultados para la obtención de las herramientas moleculares que fueron indispensables en el desarrollo de varios objetivos del trabajo, estas fueron proteínas recombinantes de PfMyoB, PfMyoA y MTIP: cuatro proteínas recombinantes de diferentes regiones de PfMyoB, todas con MBP como proteína de fusión, llamadas MyoB1, MyoB2, MyoB3 y MyoB4 (las secuencias de esas cuatro recombinantes abarcaban los residuos 1 a 346, 357 a 503, 671 a 801 y 740 a 801 de PfMyoB, respectivamente); dos proteínas recombinantes del dominio de cola de PfMyoA (residuos 457-518), una con un tag de histidina (MyoAHis) y otra con una tag MBP (MyoAMBP) y una proteína recombinante que abarcaba la secuencia completa de MTIP y tenía un tag GST (MTIP). Con el fin de usarlas como control en algunos experimentos, también se produjeron las proteínas MBP y GST. A continuación, las proteínas MyoB1, MyoB2, MyoB4 y MyoAMBP fueron usadas para obtener anticuerpos policlonales en rata. A estos anticuerpos se sumaron dos anticuerpos policlonales producidos en conejo por GenScript, los cuales fueron obtenidos a partir de dos péptidos sintéticos que correspondían a los residuos 56 a 69 y 720-733 de PfMyoB. Esta estrategia de obtención de proteínas recombinantes con diferentes tags y de producción de anticuerpos en

diferentes modelos animales permitió usar las proteínas de forma simultánea y detectarlas (en extractos protéicos y en ensayos de interacción *in vitro*) individualmente.

4.2.1 Producción de proteínas recombinantes

La obtención de proteínas recombinantes solubles de *P. falciparum* no es una tarea fácil. Es muy común que las proteínas de este parásito producidas en sistemas heterólogos como el bacteriano hagan parte de la fracción insoluble; por eso, en la mayoría de los casos las proteínas se obtienen desnaturalizadas dadas las condiciones agresivas (urea, guanidina, etc.) que se deben usar para extraerlas de cuerpos de inclusión (Mehlin et al., 2006). En este trabajo se probó el sistema de expresión pMAL para producir proteínas recombinantes de miosinas con un *tag* de MBP, también se usó el sistema pGEX con el que se obtienen proteínas de fusión al *tag* GST para obtener la recombinante de MTIP y el tradicional pET que produce proteínas con una cola de 6 histidinas.

- PfMyoB

El gen que codifica para la PfMyoB tiene un tamaño de 3493 pb y presenta 7 intrones y se encuentra en el cromosoma 5 del genoma de *P. falciparum* entre las posiciones 146,639 a 150,131. El ARNm posee 2406 pb y sobre él se amplificaron los diferentes fragmentos a ser clonados y expresados. A continuación se presenta como ejemplo la secuencia de los resultados para la proteína MyoB4, desde la obtención del fragmento por RT-PCR hasta la expresión y purificación de la proteína. La estrategia para producir las otras proteínas recombinantes fue la misma.

Los *primers* usados para amplificar el fragmento fueron: MyoBColaF 5'-CATATGAAGGAAGCGGTTTCATAAAAT-3' y MyoBColaR 5'-ggcgcCCTGCAGGTTATTCGTGTTCCCTTAATAT-3' para producir una sección de 188 pb (figura 4-7A) que fue ligada en el vector pJET1.2. Con el producto de ligación se transformaron bacterias TOP10, las colonias positivas se rastrearon con los *primers* del vector 14 y 15 del anexo A. Se obtuvo amplificación en 6 de las 8 colonias rastreadas ya que se observó una banda de 312 pb correspondiente al fragmento de 188 pb más la amplificación de los *primers* sobre el vector de 124 pb (Figura 4-7B); se eligió una de esas colonias para aislar el plásmido recombinante.

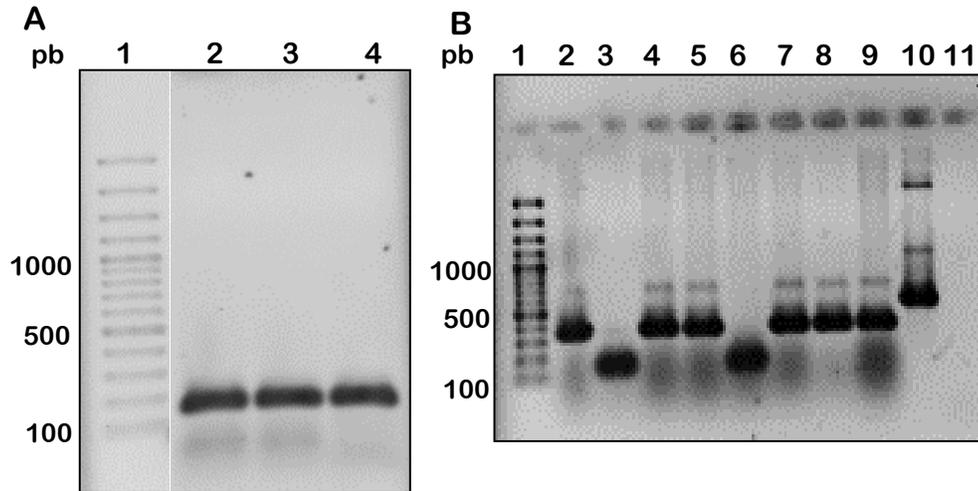


Figura 4-7 Obtención del fragmento MyoB4 y clonación en vector pJET.

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. A. Amplificación del fragmento de MyoB4: carril 1: marcador de peso (ladder) 100 pb; carriles 2-4: producto de RT-PCR de 188 pb. B. Rastreo de colonias que poseen plásmido pJET1.2-MyoB4: carril 1: ladder de 100 pb; carriles 2, 4, 5, 7-9: amplificación positiva con *primers* del vector 312 pb; carriles 3 y 6: amplificación negativa; carril 10: control positivo, carril 11: control negativo.

Posteriormente, el plásmido recombinante de pJET-MyoB4 y el plásmido pMALc5X se digirieron con las endonucleasas NdeI y SbfI con el fin de obtener los extremos de restricción compatibles para una nueva ligación y así obtener el constructo pMAL-MyoB4, con el cual se transformaron bacterias NEB Express. Las colonias positivas de la transformación se rastrearon con los *primers* pMAL 16 y 17 del Anexo A, el resultado se observa en la figura 4-9 y muestra que solo una colonia tenía el plásmido recombinante porque se amplificó una banda de 422 pb correspondiente al fragmento de 188 pb más la amplificación de los *primers* sobre el vector de 234 pb. A ese clon transformante se le hizo purificación de ADN plasmídico y se mandó a secuenciar con el fin de verificar la identidad de la secuencia y que no hubiese errores, como se muestra en la figura 4-8.

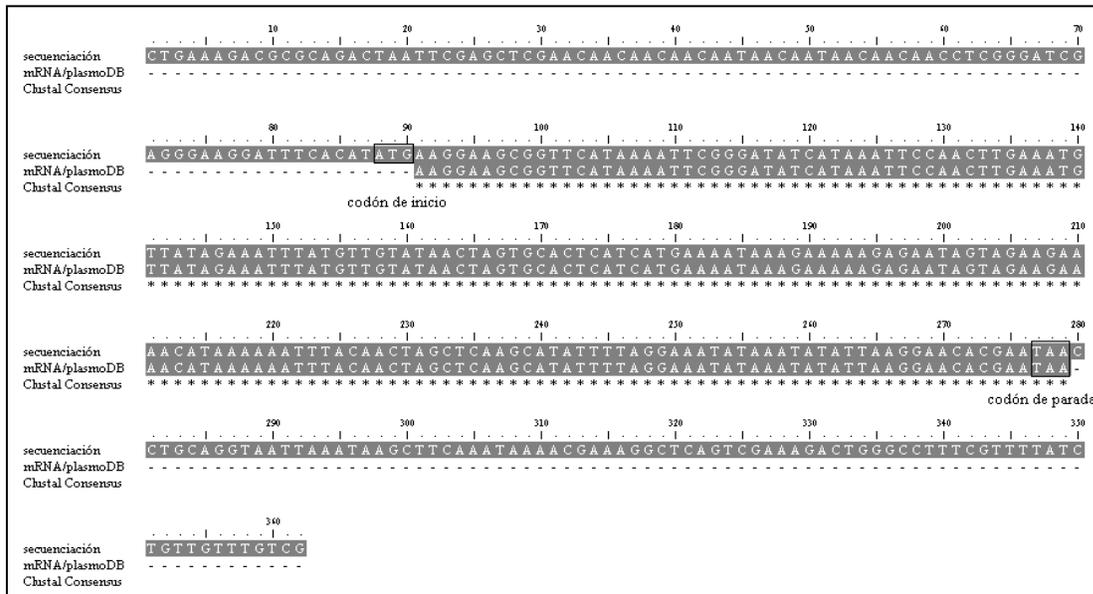


Figura 4-8 Alineamiento de la secuencia del ARNm del fragmento del gen de PfMyoB con el resultado de la secuenciación del plásmido recombinante del pMAL-MyoB4.

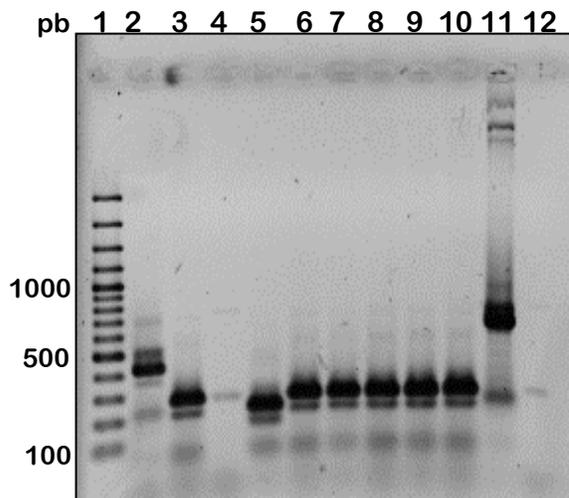


Figura 4-9 Subclonación en vector de expresión pMAL.

Rastreo de colonias que poseen plásmido pMAL-MyoB4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. Carril 1: ladder de 100 pb; carril 2: colonia con amplificación positiva; carriles 3-10 carriles con amplificación negativa; carril 11: control positivo de PCR, carril 12: control negativo.

Luego se hizo la inducción de la expresión de la proteína recombinante con IPTG y se muestra en el gel de la figura 4-10, en el cual se ve de forma clara la presencia de la proteína a la altura de 49 kDa aproximadamente, que no se observa en t_0 ; este peso corresponde al fragmento de la proteína MyoB4 de 7 kDa más la proteína de fusión MBP de 42 kDa. La proteína recombinante se produce desde la primera hora de inducción y aumenta levemente hasta las 3 horas. A partir del cultivo inducido por 3 horas se hizo una sonicación de las bacterias para establecer si la proteína se había obtenido de forma

soluble o si hacía parte de cuerpos de inclusión; en el gel se observa que tanto en el sobrenadante como en el pellet (carriles S y P) hay presencia de la proteína. La inducción por un tiempo de 20 horas parece llevar a la degradación de la proteína que se evidencia en el carril O/N en el mismo gel. Con estos resultados pasamos a inducir un cultivo de 500 ml por 3 horas a 37°C, del cual se obtuvo una fracción soluble de proteínas, que posteriormente se pasó por una cromatografía de afinidad a través de una columna de amilosa. En la figura 4-11 parte A, se observa el perfil cromatográfico de la fracción soluble, en el cual se aprecian de forma general dos picos, el primero que corresponde a las proteínas no unidas y el segundo a la secuencia de fracciones eluidas con maltosa (10 mM); la región valle de la gráfica corresponde a las fracciones de los lavados de la columna antes de la elución. Alícuotas de las fracciones de lavados y las eluidas se sembraron y separaron en geles de SDS-PAGE que se observan en la parte B de la figura 4-11; vemos que todos los carriles tienen en común una banda a la altura de 50 kDa que corresponde a la proteína de interés. Las fracciones E4 y subsiguientes se escogieron para ser usadas dado que la banda de interés es la mayoritaria en ellas, estas fracciones fueron cuantificadas por medio de microBradford. De la fracción E4 se obtuvieron 600 µg a una concentración de 2 µg/µl. Las fracciones E5 a E11 (E10 y E11 no mostradas) fueron reunidas en un pool, se concentraron y se cuantificaron, obteniéndose 1 mg de proteínas a una concentración de 0.5µg/µl.

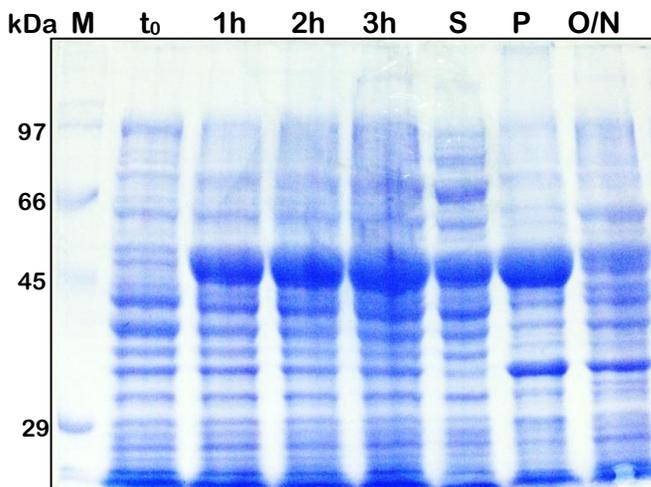


Figura 4-10 Expresión de la proteína recombinante MyoB4, inducida con IPTG. Gel de SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. M. Marcador de peso molecular 30-200 kDa (Sigma); t₀. Bacterias no inducidas; 1h, 2h, 3h, tiempos de inducción en horas; S. Sobrenadante; P. Pellet; O/N: inducido 20 horas. La flecha muestra la banda de la proteína recombinante.

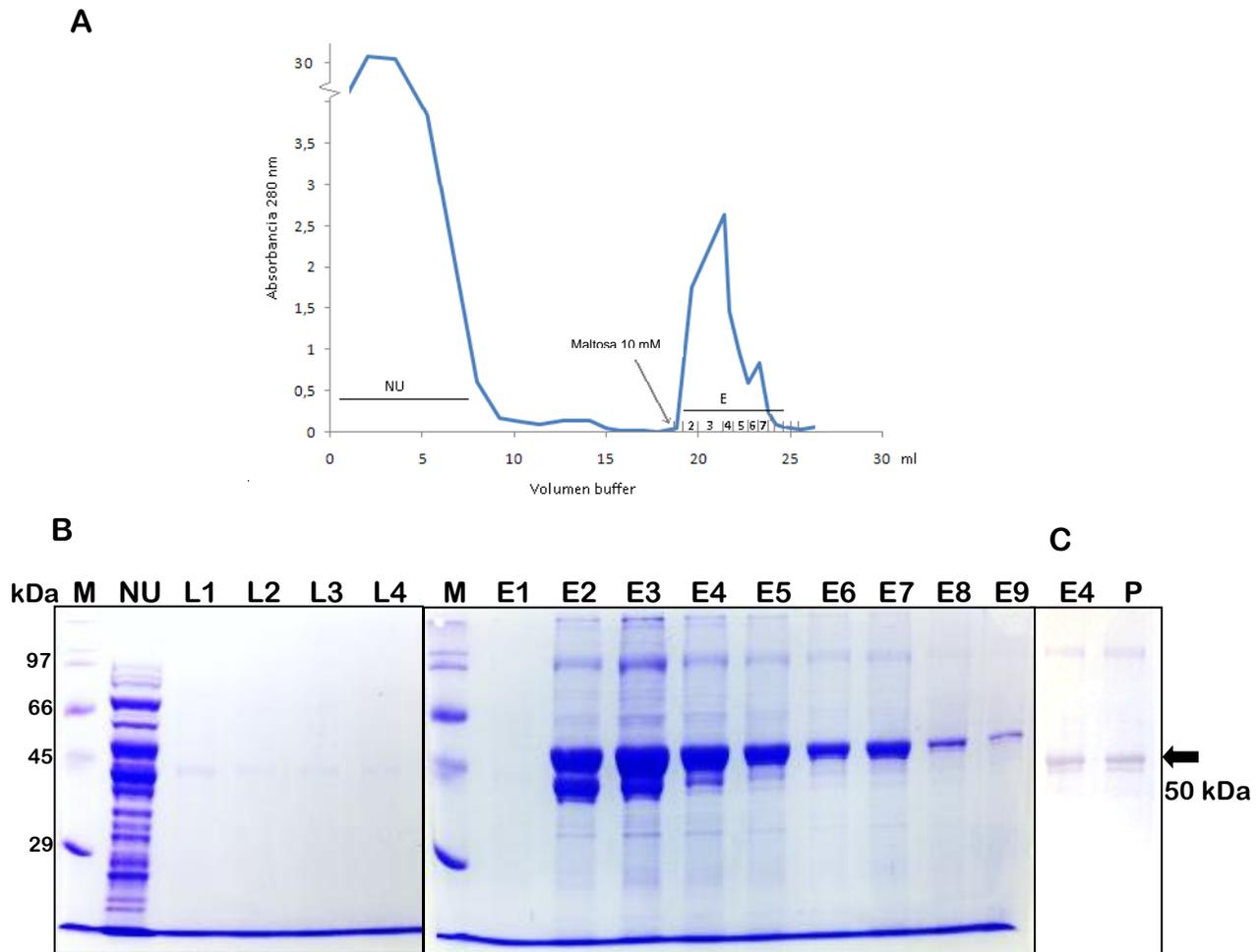


Figura 4-11 Cromatografía de afinidad con resina de amilosa para purificación de la proteína recombinante MyoB4.

A. Perfil cromatográfico en el que se muestra un pico NU de fracciones no unidas y un pico de fracciones eluidas con buffer con maltosa 10 mM. **B.** Geles de SDS-PAGE al 10% teñidos con azul de Coomassie de las fracciones NU: no unida, L1-L4: lavados, E1-E9: eluidas. M. Marcador de peso molecular 30-200 kDa (Sigma). **C.** WB sobre membrana de PVDF donde se revela la recombinante MyoB4 con anticuerpo anti-MBP, detección con NBT/BCIP. E4: alícuota de fracción E4; P: alícuota de pool de fracciones E5-E11. La flecha señala la proteína recombinante.

Para confirmar la presencia de la proteína recombinante se realizó la transferencia a una membrana de PVDF y se hizo el WB (figura 4-11, parte C) usando como anticuerpo primario anti-MBP (New England Biolabs). Se aprecia claramente la banda inmunorreactiva que detecta la proteína de fusión unida a la MyoB4. La purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a MBP por el método de cromatografía de afinidad típicamente resulta en un grado de pureza del 70% al 90% (Lebendiker y Danielli, 2011). Se estima que en general la proteína se obtiene con una pureza cercana al 85%, sin embargo, esto depende de las fracciones eluidas que se escojan. Este grado de pureza es suficiente para llevar a cabo posteriores experimentos de interacción *in vitro*

o para la producción de anticuerpos, si se quiere tener una pureza superior se pueden usar otras cromatografías como de intercambio iónico, hidrofóbica y de exclusión por tamaño. Como se mencionó, para la obtención de las demás proteínas recombinantes de PfMyoB se siguió un procedimiento similar al anteriormente mostrado para la proteína MyoB4. Las proteínas MyoB1, MyoB2 y MyoB3 se obtuvieron en la fracción soluble como se muestra en las figuras 4-12, 4-13 y 4-14, respectivamente. Previamente, los fragmentos de ADN obtenidos para cada proteína y clonados en el vector de expresión fueron verificados a nivel de secuencia, como se muestra en el anexo D, esto para evaluar posibles errores como cambios o gaps en la secuencia de nucleótidos que pudieran afectar la traducción de la proteína. En todos los casos la secuencia fue correcta y aunque se presentaron algunos pocos cambios de nucleótidos, éstos no afectaron el marco de lectura ni los codones, por tanto, no se produjo ningún cambio en la secuencia de aminoácidos. Luego, ya en la expresión de las proteínas, en cada caso se obtuvo la proteína con el peso molecular calculado esperado, que se observa en los geles a la altura indicada. Igualmente, todas las proteínas obtenidas pudieron ser reconocidas específicamente por medio del anticuerpo anti-MBP. Las proteínas en la fracción soluble fueron purificadas exitosamente por medio de cromatografía de afinidad con la resina de amilosa y las fracciones eluidas fueron cuantificadas por medio de microBradford. Aunque dentro de los objetivos de este trabajo no estaba estandarizar un método para mejorar la obtención de proteínas recombinantes, durante la ejecución del trabajo experimental encontramos que era necesario hacerlo. Se puede afirmar que bajo las condiciones trabajadas, se consiguieron buenos resultados en cuanto al rendimiento (cantidad de proteína obtenida) y a la solubilidad de las proteínas trabajadas.

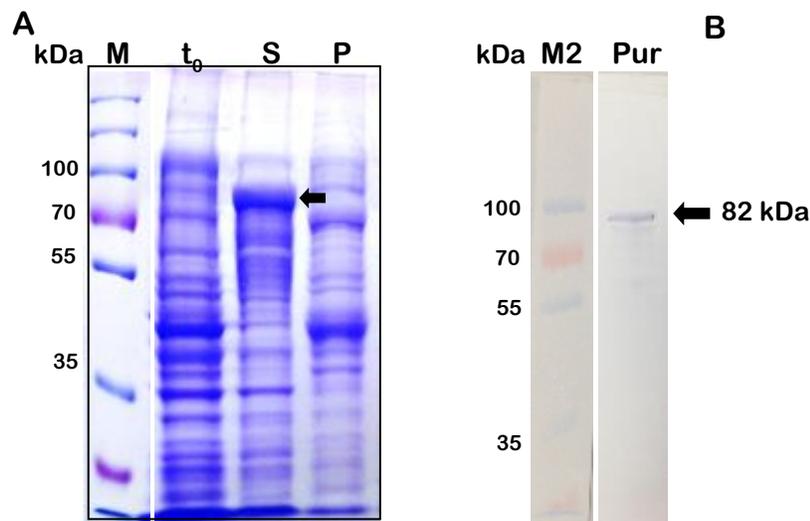


Figura 4-12 Expresión de la proteína recombinante MyoB1, inducida con IPTG por 3 horas. **A.** Gel de SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. M. Marcador de peso molecular PageRuler Plus kDa (Thermo); t_0 . Bacterias no inducidas; S. Sobrenadante; P. Pellet. **B.** WB sobre membrana de PVDF donde se revela la recombinante MyoB1 con anticuerpo anti-MBP, detección con NBT/BCIP. Pur: Proteína purificada; M2: Marcador de peso molecular PageRuler Plus kDa (Thermo). La flecha muestra la banda de la proteína recombinante.

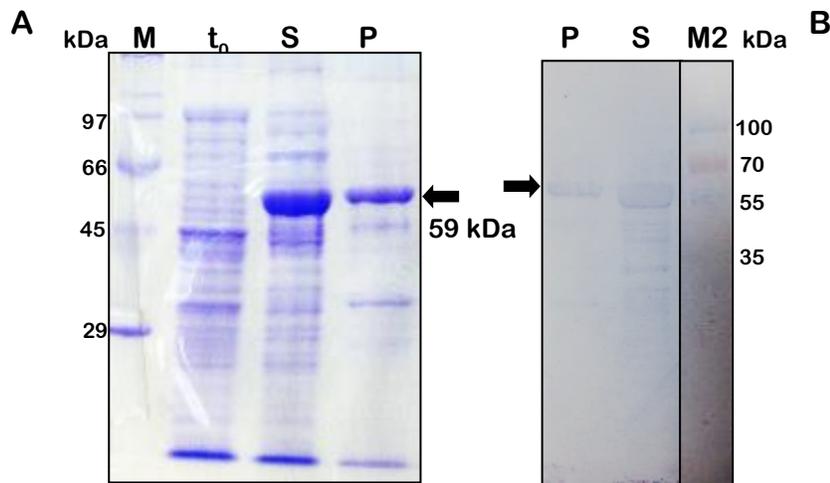


Figura 4-13 Expresión de la proteína recombinante MyoB2, inducida con IPTG por 3 horas. **A.** Gel de SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. M. Marcador de peso molecular 30-200 kDa (Sigma); t_0 . Bacterias no inducidas; 3h: inducidas por 3 horas; S. Sobrenadante; P: Pellet. **B.** WB sobre membrana de PVDF donde se detecta la recombinante MyoB2 con anticuerpo anti-MBP, detección con NBT/BCIP. M2: Marcador de peso molecular PageRuler Plus kDa (Thermo). La flecha muestra la banda de la proteína recombinante.

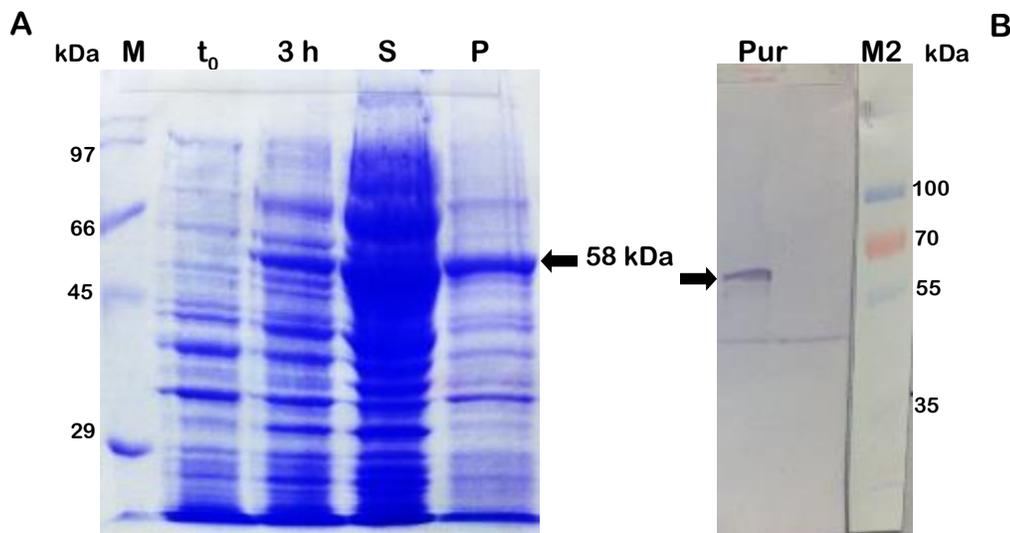


Figura 4-14 Expresión de la proteína recombinante MyoB3, inducida con IPTG por 3 horas.

A. Gel de SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. M. Marcador de peso molecular 30-200 kDa (Sigma); t_0 . Bacterias no inducidas; 3h: inducidas por 3 horas; S. Sobrenadante; P: Pellet. **B.** WB sobre membrana de PVDF donde se detecta la recombinante MyoB3 con anticuerpo anti-MBP, detección con NBT/BCIP. Pur: Proteína purificada; M2: Marcador de peso molecular PageRuler Plus kDa (Thermo). La flecha muestra la banda de la proteína recombinante.

- PfMyoA

Se produjeron dos recombinantes del dominio de cola de PfMyoA, una con un tag de His (MyoAHis) y otra con un tag MBP (MyoAMBP). La proteína MyoAMBP se obtuvo soluble (Figura 4-15A), fue purificada por cromatografía de afinidad (Figura 4-15B) y fue detectada en un ensayo de WB usando un anticuerpo anti-MBP (Figura 4-15C). Con esta proteína se produjo un anticuerpo policlonal para evaluar la interacción PfMyoA-MTIP. Esta interacción está ampliamente estudiada (Bergman et al., 2003; Bosch et al., 2006; Green et al., 2006; Bosch et al., 2007; Douse et al., 2012) y se usó como control positivo de los ensayos de interacción que se mostrarán posteriormente.

Por su parte, la proteína MyoAHis se produjo con el fin de realizar experimentos de competencia entre PfMyoB y PfMyoA por el sitio de unión a MTIP. Ya que todas las recombinantes de PfMyoB tenían tag MBP, era necesario hacer una proteína recombinante de PfMyoA con un *tag* diferente para realizar una detección específica de cada una. Por eso, se optó por expresar el dominio de cola de PfMyoA en el sistema pET. Cuando se realizaron los ensayos de solubilidad de la proteína MyoAHis ésta fue mayoritaria en el pellet después de la lisis de las bacterias, por tanto, se realizaron varias modificaciones para ver si se podía mejorar la proteína en la fracción soluble, estos cambios incluyeron el uso de otras cepas bacterianas, modificación del tiempo y

temperatura de la inducción; sin embargo la proteína siempre estuvo presente mayoritariamente en la fracción insoluble (carril P, figura 4-16A). Entonces, se decidió purificar la proteína a partir de los cuerpos de inclusión, esto es, con ayuda de un agente caotrópico como la urea, solubilizar todas las proteínas de la bacteria incluyendo la recombinante y luego pasar toda esta mezcla a una resina de afinidad de níquel que soporta la concentración de urea usada (8M) en la solubilización sin afectar su especificidad (Figura 4-16B). Con esto, se pudo hacer una purificación en condiciones denaturantes; luego, se eliminó el exceso de urea por medio de repetidas filtraciones a través de un filtro concentrador de 3 kDa y al final se obtuvo una proteína en buffer PBS

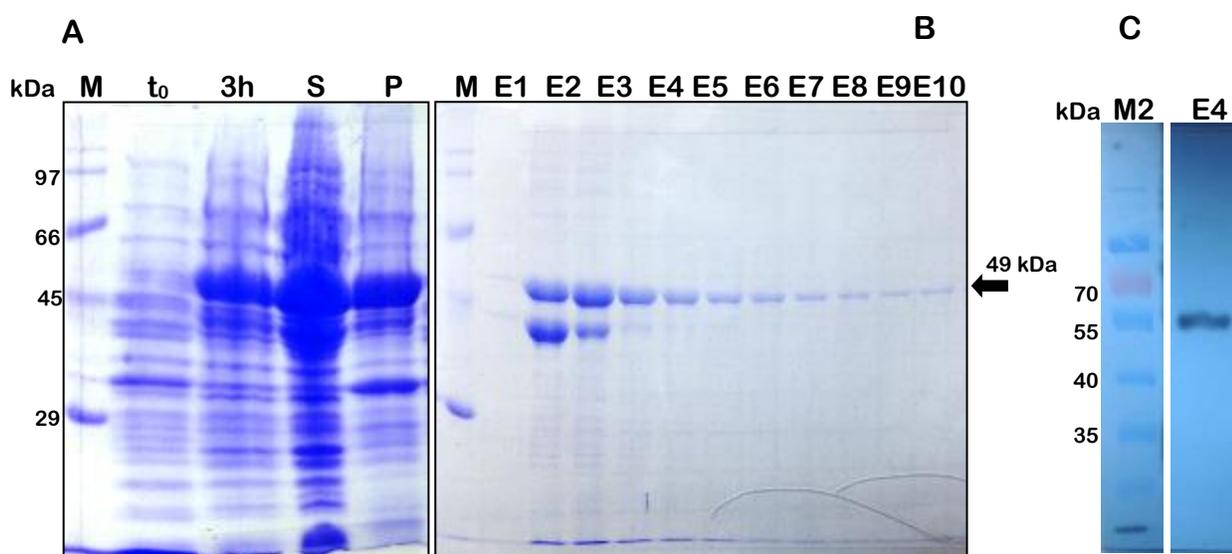
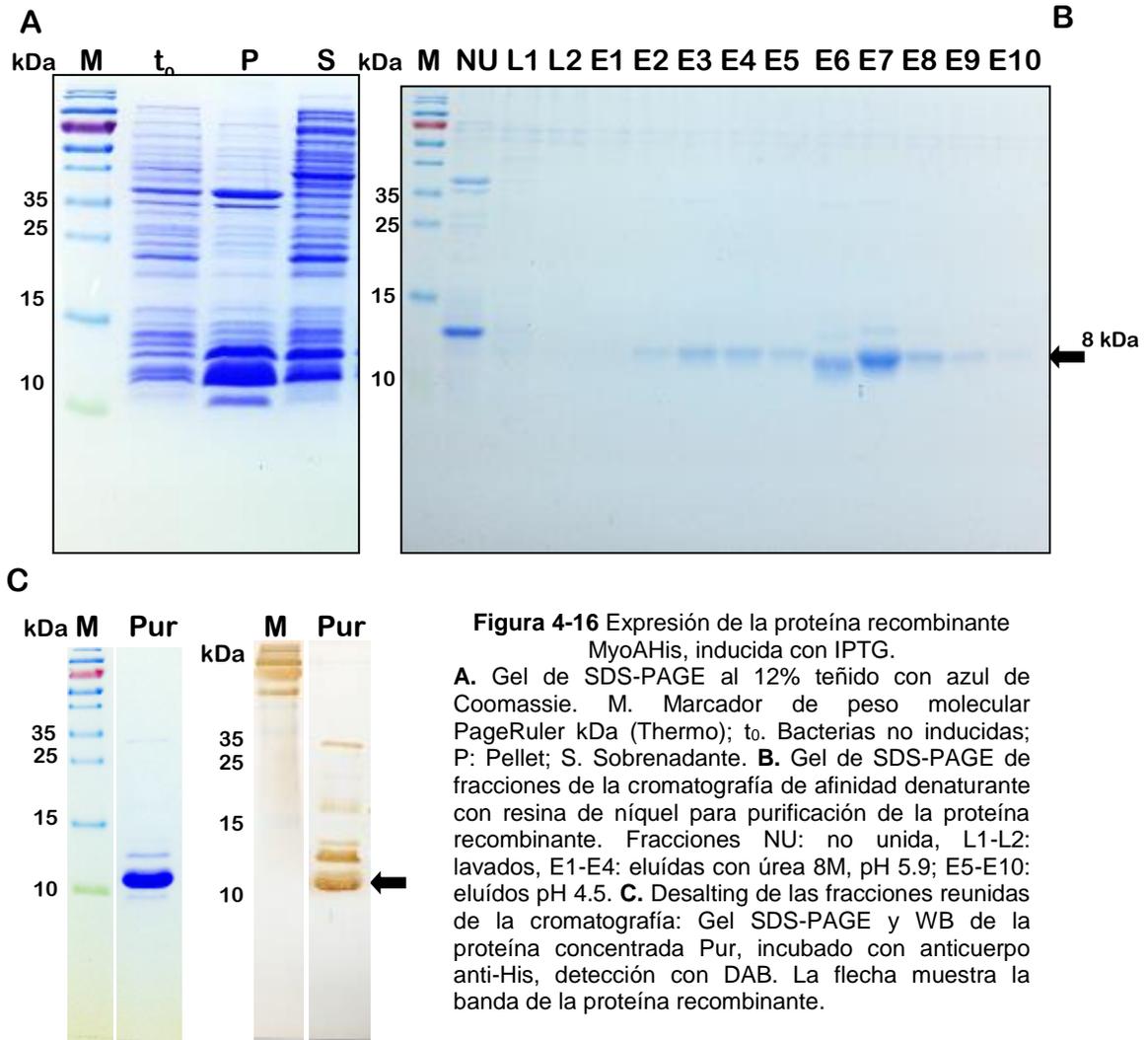


Figura 4-15 Expresión de la proteína recombinante MyoAMBp, inducida con IPTG.

A. Gel de SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. M. Marcador de peso molecular 30-200 kDa (Sigma); t₀. Bacterias no inducidas; 3h: inducidas por 3 horas; S. Sobrenadante; P: Pellet. **B.** Gel SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de afinidad con resina de amilosa para purificación de la proteína recombinante. Fracciones E1-E10 eluidas con maltosa 10 mM. **C.** WB de una alícuota de la fracción E4, incubación con anticuerpo anti-MBP. M2: Marcador de peso molecular PageRuler (Thermo); detección quimioluminiscencia-película de rayos X. La flecha muestra la banda de la proteína recombinante.

que no se precipitó al eliminar el agente denaturante. Igualmente a través de un anticuerpo anti-HIS se pudo detectar la proteína (Figura 4-16C). Es importante anotar que pese a que se expresó la misma región de la proteína en dos sistemas de expresión

diferentes, se obtuvieron resultados diferentes en cuanto a la solubilidad. Por un lado, la proteína fusionada al *tag* de MBP fue soluble y se produjo en cantidad suficiente para ser purificada por afinidad, este *tag* promueve la solubilidad de la proteína de fusión ya que posee una actividad chaperona intrínseca que facilita su adecuado plegamiento y evita la



autoasociación (Fox et al., 2001). De otro lado, la proteína fusionada al *tag* de histidinas se quedó en los cuerpos de inclusión, a pesar de que este sistema ha sido ampliamente usado con buenos resultados (Kimple et al., 2013), en el caso de esta proteína en particular con esta secuencia no fue posible obtenerla soluble.

- MTIP

Esta proteína se obtuvo completa fusionada al *tag* GST. En la figura 4-17A se puede observar que la proteína se expresa a partir de la primera hora de inducción y que aumenta en cantidad hasta las 3 horas. La proteína fue obtenida en la fracción soluble y por tanto se pudo purificar por medio de una cromatografía de afinidad a una resina de glutatión como se muestra en la figura 4-17B. Las fracciones eluidas fueron reunidas y concentradas por centrifugación en un filtro de 30 kDa, una alícuota de este concentrado se evaluó por medio de electroforesis SDS-PAGE y WB con un anticuerpo anti-GST y como se ve en la figura 4-17C se pudo detectar la proteína a la altura esperada.

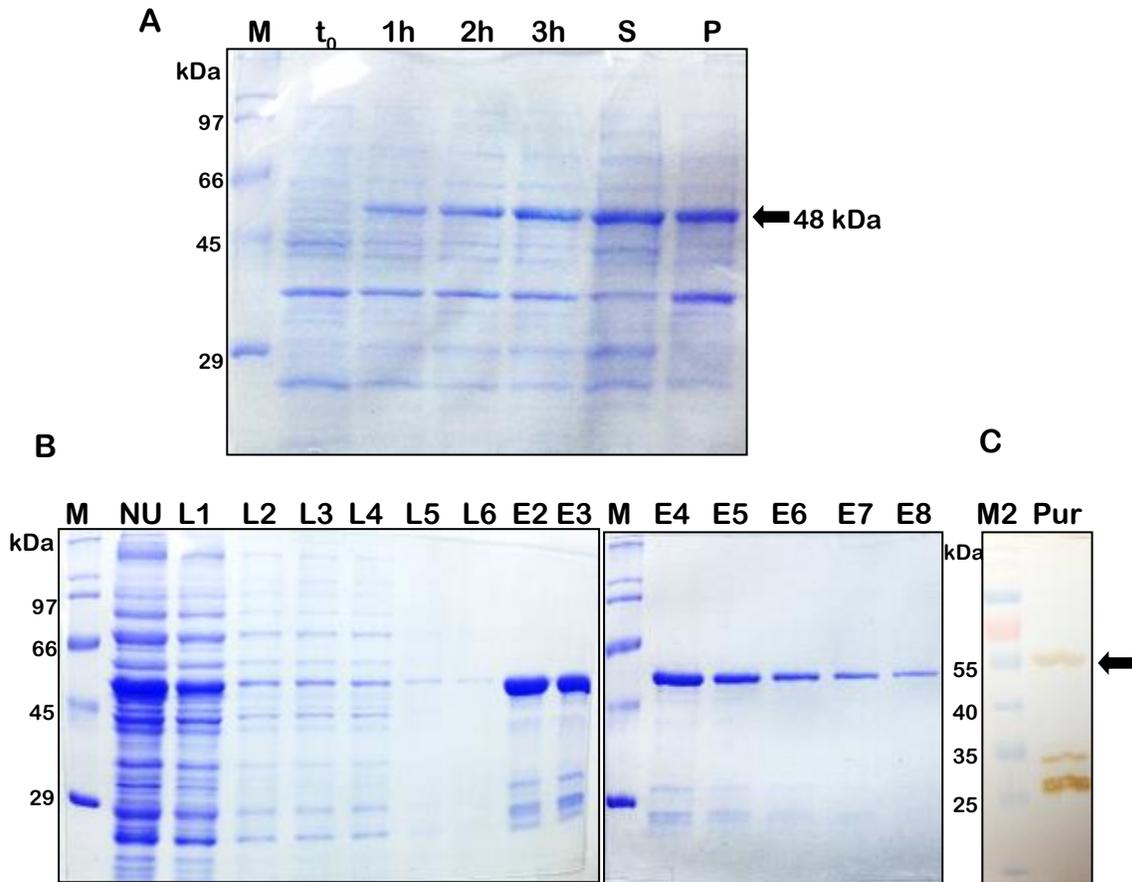


Figura 4-17 Expresión de la proteína recombinante MTIP, inducida con IPTG.

A. Gel de SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie de la inducción; M: Marcador de peso molecular 30-200 kDa (Sigma); t_0 : Bacterias no inducidas; 1h-3h: tiempo de inducción en horas; S. Sobrenadante; P: Pellet. **B.** Gel de SDS-PAGE de fracciones de la cromatografía de afinidad con resina de glutatión-agarosa para purificación de la proteína recombinante. Fracciones NU: no unida, L1-L6: lavados, E2-E8: eluidas con glutatión reducido 10 mM. **C.** WB de la proteína concentrada Pur, incubado con anticuerpo anti-GST, detección con DAB. La flecha muestra la banda de la proteína recombinante.

- *Tags* MBP Y GST

Se produjeron las proteínas *tag* independientes para ser usadas en los ensayos de interacción con el fin de evaluar su participación como control en los ensayos y descartar posibles interferencias que se pudieran presentar en resultados como falsos positivos ya que estas proteínas son relativamente grandes: el *tag* MBP tiene un peso de 42 kDa y el *tag* GST 24 kDa. Como se observa en la figura 4-18A las dos proteínas se obtuvieron en

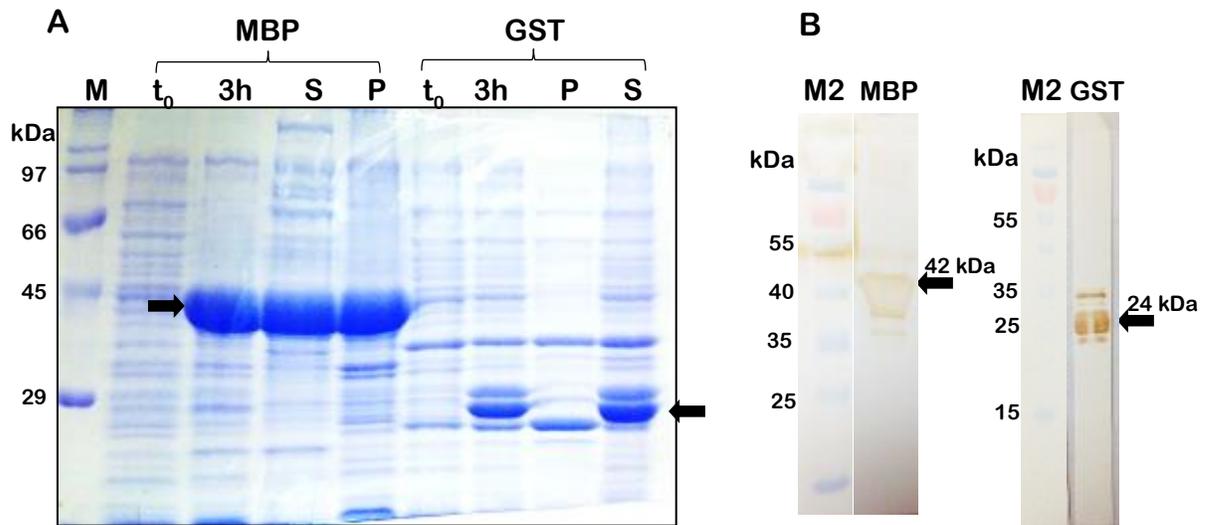


Figura 4-18 Expresión de las proteínas recombinantes MBP y GST, inducidas con IPTG.

A. Gel de SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. M. Marcador de peso molecular 30-200 kDa (Sigma); t₀. Bacterias no inducidas; 3h: bacterias inducidas 3 horas; P: Pellet; S. Sobrenadante. **B.** WB de las proteínas purificadas, incubado con anticuerpo anti-MBP y anti-GST. M2: marcador de peso PageRuler kDa (Thermo), detección con DAB. La flecha muestra las proteínas recombinantes.

la fracción soluble en buena cantidad y luego pudieron ser purificadas por cromatografía de afinidad. Las fracciones eluidas de cada proteína purificada se reunieron, concentraron y cuantificaron debidamente, luego, una alícuota de cada proteína se detectó en WB usando anticuerpos anti-MBP y anti-GST, como se observa claramente en la figura 4-18B.

4.2.2. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos anti-PfMyoB y PfMyoA

- Anticuerpos generados en rata

Para PfMyoB se produjeron anticuerpos contra las proteínas MyoB1, MyoB2 y MyoB4, en la figura 4-19 se muestra la evaluación de la detección de los anticuerpos sobre la proteína recombinante. En cada caso con un título de 1:1000 el suero de cada animal reconoce la proteína recombinante respectiva y con los preinmune no hay reconocimiento.

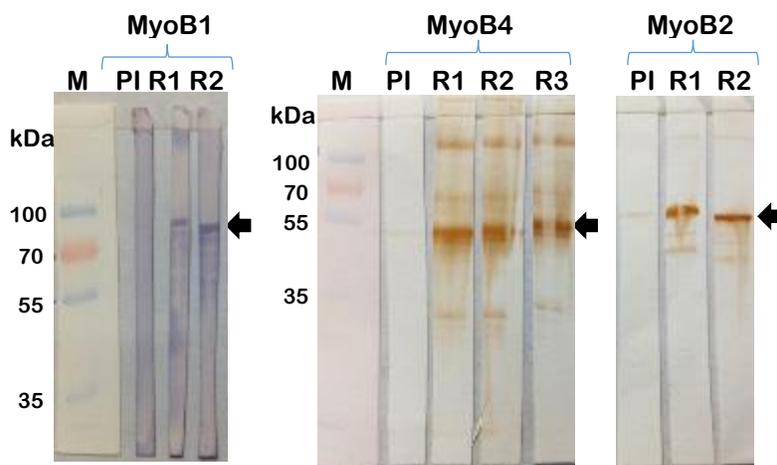


Figura 4-19 WB de evaluación de anticuerpos policlonales producidos en rata contra proteínas recombinantes. M: marcador de peso PageRuler Plus kDa (Thermo); PI: suero preinmune, R1: suero de rata 1, R2: suero de rata 2, R3: suero de rata 3. α -MyoB1: 200 ng de proteína recombinante, anticuerpo primario 1:1000, detección con NBT/BCIP. α -MyoB4 y α -B2: 250 ng de recombinantes, anticuerpo primario 1:1000, revelado con DAB.

Posteriormente se evaluaron los anticuerpos sobre extractos de esquizontes, porque cabe recordar que el mensajero de la proteína tiene un pico de expresión en este estado (Chaparro et al., 2005) y no se expresa ni se detecta en el estado de anillo ni de trofozoíto. Todas las detecciones mostradas en este trabajo sobre extractos y células se hicieron usando cultivos de *P. falciparum* a partir de los cuales se realizó aislamiento de esquizontes por medio de la técnica de Percoll™ descrita en la sección de métodos. La figura 4-20 muestra un extendido hematológico teñido con giemsa de un experimento de purificación de esquizontes; se puede observar la gran cantidad de formas maduras preponderantes en el campo con pocos eritrocitos no invadidos, lo que demuestra la buena calidad de la preparación.

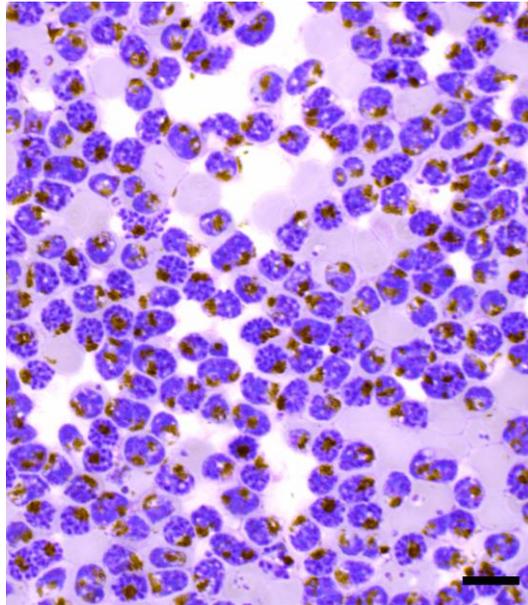


Figura 4-20 Extendido de formas maduras de *P. falciparum*. Purificadas por medio de Percoll™, teñido con giemsa. Barra 10 μ m.

Con los anticuerpos generados en rata se hicieron ensayos de WB sobre extractos protéicos de esquizontes con el fin de detectar la proteína nativa, sin embargo, no fue posible obtener una detección específica. La figura 4-20 muestra el ensayo de detección de la proteína PfMyoB con los diferentes anticuerpos con dos diluciones, al usar la dilución 1:100 se obtiene un bandeo que también coincide con lo que se detecta al usar el suero preimmune, la única banda fuerte y diferencial se obtiene a la altura de 70 kDa, sin embargo no corresponde al peso esperado para esta miosina que debería estar alrededor de 93 kDa. Se usó como control positivo la detección de la proteína MTIP con un anticuerpo policlonal disponible en el laboratorio producido en nuestro grupo; la señal para MTIP se espera a la altura de 25 kDa y efectivamente ese fue el resultado obtenido (figura 4-21A). Con el fin de disminuir el bandeo inespecífico y posibilitar la detección de PfMyoB se decidió usar una dilución mayor de los anticuerpos de 1:500, el resultado se observa en la parte B de la figura 4-21 pero tampoco se logra obtener la banda a la altura esperada aunque el ruido de fondo disminuyó considerablemente. Se realizaron varios ensayos adicionales, variando las soluciones de bloqueo, cambiando la leche por BSA, ampliando los tiempos de incubación de los anticuerpos y chequeando varios títulos diferentes, sin embargo, con estos anticuerpos no se pudo tener detección de la proteína PfMyoB en extractos de parásitos.

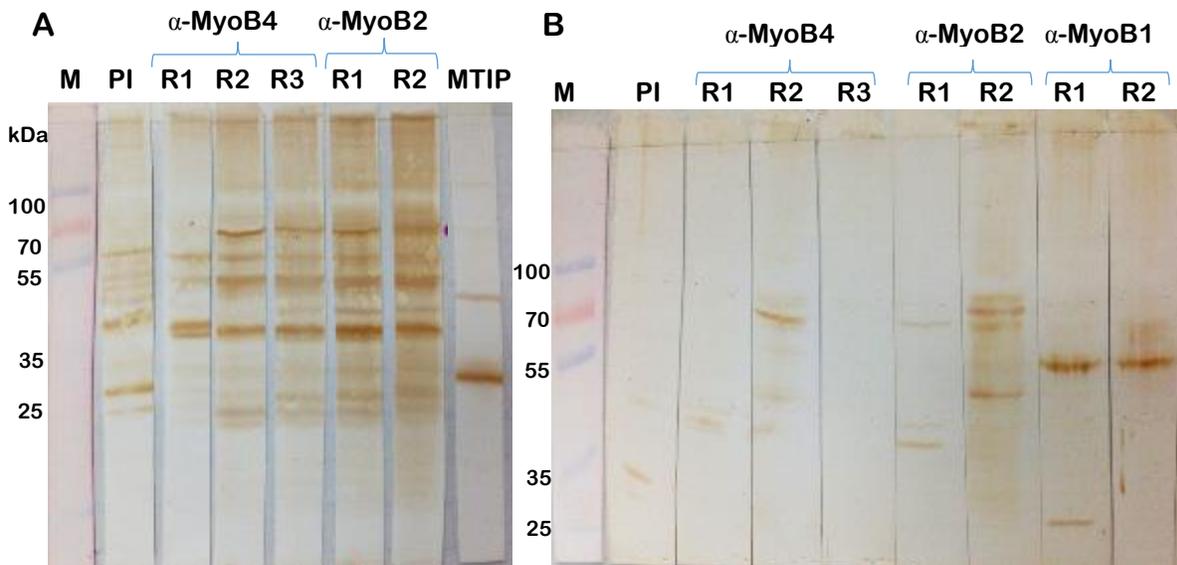


Figura 4-21 WB de evaluación de anticuerpos policlonales antiMyoB producidos en rata en extractos de esquizontes.

M: marcador de peso PageRuler Plus kDa (Thermo); PI: pre-inmune, R1: suero de rata 1, R2: suero de rata 2, R3: suero de rata 3. **A.** 100 μ g de extracto, α -primario 1:100 incubación overnight, revelado con DAB. MTIP: detección de MTIP en extracto con anticuerpo policlonal disponible en el laboratorio, control positivo. **B.** 100 μ g de extracto, α -primario 1:500 incubación overnight, detección con DAB.

Dado que no se pudo detectar PfMyoB mediante WB convencional, asumimos que la proteína se encuentra en muy baja cantidad en el extracto, por eso se decidió hacer ensayos de inmunoprecipitación (IP); mediante esta técnica esperabamos concentrar la proteína hasta un nivel detectable (Trieu y Targoff, 2015). Igualmente, el hecho de que la proteína esté en su conformación nativa en el extracto podría potenciar su interacción específica con el anticuerpo. En la figura 4-22 se observan los resultados del ensayo de IP con los anticuerpos anti-MyoB2 y anti-MyoB4 rata 2, en este ensayo se usó 1 mg de extracto de esquizontes y 10 μ l de suero inmune tal como se describió anteriormente en la metodología. En el ensayo de WB de la inmunoprecipitación no se detectó la banda específica que se esperaba a la altura de 93 kDa, del mismo modo puede observarse que con el suero preinmune se obtiene el mismo patrón de bandas que corresponde a las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas. Este mismo ensayo se realizó usando una cantidad de extracto mayor cercana a 4 mg, se aumentó el volumen de suero y también se reveló el WB por medio de quimioluminiscencia buscando una mejora en la detección pero no se obtuvieron resultados positivos. Se ha reportado que para mejorar la detección de los antígenos que se encuentran en muy baja cantidad se plantea el uso de marcación radioactiva en la IP, infortunadamente para este trabajo no se contó con este recurso, dadas las restricciones y limitaciones de su uso en nuestro país.

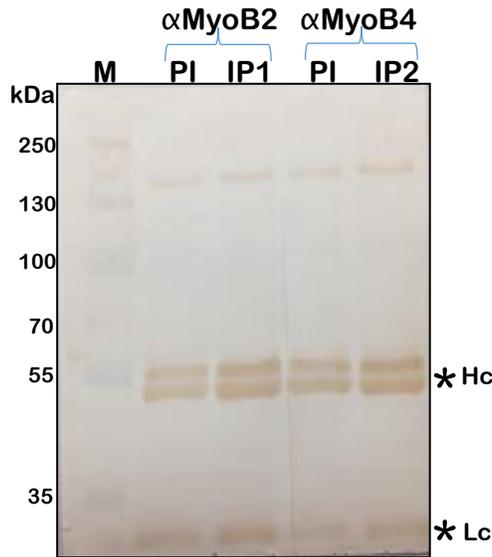


Figura 4-22 WB de IP anti-MyoB usando anticuerpos policlonales obtenidos en rata en extractos de esquizontes. M: marcador de peso PageRuler Plus kDa (Thermo); PI: IP con suero preimmune, IP1: IP con suero antiMyoB2 rata 2; IP2: IP con suero antiMyoB4 rata 2, detección con DAB. Los asteriscos indican las cadenas pesadas Hc y livianas Lc de las inmunoglobulinas.

- Anti-PfMyoA

Con la proteína MyoA-MBP obtenida en este trabajo se produjeron anticuerpos policlonales en ratas. Tal como se describió en la sección Métodos se obtuvieron dos sueros inmunoreactivos (2 ratas) contra PfMyoA y uno preimmune. En la figura 4-23 se muestran los resultados de WB sobre proteína recombinante y sobre extractos en los que se probaron los anticuerpos. Los dos sueros inmunes reconocen la proteína recombinante de PfMyoA-MBP, resultando una detección muy similar a la que se obtiene cuando se utiliza el anticuerpo anti-MBP. En el caso de la detección de la proteína nativa en extractos de esquizontes, se tiene que con el anticuerpo de la rata 1 no se obtiene una señal clara a la altura esperada cercana a 100 kDa (93 kDa), pero con el suero de la rata 2 si se obtuvo una señal específica a la altura esperada como se señala con la flecha en la figura citada.

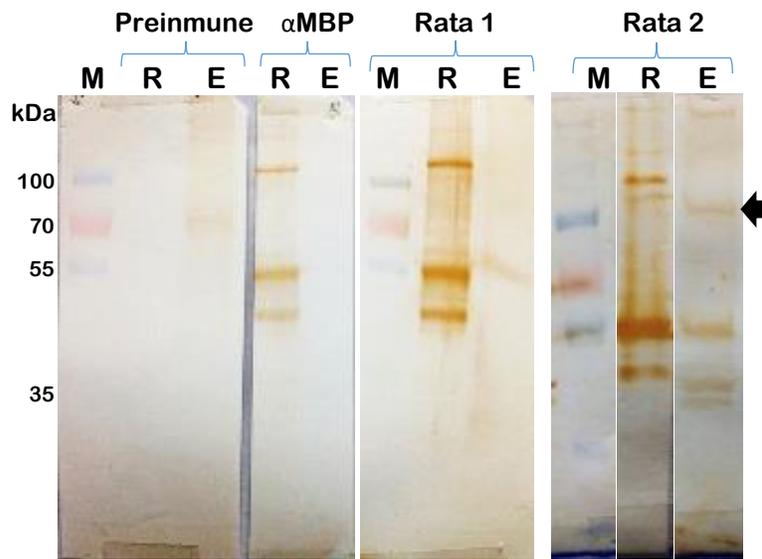


Figura 4-23 WB de evaluación de anticuerpos policlonales antiMyoA producidos en rata. M: marcador de peso PageRuler kDa (Thermo); R: 200 ng de proteína recombinante MyoAMBP, E: 50 μ g de extracto de proteínas de esquizontes. En la parte superior se muestran los sueros utilizados para la incubación, detección con DAB. Flecha muestra banda específica para PfMyoA.

La proteína PfMyoB se detecta solo en esquizontes maduros

- Anticuerpos generados en conejo

Dado que con los anticuerpos obtenidos en rata no se pudo detectar a PfMyoB, se evaluó la especificidad de los anticuerpos generados contra dos péptidos sintéticos de PfMyoB, estos anticuerpos fueron nombrados AbP1 (generado contra péptido de la posición 56-69 en la secuencia de la proteína PfMyoB) y AbP2 (generado contra péptido de la posición 720-733 en la secuencia de la proteína PfMyoB) y de aquí en adelante serán llamados de esa forma. En la figura 4-24 se muestra un esquema de la proteína PfMyoB con la

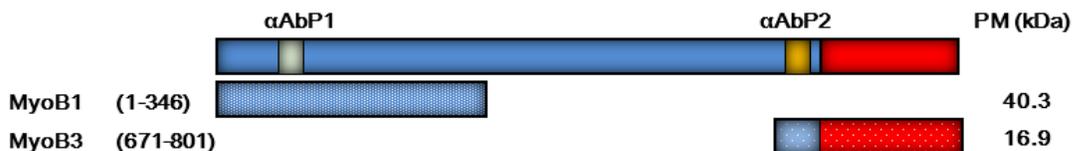


Figura 4-24 Esquema de PfMyoB con la posición de los péptidos inmunogénicos usados para obtener los anticuerpos en conejo AbP1 y AbP2.

También se muestran la posición de las proteínas recombinantes que contienen esa secuencia peptídica, con respecto a la secuencia completa. La proteína completa se muestra con su dominio de cabeza en azul (aminoácidos 1-739) y el dominio de cola (740-801) en rojo.

posición de los péptidos y las proteínas recombinantes que contienen esa secuencia y pueden por tanto ser detectadas por los anticuerpos AbP1 y AbP2.

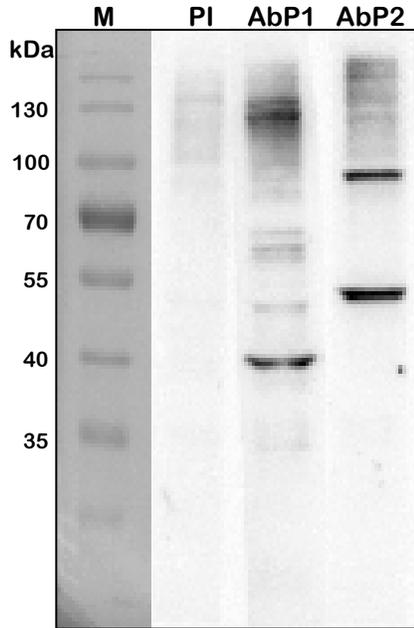


Figura 4-25 WB anti-MyoB sobre extractos de esquizontes usando anticuerpos policlonales obtenidos en conejo.

M: marcador de peso PageRuler kDa (Thermo); PI: incubación con anticuerpo preinmune; AbP1 y AbP2 anticuerpos. Condiciones de WB: Bloqueo O/N TBST 0.05% leche 3%. Ab primario: 1:1000 en buffer de bloqueo, O/N. Secundario: anti conejo-HRP, 1:30000, en buffer de bloqueo, una hora. Detección por quimioluminiscencia-documentador de geles. La flecha muestra una banda cercana a 100 kDa.

En la figura 4-25 se muestra la detección de PfMyoB sobre extractos de esquizontes usando estos anticuerpos (dilución 1:1000) y 100 µg de extracto de proteínas. Con el anticuerpo AbP1 se detectan varias bandas en el extracto, hay una banda intensa a la altura de 40 kDa, sin embargo no correspondería con el tamaño esperado para PfMyoB; con el anticuerpo AbP2 se reconocen dos bandas una a la altura de 55 kDa y otra cercana a 100 kDa que correspondería con lo esperado de 93 kDa para PfMyoB. Para confirmar la especificidad de estos anticuerpos se hicieron varios ensayos que incluyeron: WB sobre extractos de glóbulos rojos con el fin de verificar que no existiera alguna reacción cruzada con proteínas de estas células, este resultado puede observarse en la figura 4-26 en donde efectivamente no hay banda reactiva alguna; WB sobre proteínas recombinantes que contienen la secuencia de los péptidos con los cuales fueron obtenidos los anticuerpos, con las proteínas MyoB1 que tiene la secuencia del péptido reconocido por el anticuerpo AbP1 y la proteína MyoB3 que a su vez tiene la secuencia del péptido reconocido por el anticuerpo AbP2 (ver esquema figura 4-24), la figura 4-27 muestra que cada anticuerpo reconoce únicamente la proteína correspondiente y no existe una reacción cruzada.

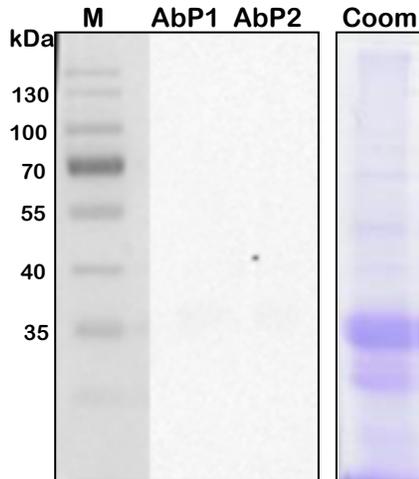


Figura 4-26 WB anti-MyoB usando anticuerpos policlonales obtenidos en conejo sobre extractos de glóbulos rojos. M: marcador de peso PageRuler kDa (Thermo); AbP1 y AbP2 anticuerpos, detección por quimioluminiscencia-documentador de geles. Coom: SDS-PAGE de extracto de eritrocitos teñido con Coomassie.

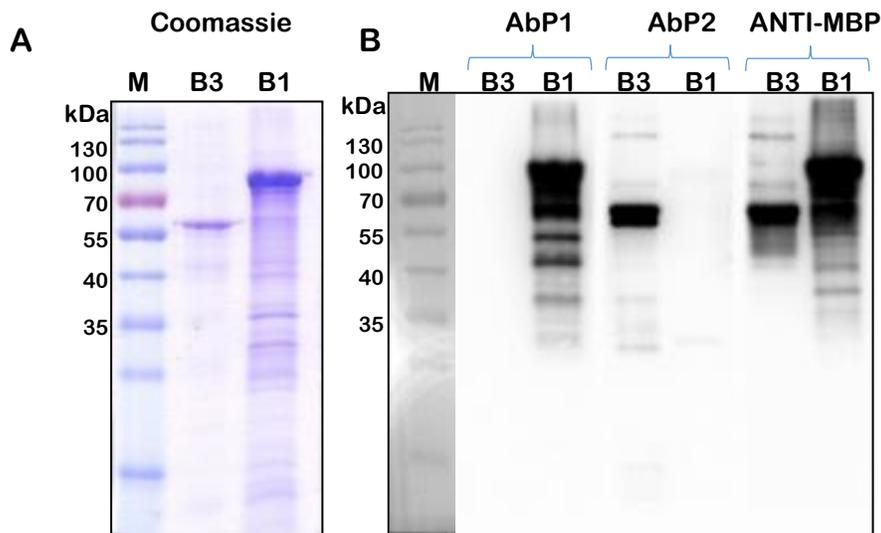


Figura 4-27 Reconocimiento de proteínas recombinantes de PfMyoB usando anticuerpos policlonales obtenidos en conejo.

A. SDS-PAGE de proteínas recombinantes teñido con Coomassie, B3 es la proteína purificada MyoB3 y B1 es el extracto de bacterias inducidas con MyoB1. **B.** WB usando los anticuerpos descritos en la parte superior sobre las proteínas. M: marcador de peso PageRuler kDa (Thermo); AbP1 y AbP2 anticuerpos, Anti-MBP: anticuerpo anti-MBP. Detección por quimioluminiscencia-documentador de geles.

Con el anticuerpo AbP2 se quiso evaluar si sobre extractos de otros estados eritrocíticos del parásito se detectaba la banda a la altura de 100 kDa que adjudicamos como la banda específica para PfMyoB, este resultado se muestra en la figura 4-28 donde se observa que en todos los estados se detecta la banda a la altura de 55 kDa como lo que se obtuvo en la figura 4-25 pero sólo en el estado de esquizonte hay detección de una banda a la altura esperada para PfMyoB. Con el fin de demostrar que se sembró la misma cantidad de extracto de cada estado se usó como control de carga la detección de

la proteína GAPDH (gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa) con un anticuerpo monoclonal (MA5-15738 Thermo) que fue desarrollado contra la proteína humana. En la parte inferior de la figura 4-28 se puede apreciar la notoria detección de la proteína en

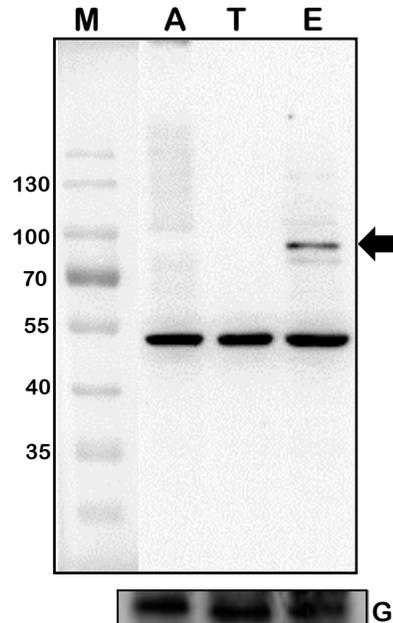


Figura 4-28 Detección de PfMyoB en extractos de parásitos del estado intraeritrocítico.

WB sobre 100 μ g de extractos de anillos A, trofozoítos T y esquizontes E usando anticuerpo AbP2. M: marcador de peso PageRuler kDa (Thermo). Control de carga cuadro inferior: incubación con α -GAPDH. Detección por quimioluminiscencia-documentador de geles. Flecha muestra la banda específica de PfMyoB.

cada estado, en intensidades muy parecidas lo que demuestra que efectivamente la cantidad de proteína sembrada fue la misma en todos los estadios. La detección de la proteína nativa PfMyoB ya había sido reportada por Chaparro y col. en 2003, ellos mostraron una banda en esquizontes y una detección muy tenue en trofozoítos ubicada entre los marcadores de peso de 64 y 190 kDa, usando un anticuerpo policlonal dirigido contra un fragmento de 145 aa de la cabeza de la PfMyoB.

También se realizó una detección simultánea de PfMyoB y PfMyoA con el fin de verificar que el anticuerpo contra PfMyoB fuera lo suficientemente específico para reconocer exclusivamente su antígeno, esto, teniendo en cuenta que las dos proteínas son muy similares. Para detectar PfMyoA se usó el suero obtenido de la rata 2 y para PfMyoB el AbP2. En la figura 4-29 se muestra el resultado de WB en el que claramente se nota que cada anticuerpo reconoce una banda diferente en el extracto, que para PfMyoA, como se espera, está a una altura levemente superior comparada con el reconocimiento que se logra con el anticuerpo AbP2. Con esto, concluimos que no hay reacción cruzada del anticuerpo AbP2 con PfMyoA. Es pertinente anotar que en nuestra experiencia, cuando se hace la detección de PfMyoA sobre extractos de proteínas de parásito, la señal es

mucho más intensa que cuando se detecta PfMyoB; aunque los anticuerpos pueden tener eficiencias distintas creemos que eso muestra que la cantidad de proteína PfMyoB es mucho menor a la de PfMyoA en el parásito (esto fue reportado por Yusuf y col. en 2015), y sobre este aspecto se ampliará más adelante.

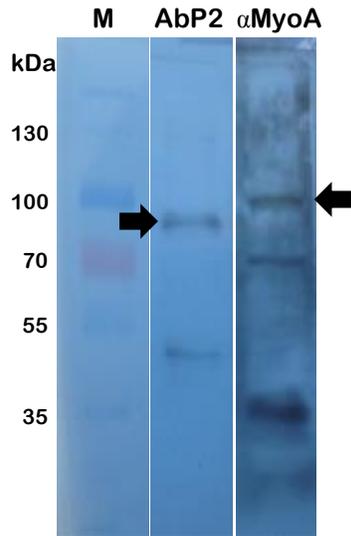


Figura 4-29 Detección de PfMyoB y PfMyoA en extractos de esquizontes. WB sobre 100 μ g de extractos esquizontes. Probados con anticuerpo AbP2 y α -MyoA. M: marcador de peso PageRuler kDa (Thermo). Detección por quimioluminiscencia- película de rayos X. Las flechas señalan la banda específica para la proteína correspondiente.

- Detección de PfMyoB en células de *P. falciparum*

Con el anticuerpo AbP2 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y de inmunomicroscopia electrónica con el fin de establecer la localización de la proteína PfMyoB en esquizontes de *P. falciparum*. La imagen de fluorescencia de la figura 4-30 muestra un esquizonte maduro con al menos 10 merozoítos diferenciables por su núcleo en el cuadro DAPI, con el anticuerpo AbP2 se detecta una concentración o acumulación de fluorescencia en un polo de los merozoítos, cada uno de ellos tiene asociado un foco de fluorescencia y se puede apreciar que también hay detección difusa en el citoplasma. La imagen de luz (campo claro) dentro de la figura 4-30 muestra el esquizonte dentro de un eritrocito con una estructura oscura y densa que representa el pigmento malárico o hemozoína. Igualmente se muestra la detección tanto con DAPI como con AbP2 sobre eritrocitos no infectados en el lado derecho de la imagen, en donde claramente se ve que no hay inmunoreacción o fluorescencia de fondo. En el trabajo de Chaparro y col. de 2003 se observó que durante el ciclo intraeritrocítico, PfMyoB se detecta sólo en esquizontes y en merozoitos libres. Por otro lado, los ensayos de IFA mostraron que la proteína se ubica apicalmente y en algunas áreas limitadas en compartimientos

subcelulares, sin embargo, las imágenes en ese trabajo no son lo suficientemente claras y detalladas. Yusuf y col. en 2015 obtuvieron resultados concordantes con los anteriores usando recombinación homóloga para integrar la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) en el la región 3' del gen *pfmyob*. En ese trabajo se encontró que PfMyoB se ubica en el extremo apical y que sólo se detecta sobre esquizontes maduros de más de 40 h y en merozoítos libres. Nuestros resultados de IFA muestran que hay una acumulación de fluorescencia que podría corresponder con lo encontrado por Yusuf en uno de los polos del parásito, pero adicionalmente las imágenes muestran una localización escasa y difusa citoplasmática de la proteína. A continuación se hicieron ensayos de inmunolocalización por microscopia electrónica de transmisión en

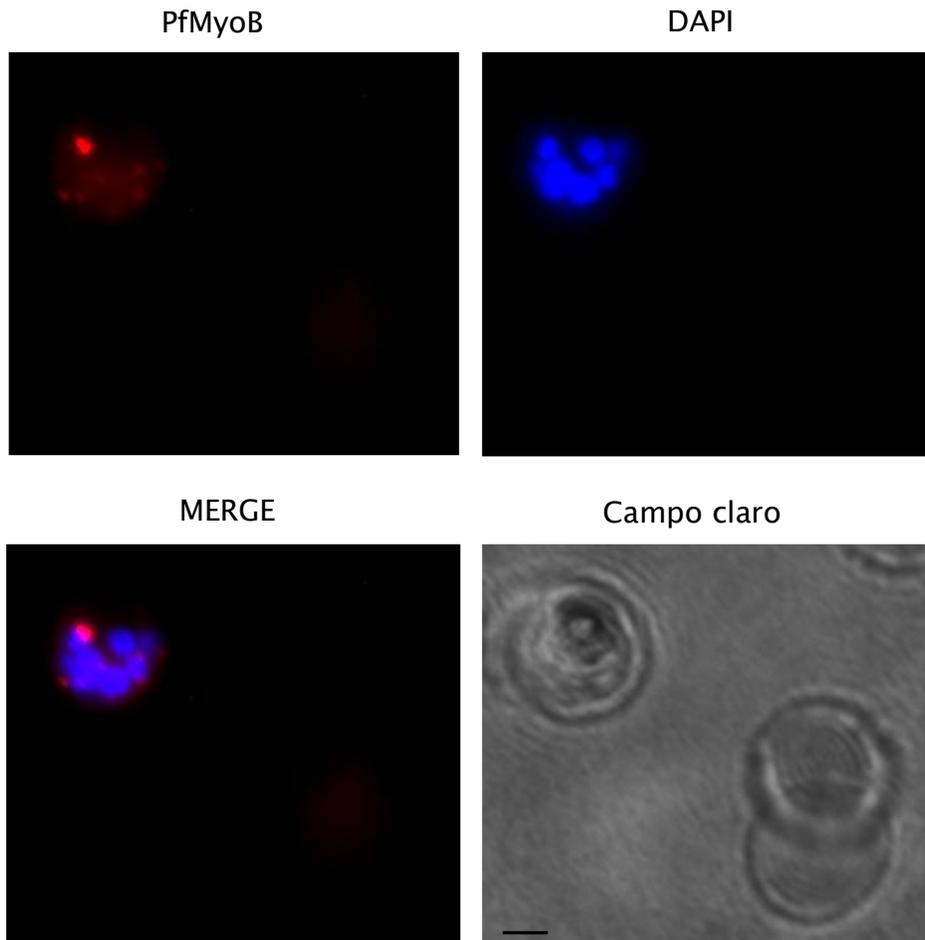


Figura 4-30 IFA de detección de PfMyoB en esquizontes.

PfMyoB es detectada usando el anticuerpo AbP2 y los núcleos marcados con DAPI. Anticuerpo secundario anticonejo acoplado a Alexa 546 visualizado en microscopio Nikon C1 Plus Eclipse Ti. Barra 2 μm .

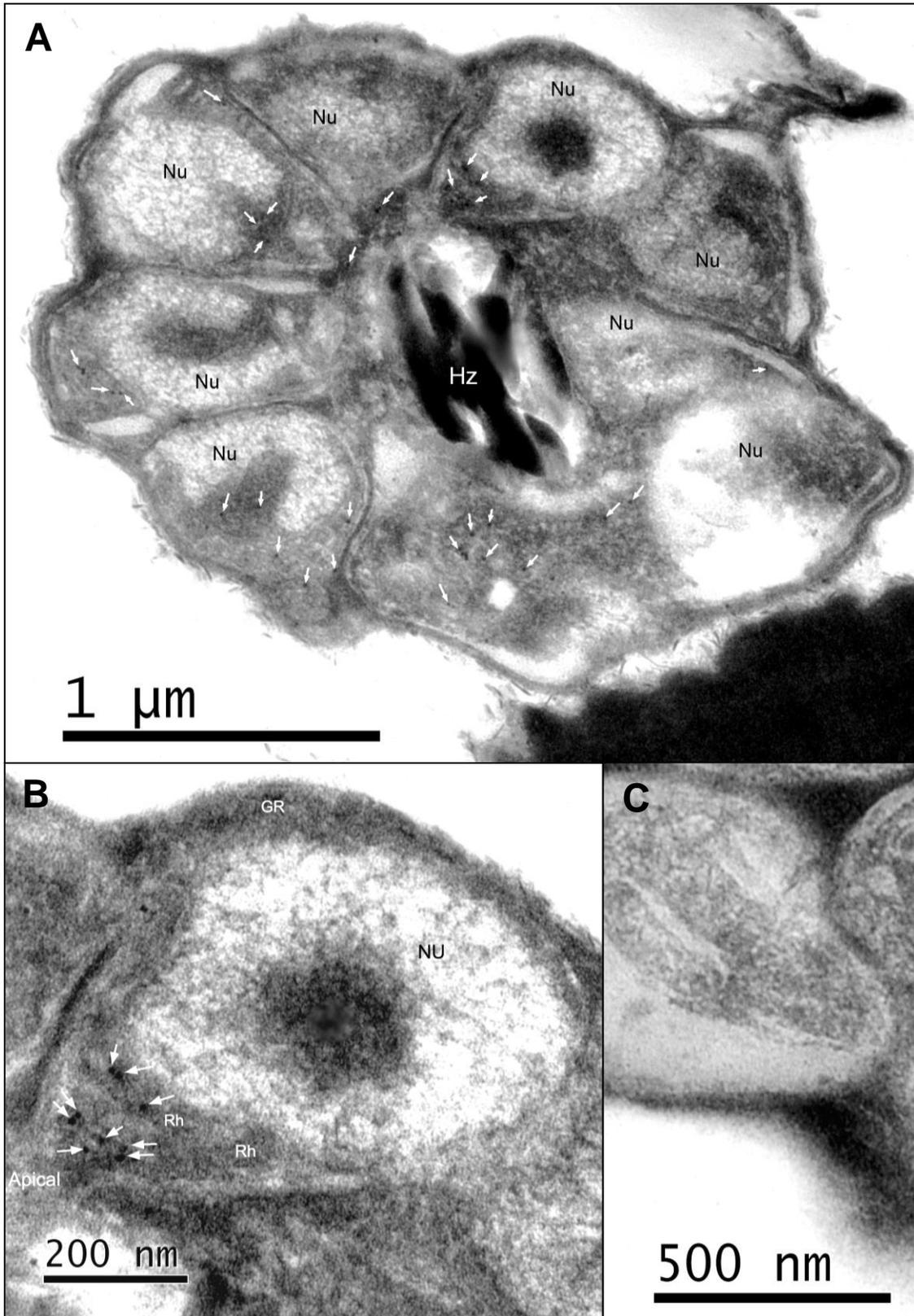


Figura 4-31 Localización inmunoelectrónica de PfMyoB en esquizonte de *P. falciparum* con anticuerpo AbP2. **A.** Corte transversal de esquizonte con 9 merozoítos visibles. **B.** Acercamiento a merozoítos de la figura A. **C.** Corte control de merozoítos en esquizonte incubado con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a oro 10 nm, no se observa marcaje significativo. Las flechas blancas muestran el inmunomarcaje de oro de 10 nm. NU: núcleo, Rh: roptria, Hz: Hemozoína, GR: glóbulo rojo, Apical: extremo apical de merozoítos.

preparaciones de esquizontes; como anticuerpo primario se usó el mismo anticuerpo con el que se realizaron las IFAs (AbP2) y como anticuerpo secundario se usó un anticonejo acoplado a esferas de oro de 10 nm. La figura 4-31A muestra una imagen en la que se destaca la morfología conservada de un esquizonte con 9 merozoítos visibles con un núcleo definido de apariencia moteada y membranas que delimitan cada célula que se encuentran formando una corona alrededor de los cristales de hemozoína; la proteína PfMyoB se puede observar en los merozoítos localizada en el citoplasma y en algunos de ellos se detecta concentrada en el polo apical de la célula (figura 4-31B), distinguible por la presencia de estructuras electrodensas características del parásito como las roptrias (Rh en la figura). En el cuadro C de la misma figura se muestra el control negativo del ensayo en donde no se observan puntos de oro por inmunoreacción del anticuerpo secundario solo. Adicionalmente se muestran las imágenes de la figura 4-32 que corresponden a algunos acercamientos del citoplasma de merozoítos en los que se observa la proteína no ligada a organelos y también parece estar siendo transportada en vesículas que agrupan 4 y 6 esferas de oro, estas vesículas tiene un tamaño aproximado entre 60-100 nm. Estas son las primeras imágenes que se conocen de micrografías electrónicas de transmisión de la localización de MyoB en *P. falciparum*. En merozoitos, PfMyoA está distribuida en la periferia del parásito (Pinder et al., 1998, Yusuf et al. 2015) y según nuestros resultados PfMyoB no parece estar compartiendo la misma ubicación

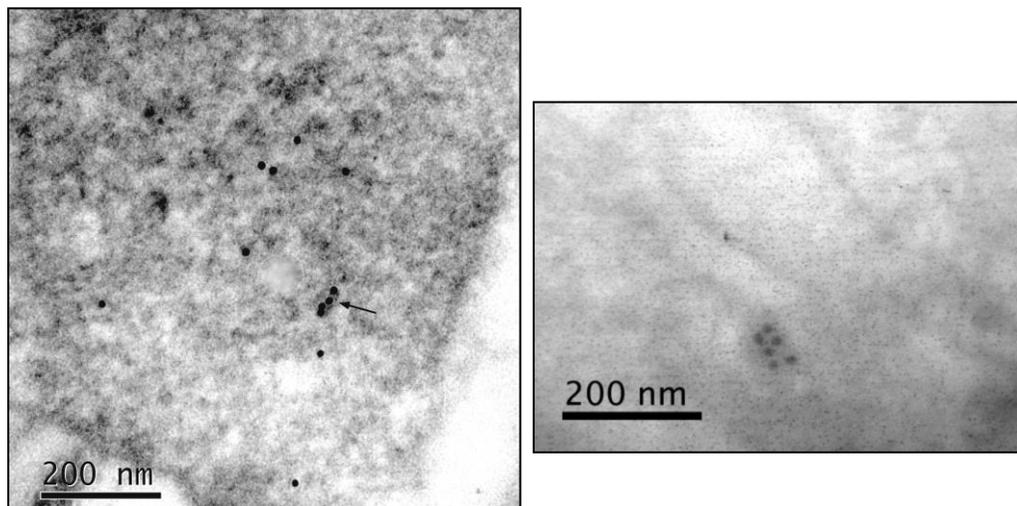


Figura 4-32 Detalle de localización inmunoelectrónica de PfMyoB en citoplasma de merozoíto de *P. falciparum* con anticuerpo AbP2.

Algunas esferas de oro de 10 nm se concentran en vesículas electrodensas señaladas con flecha negra en la imagen de la izquierda y ubicación evidente en la imagen de la derecha.

que PfMyoA. Con base en esto, consideramos que es posible que PfMyoB esté haciendo parte de un motor que se ubica exclusivamente en el polo apical de los merozoítos y que PfMyoA participe en el motor de la periferia del parásito. Este tipo de distribución diferencial celular de miosinas ha sido encontrado recientemente en taquizoítos de *T. gondii* (Graindorge et al., 2016), en donde hay tres diferentes motores actina-miosina que se ubican en el polo apical, en la periferia y en el polo posterior de los parásitos. En cada uno de esos motores hay asociada una miosina diferente con cadenas livianas únicas y también comunes a los tres. En *P. falciparum*, podría también estar ocurriendo un fenómeno similar, sin embargo se hacen necesarios ensayos conducentes a determinar qué proteínas interactúan con PfMyoB (por ejemplo proteínas que hagan parte de un complejo de invasión, que como en el caso de *T. gondii*, no necesariamente tienen que ser las mismas que interactúan con PfMyoA), qué cadenas livianas tiene el parásito adicionales a MTIP y cuál es su localización.

PfMyoB no pudo ser inmunoprecipitada

Se hicieron ensayos de IP con el anticuerpo AbP2 con el fin de establecer si con él se lograba concentrar y detectar la proteína PfMyoB, la figura 4-33 muestra un ensayo representativo: antes de la IP, PfMyoB se detecta (~100 kDa) en el extracto original (E); luego del ensayo, la proteína se detecta en la fracción que no se unió al anticuerpo (Dep.) pero no en la IP. Se hicieron varios ensayos cambiando condiciones como la cantidad de extracto, cantidad de anticuerpo, tiempo de incubación y diferentes *buffers*, pero no se obtuvieron resultados positivos. Es posible que el problema radique en que estos anticuerpos están desarrollados a partir de una secuencia corta de la proteína, si bien la afinidad del anticuerpo es alta, al unirse a un sitio único la avidéz no lo es y el

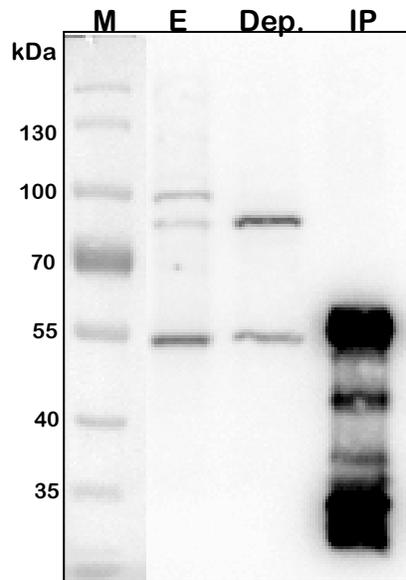


Figura 4-33 WB de IP anti-MyoB usando anticuerpo AbP2 sobre extractos de esquizontes.

M: marcador de peso PageRuler kDa (Thermo); E: detección sobre extracto, Dep: extracto inmunodepletado (lo que no se unió al anticuerpo+perlas de proteína A/G agarosa), IP: inmunoprecipitado con AbP2. Detección por quimioluminiscencia- documentador de geles. El asterisco indica la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

complejo no es lo suficientemente estable para ser inmunoprecipitado y por tanto la dependencia de la técnica por esas uniones únicas hace que no se obtengan los resultados esperados. A pesar de estos resultados se decidió hacer un ensayo de IP con los anticuerpos AbP1 y AbP2, correrlo en un gel, teñirlo con Coomassie y cortar secciones del gel con el fin de enviar esas muestras a análisis proteómico en LC/MS/MS, para explorar la posibilidad de detectar la proteína PfMyoB inmunoprecipitada en pequeñas cantidades que fueron indetectables por medio de WB, pero que podrían ser captadas desde el gel directamente. Tampoco se obtuvieron resultados positivos con

este acercamiento que a continuación describimos. La figura 4-34 muestra el gel de las IP con los dos anticuerpos y en él se señalan en rectángulos los fragmentos de gel que fueron cortados y enviados al servicio de proteómica. Estas zonas se escogieron a conveniencia: unas con base en el peso molecular esperado para PfMyoB y otras con base en la presencia de bandas diferenciales. Se corrió también a modo de control un carril correspondiente con una fracción de proteínas del extracto que se unen a las perlas de agarosa que se usaron en la IP, que luego se sustraen de los resultados que se obtengan con los anticuerpos.

De cada uno de los cortes de gel se obtuvo un reporte de péptidos y de proteínas con su correspondiente identidad, que puede observarse en la tabla 4-2. Para cada anticuerpo se muestran los resultados de los péptidos encontrados en el ensayo de IP como péptidos únicos y péptidos enriquecidos. Los péptidos únicos fueron encontrados exclusivamente en cada IP y los péptidos enriquecidos corresponden a los que también se encontraron en las perlas pero que se tienen en cuenta debido a que están representados en la muestra en una relación superior a 1:5.

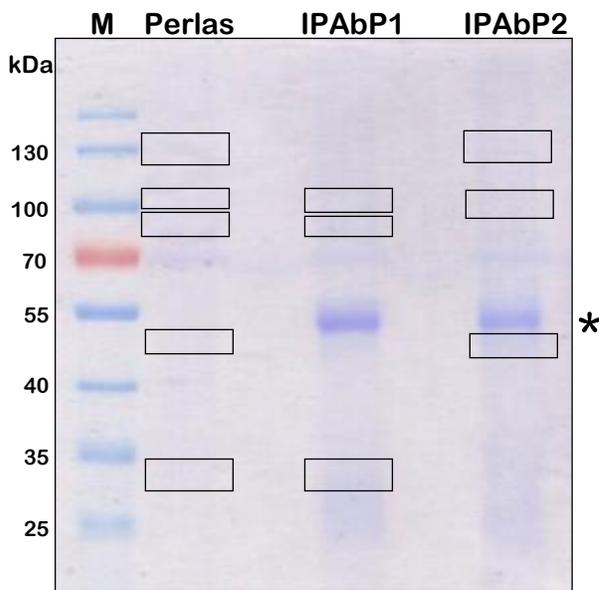


Figura 4-34 Gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie de ensayo de IP anti-MyoB usando anticuerpos AbP1 y AbP2 sobre extractos de esquizontes. M: marcador de peso PageRuler kDa (Thermo); Perlas: control de proteínas del extracto que se unen a las perlas (proteína A/G-agarosa), IPAbP1 e IPAbP2: IP con cada anticuerpo. El asterisco indica la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

Tabla 4-2 Proteínas identificadas del ensayo de IP con anticuerpos AbP1 y AbP2 de extractos de esquizontes

IP con anticuerpo AbP1		
Descripción	Peso molecular kDa	No. de péptidos
Péptidos únicos		
>C0H4P2_C0H4P2_PLAF7 Uncharacterized protein	420	21
>Q8IDQ2_Q8IDQ2_PLAF7 Kelch protein, putative	84	12
>Q8IHx6_Q8IHx6_PLAF7 Conserved Plasmodium protein	221	10
C0H4P2_C0H4P2_PLAF7 Uncharacterized protein	420	10
>Q8I574_Q8I574_PLAF7 Splicing factor 3b, subunit 3, 130kD, putative	151	7
>Q8I451_Q8I451_PLAF7 Uncharacterized protein	328	7
>Q8I5Y3_Q8I5Y3_PLAF7 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	116	5
>Q8ID94_YPF12_PLAF7 Uncharacterized protein MAL13P1.304	210	5
Péptidos enriquecidos		
>Q8I5S6_Q8I5S6_PLAF7 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	166	30
>Q8I395_Q8I395_PLAF7 RhopH3	105	19
>Q7KQL9_ALF_PLAF7 Fructose-bisphosphate aldolase	40	13
>O96236_O96236_PLAF7 DNA-directed RNA polymerase	152	9
>Q8I484_Q8I484_PLAF7 Rhoptry-associated protein 2, RAP2	47	5
IP con anticuerpo AbP2		
Descripción	Peso molecular kDa	No. de péptidos
Péptidos únicos		
>Q8IHP7_Q8IHP7_PLAF7 Conserved Plasmodium protein	158	15
>Q8IK09_Q8IK09_PLAF7 Conserved Plasmodium protein	111	12
>Q8IL94_Q8IL94_PLAF7 Ribonucleoside-diphosphate reductase	97	10
>Q8IIA4_Q8IIA4_PLAF7 Threonine--tRNA ligase, putative	119	8
>O97250_O97250_PLAF7 60S ribosomal protein L7, putative	30	8
>Q8IAZ5_Q8IAZ5_PLAF7 Vacuolar sorting protein VPS9, putative	214	8
>Q8IHU4_Q8IHU4_PLAF7 Conserved Plasmodium protein	324	7
Péptidos enriquecidos		
>Q8IC16_Q8IC16_PLAF7 DNA replication licensing factor mcm7 homologue, putative	93	16
>Q8I395_Q8I395_PLAF7 RhopH3	104	16
>O97313_RS3A_PLAF7 40S ribosomal protein S3a	30	14
>O96153_O96153_PLAF7 Proteasome 26S regulatory subunit, putative	108	12
>Q8IIG8_Q8IIG8_PLAF7 Conserved Plasmodium protein	208	8
>Q7KQK3_Q7KQK3_PLAF7 Heat shock protein DNAJ homologue Pfj4	28	7

Según los resultados del experimento de IP con los dos anticuerpos mostrados en la tabla 4-2, no se identificaron péptidos de la proteína PfMyoB ni tampoco se identificaron cadenas livianas o proteínas de tipo CaM. Es evidente que por medio de los ensayos de IP no se obtuvieron resultados positivos con los anticuerpos usados como se vio con los anticuerpos producidos en rata anteriormente. Están reportados casos en los que se puede identificar claramente una proteína con un anticuerpo por medio de WB pero que no puede ser inmunoprecipitada usando el mismo anticuerpo y una de las explicaciones

que merece tenerse en cuenta es que posiblemente en su conformación nativa el o los epítopes reconocidos por el anticuerpo podrían no estar expuestos y no ser accesibles al reconocimiento en la IP (Trieu y Targoff, 2015). Claramente en este estudio se ha demostrado que usando varios anticuerpos producidos contra diferentes zonas de la proteína PfMyoB y obtenidos en diferentes organismos (rata, conejo) no fue posible la inmunoprecipitación de la proteína y de sus cadenas livianas o proteínas de interacción. Debido a estos resultados, decidimos hacer una exploración por medio de un acercamiento bioinformático para evaluar si teóricamente la interacción de PfMyoB con MTIP es posible, dadas las evidencias mostradas anteriormente sobre la similaridad estructural de PfMyoB con PfMyoA. A continuación mostramos ese análisis *in silico* y posteriormente retomamos esta hipótesis por medio de una serie de experimentos *in vitro*.

PfMyoB puede interactuar con MTIP *in silico*

4.3 Bioinformática II: Búsqueda *in silico* de posibles lugares de interacción entre PfMyoB y MTIP

El *docking* es una técnica computacional que busca confirmar la unión de un ligando candidato con un receptor, estos pueden ser estructuras de moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos, entre otros. Sometimos a esta técnica dos modelos tridimensionales: la cola de PfMyoB (residuos 760-801) y MTIP (residuos 60-204), de ésta última solo se toman estos residuos ya que corresponden a la secuencia de los motivos EF-hand de los cuales ya se ha comprobado su participación en la unión con PfMyoA (Thomas et al., 2010). De la cola de PfMyoB se tomaron las secuencias propuestas para motivos IQ mostradas previamente en la figura 4-1 (IQ: LQLAQAYFRKYKYI e IQ putativo: LCCITSALIMKIKKR) y se realizaron varios ensayos de *docking*: uno, que involucró cada motivo IQ separadamente en la interacción con MTIP y otro, en donde se usa una secuencia que abarca los dos motivos IQ. La figura 4-35 muestra los modelos de interacción obtenidos con dos vistas: A y B muestran vistas transversales al eje de la hélice IQ e IQ putativo de PfMyoB (en rojo) y es claro en ambas imágenes que la proteína MTIP (en azul) se dispone como una abrazadera alrededor de los péptidos de PfMyoB; la segunda vista mostrada en las figuras C y D es una panorámica superior que muestra la región de unión entre los dominios N-terminal y C-

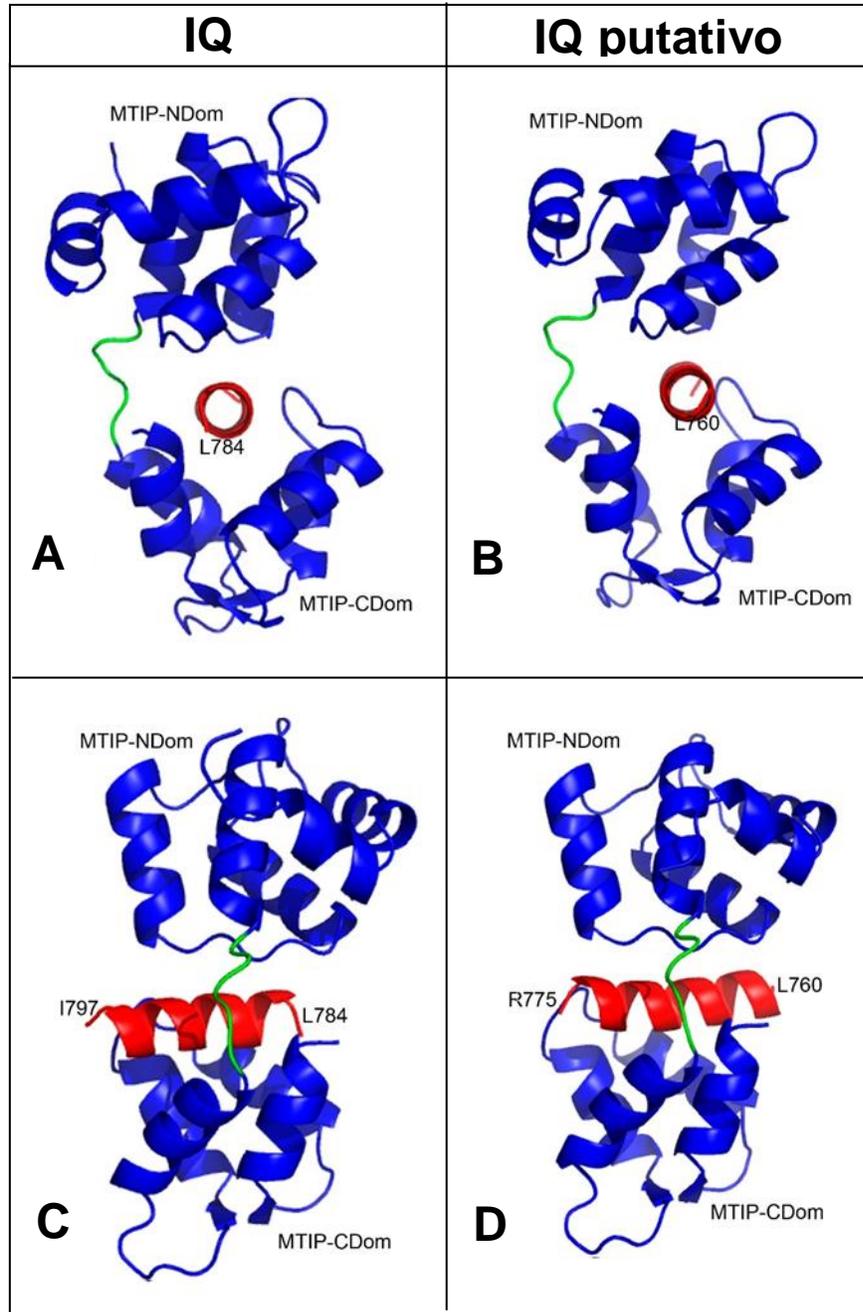


Figura 4-35 Docking molecular entre motivos IQ de PfMyoB y MTIP.

A y C. Vista lateral y superior de la interacción entre IQ y MTIP; **B y D.** Vista lateral y superior de la interacción entre IQ putativo y MTIP. Se muestra a MTIP en azul con zona de puente o *hinge* en verde, se marca la posición de los dominios N y C terminal; IQ en rojo, se marcan los aminoácidos de los extremos del péptido. Modelos de cintas preparados en PyMOL.

terminal de MTIP (conocida como puente o “hinge” en verde) (Douse et al., 2012) y la hélice de PfMyoB cruzando a través de ellos. En esta vista parece que la interacción entre el motivo IQ putativo de PfMyoB y MTIP (figura 4-35D) genera una estructura más compacta que la formada entre el motivo IQ de PfMyoB y MTIP (figura 4-35C).

Tabla 4-3 Resultado de cálculo de interacción usando PatchDock entre motivos IQ e IQ putativo de PfMyoB y MTIP. VdW, energía de Van der Waals.

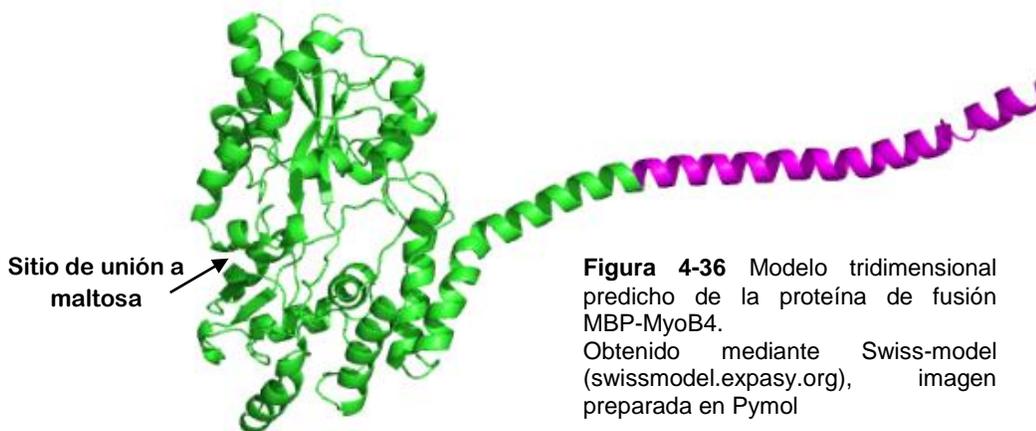
Ligante	E-Global (kcal/mol)	VdW atracción	VdW Repulsión	Residuo Ligante en PfMyoB	Residuo receptor en MTIP
IQ Residuos 784 a 797 LQLAQAYFRKYKYI	-88.57	-39.15	13.42	Gln-788	Asp-139
				Lys-795	Met-147
				Tyr-790	Ile-167
				Tyr-790	Gly-172
IQ putativo Residuos 760 a 775 LCCITSALIMKIKKR	-114	-28.88	9.63	Cys-761	Gly-172
				Thr-764	Asp-173
				Ser-765	Pro-106
				Lys-770	Asp-201
IQ putativo + IQ Residuos 760 a 801 LCCITSALIMKIKKKRIVEEN IKNLQALQAYFRKYKYIKEHE	-78.5	-27.95	9.75	Lys-770	Asp-139 His-136
				Met-769	Glu-143
				Lys-772	Met-147
				Lys-773	Glu-143

Adicionalmente, en la tabla 4-3 se muestra la energía de enlace y los aminoácidos involucrados en la unión entre cada uno de los IQs evaluados de PfMyoB y MTIP. La energía de unión tiene dos componentes: un valor de energía global y energías de Van der Waals de cada interacción asociados con los puentes de hidrógeno hallados en el *docking*; los valores negativos indican que las interacciones descritas son estables y que no son eventos azarosos. El valor de energía global obtenido para la interacción entre el IQ putativo y MTIP es mejor (más negativo) que el obtenido para IQ y MTIP, también se evidencia la participación de más puentes de hidrógeno en el primer caso. Cuando se sometió a *docking* molecular una extensión del cuello de PfMyoB que abarcó los aminoácidos 760 al 801 e involucró a los dos IQ, se obtuvo como resultado una disposición de MTIP sobre la región del IQ putativo. De acuerdo con los resultados obtenidos por medio de este estudio *in silico*, la unión de PfMyoB con MTIP es posible y podría darse en cualquiera de las dos regiones de IQ, siendo más favorecida energéticamente la unión al IQ putativo. Esta disposición espacial de MTIP sobre el motivo IQ putativo de PfMyoB es similar a la estructura que adopta el IQ de PfMyoA con MTIP que fue determinada por medio de cristalografía de rayos X y que está depositada en el Protein Data Bank (www.pdb.org) bajo el código 4AOM.

Uno de los aspectos que puede generar interrogantes es cómo se organizarían las cadenas livianas en estas miosinas para ejercer su función a pesar de tener un dominio de cola tan pequeño. Es importante anotar que las miosinas tienen dos o más sitios de unión en su dominio de cuello: de unión a una cadena liviana regulatoria y otros de unión a cadenas livianas esenciales (Coluccio, 2008). Actualmente se sabe que PfMyoA solo se une a MTIP a través del motivo IQ y aún no se conoce si hay otra proteína de tipo cadena liviana involucrada con esta miosina. Para PfMyoB se postuló una posible cadena liviana de 79 kDa (plasmodb: PF3D7_1118700) que se une con gran afinidad al sitio IQ de PfMyoB (Yusuf et al., 2015), esta sería una de las cadenas livianas más grandes reportadas para cualquier especie hasta el momento, la mayoría de proteínas tipo CaM tienen masas moleculares inferiores a 20 kDa (Trybus, 1994).

De todo nuestro estudio *in silico*, nosotros no descartamos la posibilidad de que PfMyoB al tener una gran similitud estructural con PfMyoA pueda llegar a reemplazarla dadas ciertas condiciones bioquímicas celulares en las que la función de PfMyoA se pueda ver comprometida, o también se podría pensar que PfMyoB participe en un motor exclusivo restringido a la zona apical del merozoíto, como se enunció anteriormente a partir de los resultados de microscopía.

Con el fin de retar estos resultados de bioinformática diseñamos los experimentos de interacción *in vitro* que se muestran en el siguiente apartado, en ellos usamos la proteína MyoB4 que representa la cola de MyoB. Con base en la secuencia de ADN del constructo que obtuvimos en pMAL, modelamos la secuencia de aminoácidos codificada



y obtuvimos una estructura tridimensional de esta proteína de fusión (MBP + cola de miosina). La figura 4-36 muestra la estructura de la proteína en donde se distinguen dos zonas, una globular en verde que representa la proteína MBP en la que se destaca el sitio de unión a maltosa y por otro lado una alfa hélice erguida que tiene la secuencia de la cola de PfMyoB en magenta. Podemos considerar que la proteína de fusión podría tener esta estructura que se asemeja a la predicha para la proteína PfMyoB y con la cual queremos resaltar que la proteína que usamos para los experimentos *in vitro* podría tener una conformación que permitiría la interacción con MTIP.

PfMyoB puede interactuar con MTIP *in vitro*

4.4 Ensayos de *far western blot* y *pull-down*

Con el fin de fortalecer la hipótesis que surgió de los ensayos *in silico* de interacción entre PfMyoB y MTIP, se realizaron varios experimentos de interacción proteína-proteína *in vitro* en los cuales se usaron las proteínas recombinantes obtenidas de las miosinas PfMyoA y PfMyoB y de MTIP, cuyos resultados se muestran a continuación.

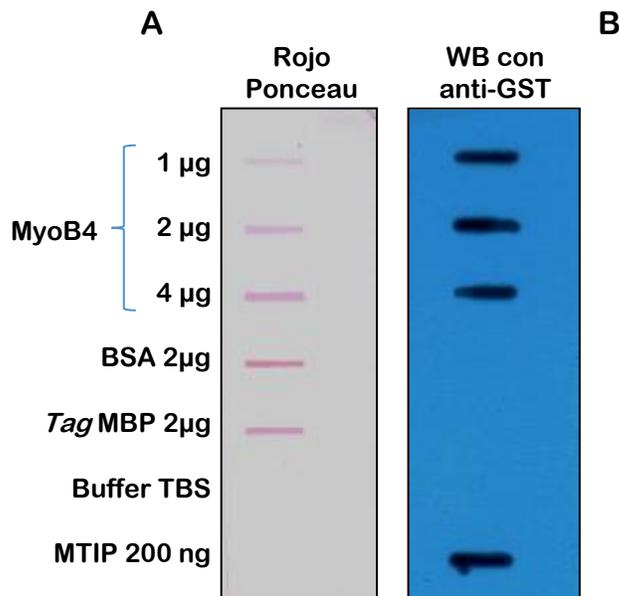


Figura 4-37 Far Western Blot de cola de PfMyoB (MyoB4) y MTIP.

A. Membrana de PVDF con proteínas de PfMyoB, control de BSA, *tag* de MBP, MTIP (control de WB). Esta membrana se incubó con 10 µg de MTIP por 16 hr, después de lavados, las proteínas unidas se revelaron en **B** con un anticuerpo anti-GST (detección por quimioluminiscencia en película de rayos X).

Primero, se muestra el ensayo de *far western blot* entre PfMyoB y MTIP en la figura 4-37, allí se observa a la izquierda una membrana de PVDF que tiene unidas las proteínas

carnada del experimento teñidas con rojo ponceau. La proteína recombinante de la cola de PfMyoB se sembró en diferentes cantidades: 1, 2 y 4 μg , igualmente se sembró BSA como control de proteína no relacionada con el ensayo, también MBP que es la proteína de fusión que acompaña a MyoB4, buffer TBS y como control del WB se sembraron 200 ng de MTIP. Esa membrana se incubó con la proteína MTIP toda la noche, se hicieron lavados extensivos y posteriormente se realizó el WB con un anticuerpo anti-GST que reconoce a MTIP, por tanto, donde hay señal es porque MTIP se unió o interactuó. En la parte B de la figura 4-37 puede verse que donde se encuentra MyoB hay señal de interacción específica de MTIP y en las ranuras donde hay *buffer* u otras proteínas como BSA y el *tag* MBP no hay detección. En la película puede notarse que a pesar de que hay cantidades diferentes de PfMyoB la señal de MTIP es muy similar en todos los casos, esto puede deberse a que este revelado es muy sensible y en ensayos de este tipo el sistema se satura muy rápidamente. Podría pensarse que usando menos cantidad de proteína en la membrana podrían verse diferencias, sin embargo, en nuestra experiencia, al usar cantidades menores de la proteína carnada (0.2 a 1 μg) la señal de interacción obtenida fue muy débil, por eso, decidimos usar una cantidad de 2 μg para obtener siempre una señal clara en los ensayos que se mostrarán más adelante. Igualmente, se hizo un ensayo de interacción en el cual se incubó la proteína MyoB4 con el *tag* GST con el fin de confirmar que la señal de unión no era debida a la presencia del *tag* de MTIP y efectivamente se vio que no hubo reacción. Con este ensayo de *far western blot* usando las proteínas purificadas y donde no se realiza ningún paso de denaturación podemos garantizar que hay preservación de la conformación nativa de las proteínas y por tanto las interacciones que se identificaron entre MyoB y MTIP pueden considerarse específicas (Wu et al., 2007). De la misma forma se hizo el ensayo de interacción con PfMyoA y MTIP que se muestra en la figura 4-38, con resultados similares a los obtenidos para PfMyoB, esto confirma que la técnica utilizada es consistente y que las proteínas tienen conformaciones estructurales adecuadas y no azarosas que permiten la unión correcta.

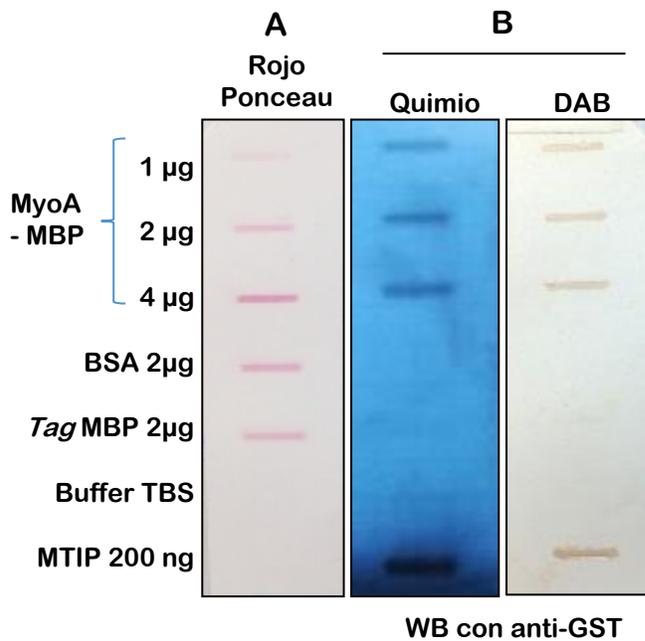
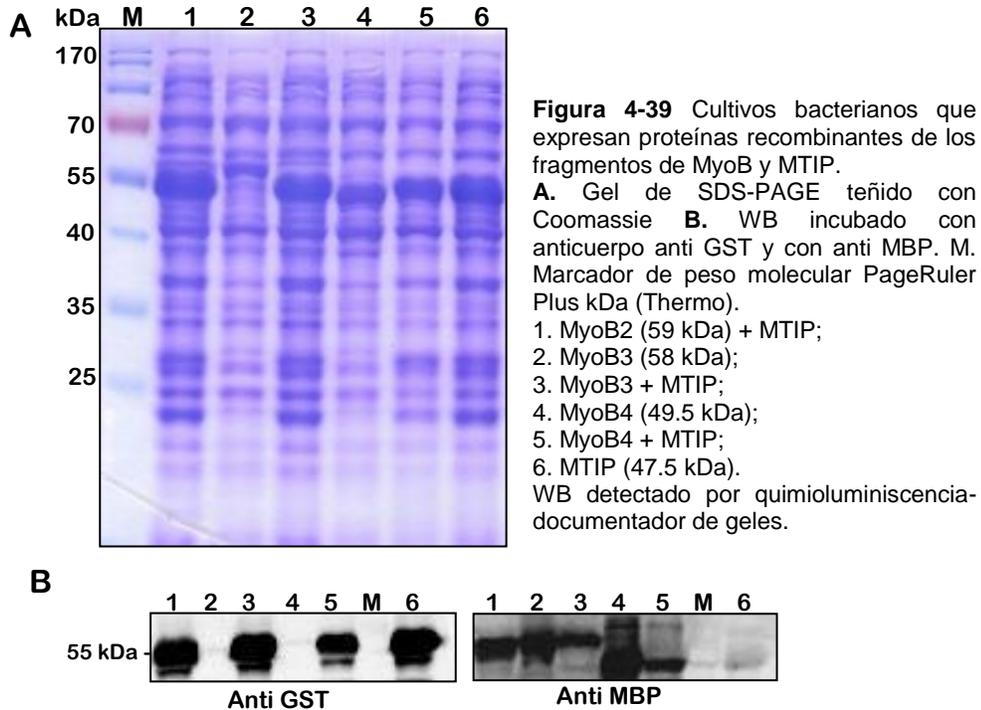


Figura 4-38 Far Western Blot de cola de PfMyoA (MyoAMB) y MTIP.

A. Membrana de PVDF con proteínas de PfMyoA, control de BSA, tag de MBP, MTIP (control de WB). Esta membrana se incubó con 10 µg de MTIP por 16 hr, y después de lavados, las proteínas unidas se revelaron en **B** con un anticuerpo anti-GST se usaron dos tipos de detección, por quimioluminiscencia (Quimio) en película de rayos X y con DAB.

Otros acercamientos que se hicieron para demostrar la interacción *in vitro* de PfMyoB con MTIP fueron ensayos de *pull-down* o coprecipitación, el primero de ellos se hizo mezclando extractos de bacterias que expresaban las proteínas recombinantes y como cada proteína tenía un *tag* específico, el complejo se atrapó por medio de una resina afín con uno de los *tags* y la detección de la unión se realizó por medio de WB con un anticuerpo que reconocía el *tag* de la segunda proteína. Se usaron proteínas recombinantes de varios fragmentos de PfMyoB que incluyeron a MyoB4 (el dominio de cola de PfMyoB), MyoB3 (la cola completa más una pequeña extensión de la cabeza) y MyoB2 (un fragmento de cabeza); cada uno de ellos se mezcló con un extracto de bacterias que expresaba la proteína MTIP. En la figura 4-39 se muestra la expresión de las proteínas recombinantes en los cultivos bacterianos para las proteínas recombinantes de PfMyoB solas o mezcladas con MTIP y en la parte inferior de la misma figura se muestra el WB usando los anticuerpos que detectan el *tag* correspondiente para las recombinantes de PfMyoB (MBP) y para la recombinante MTIP (GST). En la parte A puede observarse una banda robusta a la altura de 55 kDa que indica la presencia de MTIP y/o de las proteínas de MyoB (que tienen masas similares); en la parte B se detectan esas proteínas por medio de WB con anti-GST o con anti-MBP, esto demuestra la buena calidad del material de partida que se usó para el experimento de *pull-down*. Esos cultivos se recolectaron, se lisaron y la fracción soluble de cada uno se pasó por una resina de amilosa de la cual se recuperaron muestras como en una cromatografía de

afinidad que posteriormente se evaluaron por electroforesis de SDS-PAGE, transferencia y WB usando los anticuerpos dirigidos contra los *tags*.



La figura 4-40 muestra los resultados de ese experimento: cada columna de imágenes representa una pareja de proteínas recombinantes que se mezclaron para probar su interacción, cada pareja se especifica sobre los corchetes: MyoB4 + MTIP, MyoB3 + MTIP, MyoB2 + MTIP, MBP + MTIP y GST + MyoB4. A cada mezcla se agregó la matriz de amilosa, a la cual sólo se unen proteínas con *tag* MBP; es decir, solo se unirán las recombinantes de miosina con *tag* MBP. Ya sea en el SDS-PAGE (panel A), en el WB con anti MBP (panel B) o en el WB con anti GST (panel C), se muestra la fracción de proteínas que no se unió a la resina (NU: fracción no unida), la última fracción colectada después del lavado (L) y la fracción eluída (E), en la cual debe aparecer la proteína MTIP y cualquier otra proteína del extracto que se haya unido a ella. Así, el WB con anti MBP permite detectar la presencia de la miosina y el WB con anti GST permite establecer si la proteína MTIP recombinante usada se unió o no a la miosina o al tag MBP. Las proteínas recombinantes MyoB3 y MyoB4 tienen el dominio de cola de PfMyoB y la proteína MyoB2 tiene sólo un fragmento del dominio de cabeza de PfMyoB; entonces, dado que según nuestra hipótesis PfMyoB puede interactuar con MTIP a través de su dominio de cola, es de esperarse que no se tuviera una interacción detectable al usar MyoB2 con MTIP. En la

figura 4-40 se observa que solamente en el caso de la mezcla de MTIP con las proteínas MyoB4 (cola de MyoB) y MyoB3 (cola de MyoB más porción de la cabeza) se detecta la señal en el WB para MTIP (carril E, panel C figura 4-40), lo que implica que se formó un complejo entre la cola de B y la recombinante MTIP que fue atrapada por la resina. Adicionalmente se confirmó que tanto el fragmento que corresponde a MyoB2 como el *tag* de MBP (42 kDa) usados como controles negativos de la interacción no forman un complejo con MTIP. Fue necesario hacer otro control adicional en el que se puso a interactuar el *tag* GST (24 kDa) con la proteína MyoB4, con el fin de constatar que la

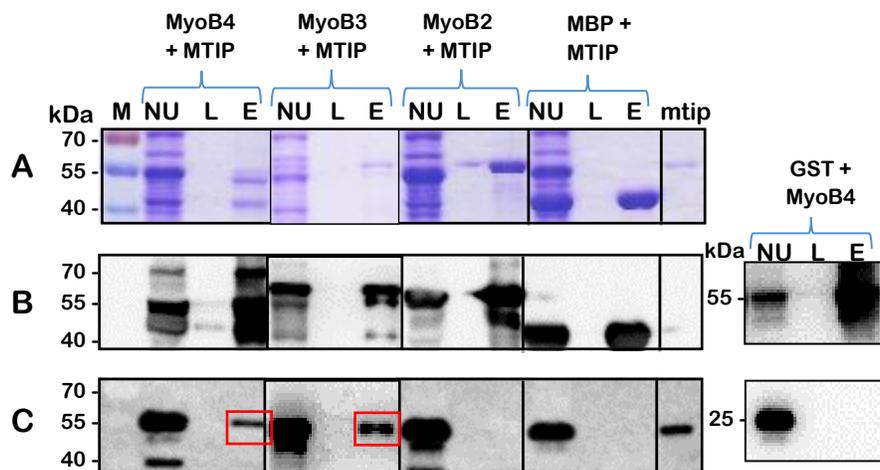


Figura 4-40 Purificación de los complejos de interacción entre proteínas recombinantes de los fragmentos de MyoB y MTIP con resina de amilosa. **A.** Gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie **B.** WB incubado con anticuerpo anti MBP; **C.** WB incubado con anti GST. M. Marcador de peso molecular PageRuler Plus kDa (Thermo). NU. Fracción no unida a la resina; L. lavado; E. eluido; mtip. 200 ng de proteína MTIP. WB detectado por quimioluminiscencia–documentador de geles.

interacción que se quiso evaluar no fuera falsamente debida a la unión de la miosina con el *tag* de MTIP: en la parte derecha de la figura 4-40 que corresponde con este control no se aprecia banda del *tag* GST unido a la cola de MyoB en el eluido E. Finalmente, se hizo un control que consistió en pasar la proteína MTIP por una resina de amilosa y se verificó que la proteína no se une inespecíficamente a la resina. Con estos resultados se confirma la interacción específica entre las proteínas recombinantes de la cola de PfMyoB y MTIP.

En el siguiente experimento de *pulldown* se usó la proteína recombinante de la cola de MyoB4 y MTIP purificadas, el ensayo consistió en lo siguiente: a una resina de glutatión

agarosa se unió la proteína MTIP, posteriormente esta mezcla se incubó con la proteína MyoB4 toda la noche, se hicieron luego lavados extensivos y después se observó si hubo formación del complejo de las dos proteínas evaluando por SDS-PAGE, transferencia y WB con anti-MBP. Se realizaron controles al experimento: un *pulldown* con la proteína MBP mezclada con MTIP y otro control que consistió en incubar las proteínas MyoB4 y MBP por la resina de glutatión con el fin de verificar que no existiera unión inespecífica. En la figura 4-41 se observan los resultados del *pulldown* con las proteínas

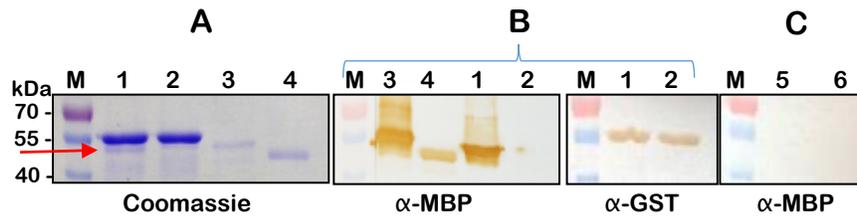


Figura 4-41 *Pulldown* para análisis de la interacción entre MTIP y MyoB4. **A.** Gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie **B.** WB incubado con anticuerpo anti MBP y antiGST. **C.** WB control de interacción de MyoB4 y MBP con la resina de glutatión. M. Marcador de peso molecular PageRuler kDa (Thermo). 1. Pulldown MTIP-MyoB4, 2. Pulldown MTIP-MBP, 3. 300 ng de MyoB4, 4. 300 ng de MBP, 5. MyoB4 + resina glutatión, 6. MBP + resina de glutatión. WB detectado con DAB.

recombinantes en el cual se puede apreciar que MyoB4 y MTIP interactúan establemente porque la proteína MyoB4 se detecta incluso en el gel teñido con Coomassie en el carril 1 de la figura 4-41A (señalado con flecha) como una banda que corresponde con la banda del carril 3 y que se confirma con la señal a la misma altura en el WB del *pulldown* revelado con anti-MBP (carril 1 parte B). MTIP no se une al *tag* MBP (carril 2 figura 4-41) así como las proteínas MyoB4 y MBP no se unen a la resina de glutatión (carriles 5 y 6).

Con los resultados obtenidos de los anteriores experimentos se comprueba que las proteínas MyoB4 y MTIP forman un complejo estable, que lo hallado mediante bioinformática es reproducible *in vitro*, que esas uniones son específicas y que a pesar de que los *tags* son grandes no hay interferencia o inespecificidades en el resultado. Los ensayos de *pulldown* son muy útiles para confirmar la interacción directa entre proteínas o para enriquecer una proteína en particular.

PfMyoB recombinante puede unirse a la proteína MTIP nativa

Una vez confirmada la unión de las proteínas recombinantes de MTIP y PfMyoB con todos los resultados anteriormente mostrados, se hizo un ensayo de *pulldown* usando las recombinantes MyoB4 y MTIP con extractos de proteínas de esquizontes de *P. falciparum*. Primero, se hizo un *pulldown* usando como carnada la proteína MTIP (unida a las perlas de glutatión agarosa) con 300 µg de extracto de esquizontes, ese *pulldown* se evaluó mediante SDS-PAGE, transferencia y WB. La detección de PfMyoB en el WB se hizo con el anticuerpo AbP2, como control positivo del experimento se realizó la detección de PfMyoA usando el anticuerpo correspondiente producido en este trabajo, ya que se asume que al usar como carnada MTIP, la PfMyoA del extracto con certeza se unirá a ella

La figura 4-42 muestra en el gel poliacrilamida el extracto de proteína de esquizontes que se usó para hacer el *pulldown* (carril 1), el *pulldown* usando a MTIP como carnada (carril 2) y una reacción de *pulldown* control usando el tag GST (carril 3). También se muestra la imagen correspondiente a la detección por WB de las dos miosinas nativas en el carril 1 (parte B); para PfMyoA se ve una señal de *pulldown* en el carril 2 del WB, lo que indica que la proteína recombinante de MTIP atrapó a PfMyoA que se encontraba en el

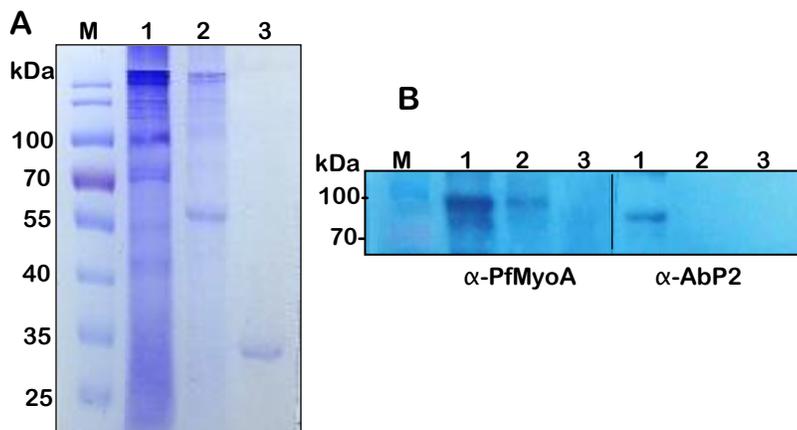


Figura 4-42 *Pulldown* para análisis de la interacción entre MTIP recombinante y las proteínas nativas PfMyoA y PfMyoB en un extracto de esquizontes.

A. Gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie **B.** WB incubado con anticuerpo anti-PfMyoA y AbP2. M. Marcador de peso molecular PageRuler kDa (Thermo). 1. 50 µg de extracto de proteína de esquizontes. 2. *Pulldown* MTIP, 3. *Pulldown* GST. WB detectado por quimioluminiscencia – película de rayos X.

extracto; para PfMyoB no se encontró señal en el carril 2 del respectivo WB, lo que indica que la proteína recombinante de MTIP no unió la miosina nativa. Estos resultados pueden tener varias explicaciones: uno, puede indicar que la cantidad de proteína PfMyoB en el extracto es muy baja, por tanto, no se alcanza a detectar su señal por medio de esta técnica y por las condiciones que usamos; y dos, el resultado también podría indicar que MTIP no interactúa con PfMyoB. Con esto, decidimos hacer un nuevo experimento de *pulldown* usando como carnada la proteína recombinante de la cola MyoB4 y aparte como control, el *tag* MBP unido a una resina de amilosa. En el experimento se ensayaron diferentes cantidades de proteína recombinante MyoB4: 10, 20, 30 y 50 μg , pero con ninguna de esas cantidades se obtuvo *pulldown* de la proteína MTIP nativa. Posteriormente hicimos un ensayo de *pulldown* usando 100 μg de proteína recombinante MyoB4 y 300 μg de extracto de proteínas de esquizontes y los resultados de ese experimento se muestran en la figura 4-43 que a continuación se explican: en la parte A de la figura se muestra el gel teñido con Coomassie con el extracto usado en el carril 1 y los *pulldown* usando como carnada a MyoB4 (carril 2) y a MBP que (carril 3); en la parte B se muestra la detección de esas proteínas recombinantes con el anticuerpo anti-MBP y en C puede verse claramente la detección de la proteína MTIP tanto en el extracto (carril 1) como en el *pulldown* con MyoB4 (carril 2). En el carril 3 de la parte C no

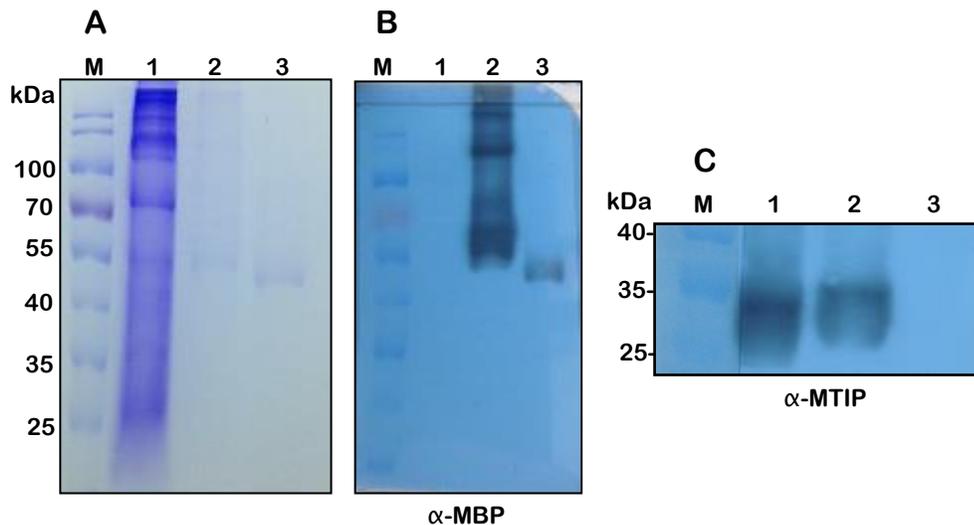


Figura 4-43 *Pulldown* para análisis de la interacción entre PfMyoB recombinante y la proteína MTIP nativa de un extracto de esquizontes. **A.** Gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie; **B.** WB incubado con anticuerpo anti-MBP; **C.** WB incubado con anticuerpo anti-MTIP. M. Marcador de peso molecular PageRuler kDa (Thermo). 1. 50 μg de extracto de proteína de esquizontes. 2. *Pulldown* MyoB4, 3. *Pulldown* MBP. WB detectado por quimioluminiscencia – película de rayos X.

hay detección de MTIP cuando se usa en el *pulldown* una carnada de MBP. Esto indica que las interacciones entre MyoB4 y MTIP son exclusivas de esas dos proteínas y que el *tag* MBP de MyoB4 no participa en esa unión.

Estos resultados parecen indicar que normalmente en los esquizontes toda la proteína MTIP se encuentra asociada con PfMyoA y que hay muy poca proteína PfMyoB, sólo cuando hay un exceso de PfMyoB puede darse una interacción que aparentemente bajo condiciones normales no ocurre, posiblemente porque PfMyoB está en muy baja cantidad en la célula o simplemente porque la afinidad de esa unión es muy baja comparada con la de PfMyoA y MTIP. Se conocen datos de estudios del transcriptoma de los estados intraeritrocíticos de *P. falciparum* los cuales revelan que la cantidad de transcrito para PfMyoB en esquizontes de 40 horas es seis veces menor a la cantidad de transcrito de PfMyoA y de MTIP, esto puede ser un indicativo de que también la cantidad de proteína de PfMyoB es baja y de ahí también se puedan explicar nuestros resultados (Otto et al., 2010; plasmodb.org). Nosotros hemos observado que PfMyoB parece ser mucho menos abundante que PfMyoA en ensayos de inmunoblot (cargando la misma cantidad de proteína total de parásito, ver figura 4-42B) e inmunofluorescencia. Aunque este resultado puede ser causado por diferentes eficiencias de los anticuerpos anti-PfMyoA y anti-PfMyoB usados, Yusuf y colaboradores obtuvieron un resultado similar usando anti-GFP para detectar las PfMyoA y PfMyoB. En ese trabajo, al hacer ensayos de inmunoprecipitación e inmunoblot sobre parásitos que expresaban PfMyoA-GFP o PfMyoB-GFP, la intensidad de las señales observadas indicó que PfMyoA-GFP era mucho más abundante que PfMyoB-GFP (Yusuf et al., 2015).

Como consecuencia de los resultados anteriormente obtenidos, vimos la posibilidad de que en una situación experimental *in vitro* controlada, MyoAHis y MyoB4 compitieran por el sitio de unión con MTIP, por ello, se hicieron ensayos de *far western blot* con las proteínas recombinantes en un experimento de competencia en el cual se tenía como carnada la proteína MTIP unida en cantidad fija a varias membranas, luego, cada una de ellas se incubó con la misma cantidad de proteína MyoAHis. Después se adicionó la proteína MyoB4 en diferentes cantidades por un tiempo de incubación de 16 horas. La detección de las interacciones se realizó por medio de WB usando anticuerpos dirigidos contra el *tag* His para detectar a MyoA y contra el *tag* MBP para detectar a MyoB. Los resultados de este ensayo pueden verse en la figura 4-44: en la parte superior se muestra la señal fuerte de detección de la interacción MTIP-MyoAHis que va

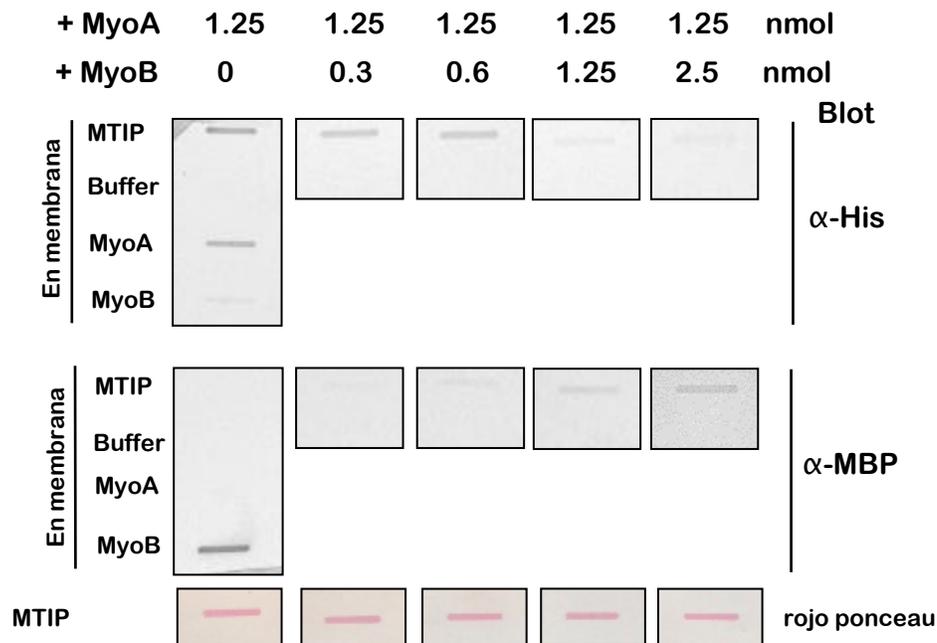


Figura 4-44 Far western blot de ensayo de competencia de las proteínas recombinantes PfMyoB y PfMyoA por la interacción con MTIP.

En las membranas se sembraron 2 μ g de MTIP y *buffer* TBS, luego todas se incubaron por 16 horas con 1.25 nmol de MyoAHis y con cantidades crecientes de MyoB4 según se muestra en la imagen. El WB se realizó con los anticuerpos que reconocen los *tags* de cada miosina, la detección se hizo con DAB bajo los mismos tiempos de incubación para cada membrana y la captura de la fotografía en alta resolución se realizó en el analizador de imágenes ChemiDoc MP (Biorad). Como controles del WB se sembraron 200 ng de MyoAHis y MyoB4 como se observa en las membranas de la primera columna de la izquierda. El MTIP que se fija en las membranas se tiñó con rojo ponceau y se muestra en los cuadros de la parte inferior de la figura.

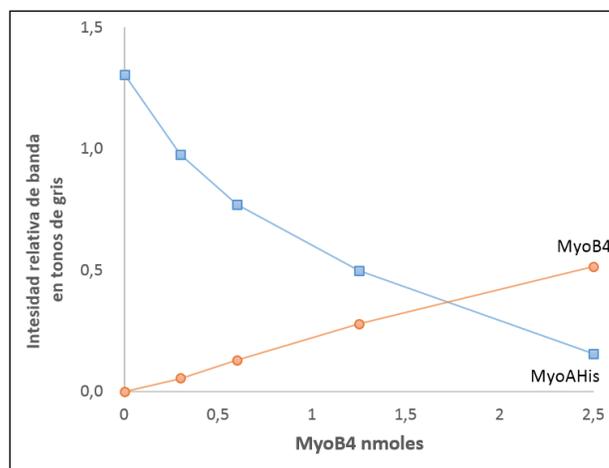


Figura 4-45 Intensidades relativas de las bandas de los ensayos de competencia de PfMyoB y PfMyoA por far western blot.

Se hicieron mediciones de densitometría de las bandas obtenidas por WB por medio del programa ImageJ (imagej.nih.gov) de dos experimentos independientes y los promedios se graficaron.

disminuyendo levemente cuando en la incubación hay 0.6 nmoles de MyoB4, luego en presencia de 1.25 y 2.5 nmoles del competidor MyoB4 esta disminución es evidente; consecuentemente en la parte inferior de la figura se registra la detección de MyoB desde 0.6 nmoles con una señal que va aumentando discretamente hasta 2.5 nmoles. Estos resultados muestran que “in vitro”, la proteína MyoB puede competir con MyoA por el sitio de unión a MTIP y desplazarla. Con el fin de hacer un análisis cuantitativo de este experimento, las intensidades de las bandas en la fotografía se registraron por medio de densitometría usando ImageJ, esos valores se graficaron con respecto a la cantidad de MyoB que se necesita para alcanzar el equilibrio en la reacción tripartita (MyoA-MyoB-MTIP), con el promedio de los datos obtenidos de dos experimentos independientes se obtuvo la gráfica de la figura 4-45. Al usar una cantidad constante de MyoAHis y adicionando cantidades crecientes de MyoB4 se puede ver que el equilibrio se alcanza en un valor cercano a 1.75 nmoles de MyoB, demostrándose así que esta proteína aunque tiene una afinidad menor, puede competir con PfMyoA por el sitio de unión a MTIP.

La unión MTIP-MyoB *in vitro* ocurre preferencialmente en el IQ putativo de MyoB

Retomando los resultados obtenidos en la simulación de *docking* molecular entre la estructura 3D de MTIP obtenida de PDB y tres fragmentos de PfMyoB que correspondían al motivo IQ, al motivo IQ putativo y a la secuencia que los contiene a ambos, se observó que el valor de energía obtenido para la interacción entre MTIP y el IQ putativo fue más negativo que el obtenido para la interacción entre MTIP y el motivo IQ; del mismo modo, se evidenció la participación de más puentes de hidrógeno en el primer caso. Cuando el fragmento IQ + IQ putativo se sometió al *docking*, se obtuvo como resultado una disposición de MTIP preferentemente sobre el motivo IQ putativo. Según estos antecedentes, decidimos confrontar experimentalmente esos resultados obtenidos mediante bioinformática con un sistema *in vitro* en el cual usamos péptidos sintéticos que tenían las secuencias IQ y la IQ putativa de PfMyoB, y los incubamos en la reacción de interacción MyoB4-MTIP en diferentes cantidades y posteriormente evaluamos por WB su efecto en la detección de la señal de la unión. Como control del ensayo se usaron

2007). El hecho de que una misma cadena liviana pueda unirse a varias miosinas en un mismo organismo o a diferentes motivos IQ en una miosina ya ha sido documentado: como por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* la cadena liviana Mlc1p interactúa con las miosinas Myo1p (clase II) y Myo2p (clase V) (Luo et al, 2004), mientras que la cadena liviana MlcC de *Dictyostelium discoideum* interactúa con los motivos IQ1 e IQ2 de la miosina MyoC (clase I) (Crawley et al, 2011).

En nuestro caso creemos que podría ser posible que MTIP pueda unir a PfMyoA por medio de su IQ y en otra situación a PfMyoB por medio de su IQ putativo, sin embargo, teniendo en cuenta la aparente abundancia relativa de PfMyoA respecto a PfMyoB en el parásito, también pensamos que la interacción entre MTIP y PfMyoB sólo sería posible en ambientes celulares específicos, o en las etapas iniciales de la invasión cuando el zoíto entra en contacto con la célula huésped mediante su polo apical, lugar donde se ubicaría un motor actina-MyoB.

Aunque nosotros mostramos aquí por medio de estudios *in silico* e *in vitro* que la interacción entre MTIP y PfMyoB es posible, evidentemente se requieren estudios *in vivo* para establecer si la interacción es real y cuál sería su significado biológico. Otro aspecto importante por aclarar sería cómo se organizarían las cadenas livianas en estas miosinas ya que tienen un dominio de cola tan pequeño y que los motivos IQ son tan cercanos espacialmente, esto porque recientemente se identificó una cadena liviana que se une con gran afinidad al sitio IQ de PfMyoB y se llamó Myosin Light Chain –B (MLC-B) (Yusuf et al., 2015), es una proteína de un tamaño inusualmente grande de 78 kDa, codificada por el gen PF3D7_1118700 (plasmodb.org) con un motivo EF-hand en su C-terminal por medio del cual parece unir la cola de PfMyoB. En ese estudio no se encontró asociación de MTIP con PfMyoB, a pesar de esto, a partir de nuestros resultados consideramos que esta interacción es posible y no excluyente con la que tiene MyoB con MLC-B. Por supuesto, también es posible que la interacción PfMyoB-MTIP no ocurra *in vivo* y que al motivo IQ putativo de PfMyoB se una a una proteína aun no identificada o no se una a ninguna cadena liviana, como ya se ha visto para otros motivos IQ en otras miosinas. Ciertamente, la secuencia de los motivos IQ en PfMyoA y PfMyoB es tan degenerada que es muy difícil establecer cuántas y cuáles cadenas livianas podrían unirse a estas miosinas.

En el genoma de *P. falciparum* hay varias secuencias putativas de tipo cadena liviana

4.5 Bioinformática III: Búsqueda de cadenas livianas o proteínas similares a CaM en el genoma de *P. falciparum*

Por medio de minería de datos o *data mining* del genoma de *P. falciparum* encontramos secuencias de proteínas de tipo cadena liviana de miosina (similares a calmodulina) usando una búsqueda con un Modelo Oculto de Markov (HMM) que representa la familia de proteínas cadenas livianas de miosina de eucariotes que se encuentra en la base de datos PANTHER (panther.org). La búsqueda se realizó sobre la última versión disponible (a septiembre de 2016) del proteoma de *P. falciparum* que incluye las secuencias de proteínas anotadas y open reading frames (ORF's).

Encontramos varias secuencias entre las que se cuentan: calmodulina (CaM), centrinas, quinasas dependientes de calcio (CDPK), MTIP, una cadena liviana de miosina putativa y otras proteínas putativas similares a calmodulina; todas estas proteínas reúnen la característica de tener uno o más motivos EF-hand. Eliminando las secuencias que ya tienen una función e identidad definida, tenemos la lista que se muestra en la tabla 4-4 con las proteínas candidatas a cadena liviana de miosina que incluyen a MTIP; se muestra el E-value de cada resultado que es el valor umbral de significancia, este valor debe ser menor a 0.01 e indica que la secuencia referenciada no fue encontrada al azar y comparte algún grado de similitud con la o las secuencias con las que fueron retadas.

Tabla 4-4 Resultado de búsqueda de cadenas livianas de miosina sobre el genoma de *P. falciparum* por medio de HMM.

E-value	ID plasmodb	Nombre	No. de aa	Observaciones
8.9 x 10 ⁻²⁵	PF3D7_1246400	myosin A tail domain interacting protein (MTIP)	204	Bergman et al., 2003
1 X 10 ⁻¹⁶	PF3D7_0627200	myosin light chain, putative	139	Similar a MLC4 de <i>T. gondii</i> . Polonais et al., 2011
7.2 X 10 ⁻¹²	PF3D7_0714400	calmodulin, putative	256	Nueva
1.3 x 10 ⁻⁷	PF3D7_1030800	calmodulin, putative	212	Similar a MLC7 de <i>T. gondii</i> . Polonais et al., 2011
8.1 X 10 ⁻⁶	PF3D7_1418300	calmodulin, putative	136	Nueva
2.9 X 10 ⁻⁵	PF3D7_0414200.1	calmodulin-like protein	150	Nueva

La proteína con el mejor score fue MTIP que fue reportada en 2003 por medio de un sistema de doble híbrido usando como carnada la cola de PfMyoA (Bergman et al., 2003); también se encontraron dos secuencias que ya habían sido reportadas en un estudio de Polonais y col. en 2011, que en ese trabajo fueron llamadas proteínas similares a MLC4 y MLC7 (Myosin Light Chain) de *T. gondii*; con nuestra búsqueda también hallamos 3 secuencias nuevas de proteínas con motivos EF-hand. Tomamos todas las secuencias encontradas y las comparamos por medio de un alineamiento múltiple elaborado en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) del cual

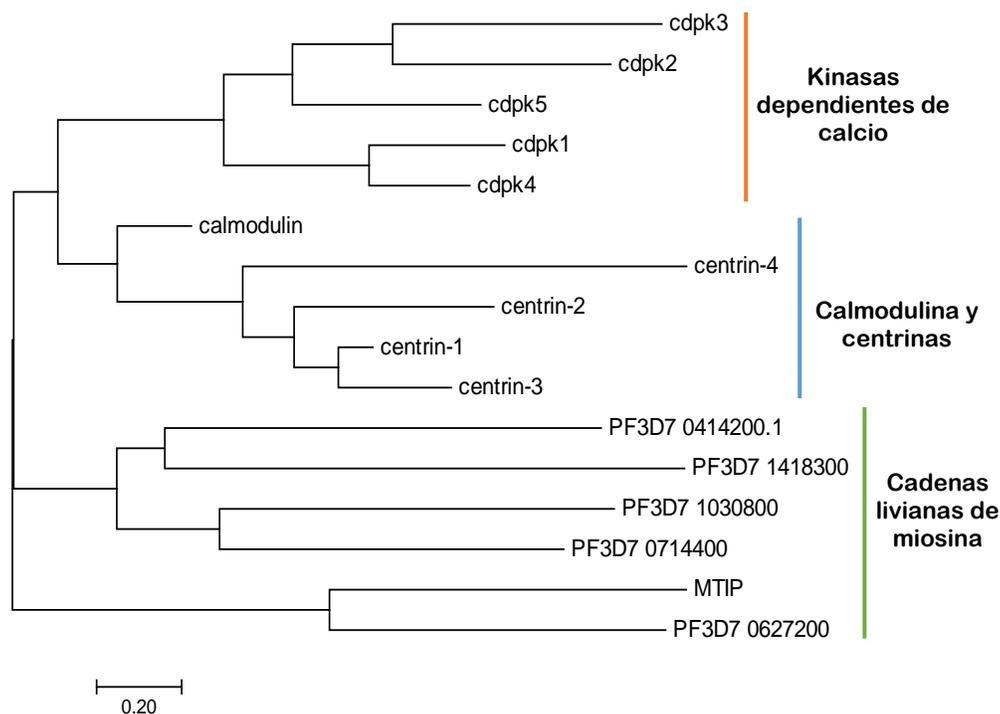


Figura 4-47 Árbol filogenético de las secuencias de proteínas con motivos EF-Hand de *P. falciparum*. Las secuencias fueron alineadas en Clustal omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), y el árbol se generó por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de sustitución JTT en el programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016). La longitud de las ramas del árbol indica el número de sustituciones por sitio.

también obtuvimos un árbol filogenético mostrado en la figura 4-47. Ese árbol muestra claramente tres grupos diferentes de secuencias que agrupan a: las kinasas dependientes de calcio; a la calmodulina y centrinas cuyas ramas son las mas cortas y por tanto tienen una alta conservación de secuencia; y el último grupo integra a MTIP y a las secuencias candidatas a cadenas livianas de miosina putativas. En éste último grupo se destaca que hay una subagrupación por parejas de secuencias, basados en este resultado hicimos alineamientos pareados y buscamos en cada pareja de secuencias los

motivos conservados en la interfase Prosite (prosite.expasy.org) que se ilustran en la figura 4-48. El motivo común en las secuencias es uno o varios EF-hand, estos motivos tienen una topología hélice(E)-loop-hélice(F). Las dos alfa hélices del motivo se posicionan de forma perpendicular una a la otra y la región de loop de aproximadamente 12 aminoácidos une iones calcio (Gifford et al. 2007). MTIP es la cadena liviana de miosina de *P. falciparum* de la cual se conoce su estructura tridimensional y se sabe que sus EF-hands son atípicos en secuencia y que los residuos que unen calcio no se conservan, por lo cual se sugirió que el Ca^{2+} no se necesita para que MTIP pueda unirse a PfMyoA (Green et al., 2006). Con respecto a las secuencias candidatas analizadas se encontraron motivos EF-hand sin sitios de unión canónicos para Ca^{2+} , a excepción de uno encontrado en la secuencia PF3D7_1030800 (marcada con línea verde en figura 4-48): DNNNDKKISPEE. Nuestros resultados indican que hay un repertorio de cadenas livianas de miosina para *P. falciparum* compuesto por seis secuencias de las cuales MTIP ha sido la más estudiada, de las restantes deben hacerse estudios con el fin de establecer a cuáles motores están asociadas. Es intrigante el hecho de que la secuencia de cadena liviana para PfMyoB postulada por Yusuf y col. (2015) denominada MLC-B no presenta ningún motivo EF-Hand cuando sobre ella se intenta examinar con servidores de motivos y dominios conservados. Esta secuencia fue modelada en el mencionado estudio por medio del programa de predicción estructural Phyre 2 y se asumió que su N-terminal se parecía a la estructura de las CaM, sin embargo a nivel de secuencia no hay ningún tipo de similitud, nosotros verificamos este hecho haciendo el respectivo análisis bioinformático pero no encontramos resultados importantes de perfiles o patrones conservados.

Adicionalmente hicimos el modelamiento tridimensional de las secuencias de cadenas livianas putativas por medio del servidor Swissmodel (swissmodel.expasy.org). que se muestran en la figura 4-49. Se observa que cada estructura predicha muestra dos zonas o lóbulos y en el centro con un color diferencial se destacan unos aminoácidos que unen esos dos lóbulos. Estas estructuras son similares a la formada por la secuencia de MTIP, en las que se reconocen un espacio o canal central que es el sitio de unión a otras proteínas.

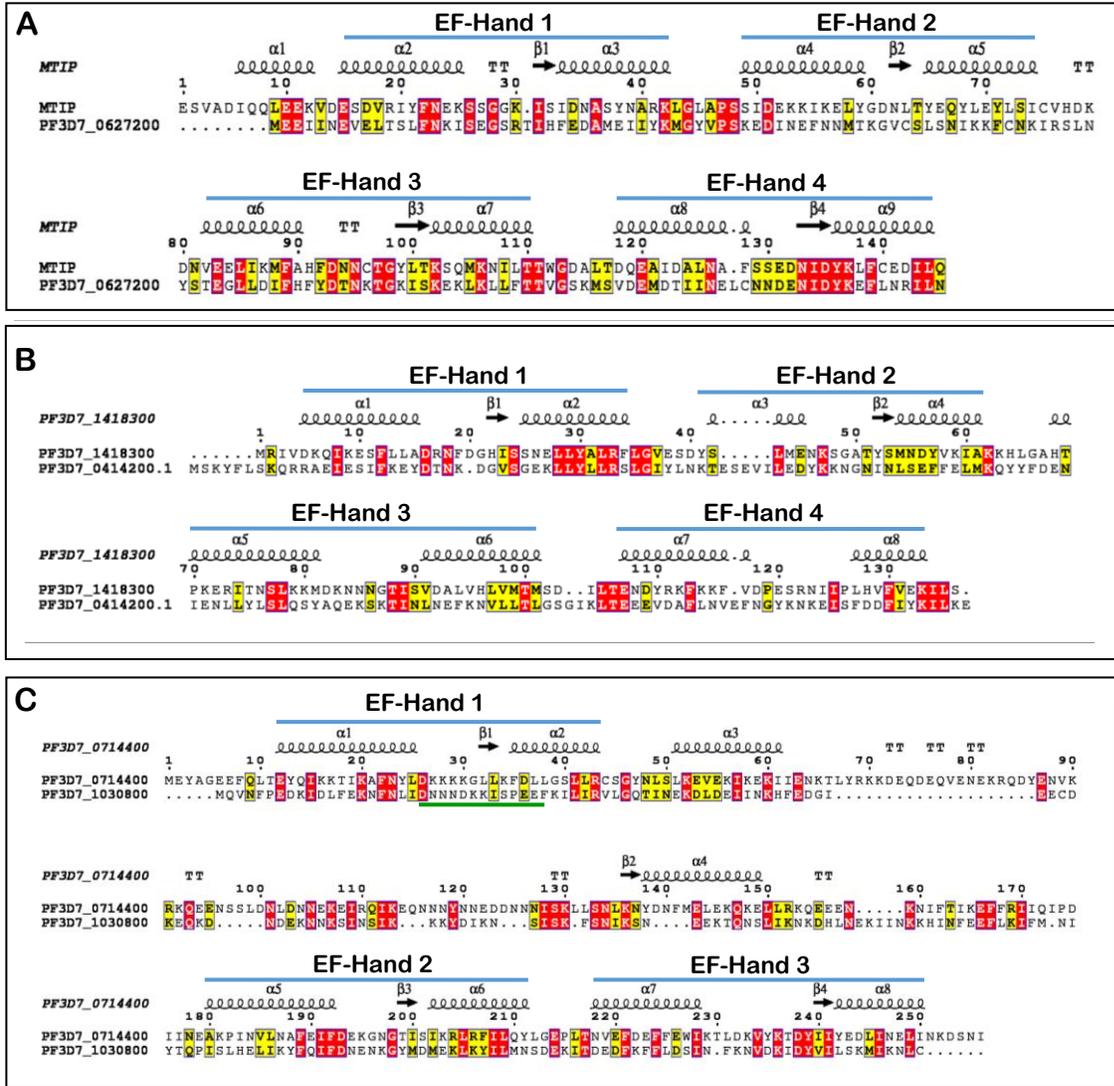


Figura 4-48 Alineamientos pareados de secuencias de cadenas livianas de *P. falciparum*. Cada alineamiento se hizo en Clustal omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/), los elementos de estructura secundaria mostrados en cada alineamiento fueron obtenidos por medio de Esprict 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/>) a partir del modelo de rayos X de PyMyoA-MTIP (Bosch et al., 2007) para **A** y con el modelo tridimensional generado para la proteína correspondiente en Swissmodel (swissmodel.expasy.org) para **B y C**. Los aminoácidos idénticos se marcan en rojo y los similares en amarillo. Los motivos EF-hand de **B y C** fueron obtenidos mediante Prosite (prosite.expasy.org). Línea verde muestra sitio de unión canónico a calcio.

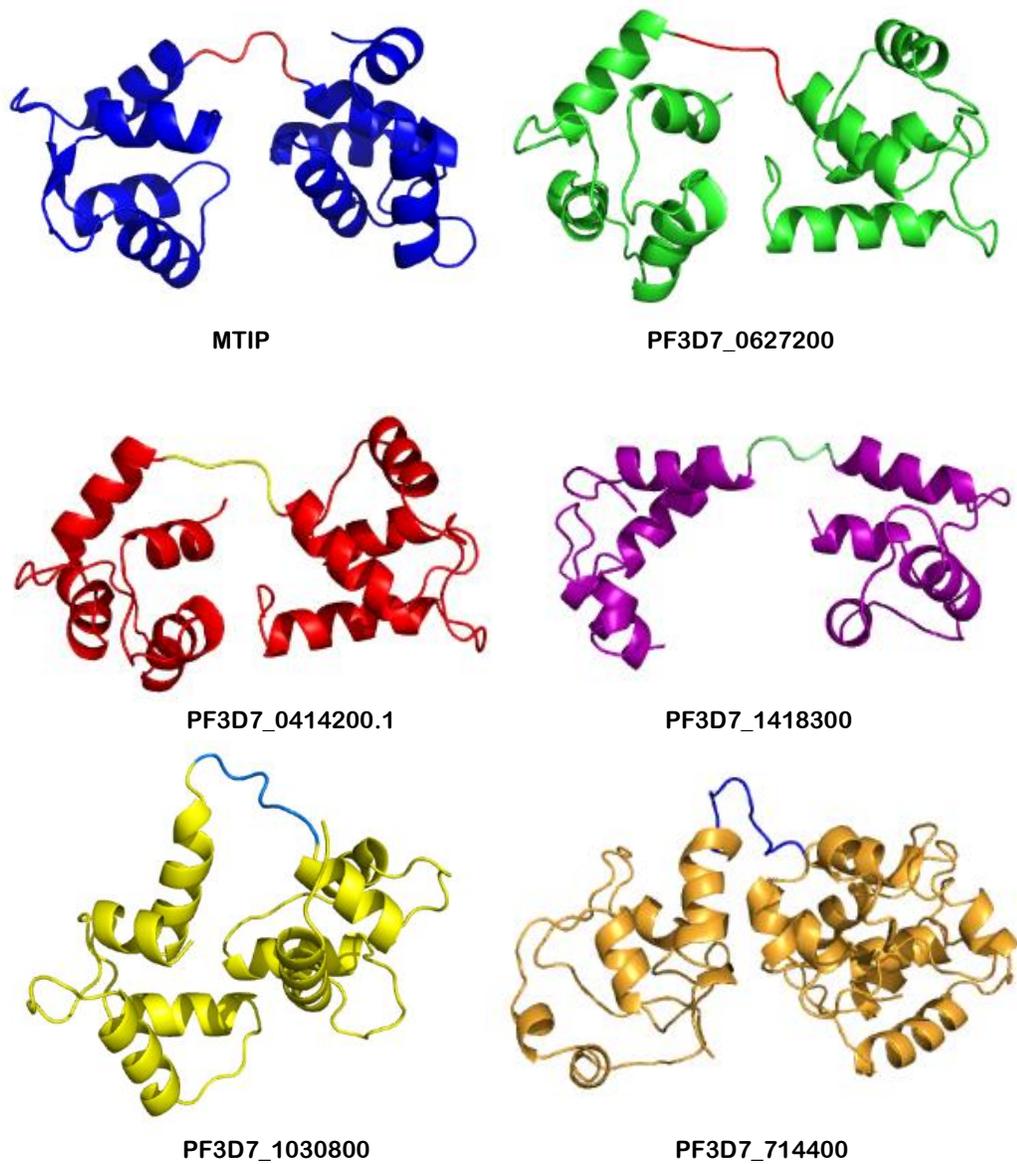


Figura 4-49 Modelos tridimensionales de cadenas livianas de *P. falciparum*.
Obtenidos mediante Swissmodel (swissmodel.expasy.org), imágenes de cintas preparadas en Pymol.

Discusión final

El movimiento por *gliding* es una forma de locomoción dependiente de sustrato. A diferencia de las células que nadan con ayuda de cilios o flagelos o que se desplazan haciendo cambios dramáticos en la forma celular, las células que realizan *gliding* no poseen un organelo motor y muestran una mínima distorsión morfológica. El conocimiento actual que se tiene acerca de la mecánica molecular involucrada en el *gliding* se ha derivado de los estudios en parásitos apicomplexa, phylum que reúne un amplio repertorio de parásitos de vida intracelular obligada que usan ese tipo de movimiento para migrar a la célula huésped e invadirla para proliferar dentro de un ambiente seguro. El *gliding* depende del ensamblaje de moléculas que conectan proteínas motores citoplasmáticas a la membrana celular y de ahí al sustrato apropiado. Dada la importancia de la movilidad de estos parásitos en el progreso de la enfermedad que generan, el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados puede llevar al desarrollo de estrategias efectivas de prevención de la enfermedad (Heintzelman 2006 y 2015).

Toxoplasma gondii es el parásito *apicomplexa* modelo sobre el cual se han adelantado muchos estudios a nivel genético y de bioquímica básica que han ayudado a entender algunos eventos en los cuales las miosinas son protagonistas para también extrapolar y comparar esos hallazgos en otros parásitos del mismo *phylum*, incluyendo *P. falciparum*. A partir de esto nos permitimos hacer una compilación de hechos reportados para las miosinas de *T. gondii* y basados en ellos discutimos algunos resultados obtenidos en nuestro trabajo:

En 2002 se identificó a TgMyoA, el ortólogo de PfMyoA, como la miosina responsable del *gliding* de *T. gondii* (Meissner et al., 2002). Sin embargo, en 2013 se obtuvo una línea de parásitos knockout para TgMyoA que pudo ser mantenida en cultivo indefinidamente (Andenmatten et al., 2013). Este resultado sugirió que otras miosinas podían participar en el *gliding* o que podían existir otros mecanismos de invasión. En 2014 se identificó un segundo glideosoma gobernado por TgMyoC (Frénal et al., 2014), otra miosina de *T. gondii* que al igual que TgMyoA, es pequeña (1171 residuos) y pertenece a la clase XIV. La posible redundancia funcional de estos dos sistemas podría explicar porqué aunque

el *knockout* de TgMyoA no compromete la viabilidad (Andenmatten et al., 2013) y el *knockout* de TgMyoB/C no tiene efecto detectable sobre el desarrollo del parásito, el *knockout* simultáneo de TgMyoA/B/C sí es letal para *T. gondii* (Egarter et al., 2014). Adicionalmente en 2016 fue publicado un trabajo en el que se demostró que otra miosina, la TgMyoH se ubica únicamente en el polo apical o conoide de taquizoítos, puede asociarse con varias cadenas livianas incluida la MLC1, MLC5 y MLC7 y parece tener un papel indispensable en el primer paso del proceso de gliding de *Toxoplasma*, con esto, se cree que este parásito cuenta con varios motores de actina que usan diferentes miosinas que se ubican subcelularmente en zonas específicas de los zoítos (Graindorge et al., 2016).

En el caso de *P. falciparum*, las proteínas PfMyoA y PfMyoB son las miosinas más pequeñas, su identidad es del 35%, no tienen dominio de cola, ambas son miosinas de la clase XIV y se expresan en esquizontes tardíos y merozoitos (Chaparro et al., 2003). Se ha establecido que PfMyoA es la miosina del glideosoma y nada se sabe sobre la función de PfMyoB. Sin embargo, las similitudes entre estas dos miosinas nos han llevado a preguntarnos si eventualmente podrían tener función similar o podría haber redundancia funcional entre ellas y según los resultados mostrados consideramos que puede ser posible. Estas funciones redundantes, sobrelapadas o aditivas entre miosinas ya han sido descritas para organismos tan diversos como *Arabidopsis*, *Dictyostelium*, *Drosophila*, ratón y como se describió anteriormente, para *T. gondii*. El caso de la TgMyoH llama la atención ya que su localización tan discreta en el parásito es muy similar a la que encontramos con PfMyoB en merozoítos, entonces, es posible que en *Plasmodium* pueda darse un fenómeno similar en el que la PfMyoB sea la miosina del motor de la zona apical y que PfMyoA participe en el motor de la periferia de los merozoítos; que esas miosinas usen a MTIP como una de sus cadenas livianas y que ambos sean importantes para la invasión. Es claro que el hecho de no haber encontrado cuales son las proteínas que se asocian con PfMyoB dependió de los recursos técnicos existentes; sin embargo, pudimos generar herramientas que nos permitieron postular y demostrar interacciones entre PfMyoB y MTIP que no son excluyentes con el conocimiento actual que se tiene acerca de esta miosina y proponer estos hallazgos aún en el panorama de una hipótesis que merece ser profundizada.

Obviamente, para retar la idea de la redundancia o similaridad funcional entre PfMyoA y PfMyoB se necesitan estudios de tipo *knockout* o *knockdown* con los cuales se puedan

comprobar estas hipótesis, sin embargo, las implicaciones técnicas de trabajar con *Plasmodium* a este nivel no son alentadoras. En *Plasmodium* generar interrupciones en genes a través de experimentos de genética reversa clásica es un proceso complejo e ineficiente, debido a la extremadamente baja eficiencia de transfección de los parásitos y a la habilidad de mantener los plásmidos transfectados como episomas, lo que ha provocado que menos del 1% de los genes pueda ser inactivado mediante *knockout* (de Koning-Ward et al., 2015).

5. Conclusiones

Por medio de ensayos de simulación y predicción por computador pudimos establecer que PfMyoB tiene una conformación de estructura primaria, secundaria y terciaria muy similar a PfMyoA.

Se produjeron cuatro proteínas recombinantes de PfMyoB, en el sistema de expresión pMAL; este sistema demostró ser muy eficiente ya que las proteínas obtenidas fueron solubles y la cantidad de proteína purificada resultó ser suficiente para todos los ensayos realizados.

El anticuerpo AbP2 producido contra un péptido sintético reconoció específicamente a PfMyoB en extractos de proteínas de esquizontes y con él se pudo localizar la proteína a nivel subcelular en el extremo apical de los merozoítos de *P. falciparum*. Este anticuerpo se convierte en una herramienta valiosa para hacer ensayos bioquímicos e inmunocitoquímicos que tengan que ver con PfMyoB.

Los anticuerpos anti-PfMyoB desarrollados en este trabajo no fueron eficientes en los ensayos de inmunoprecipitación con extractos de parásitos, por tanto, no fue posible hacer una identificación de las proteínas de unión a PfMyoB.

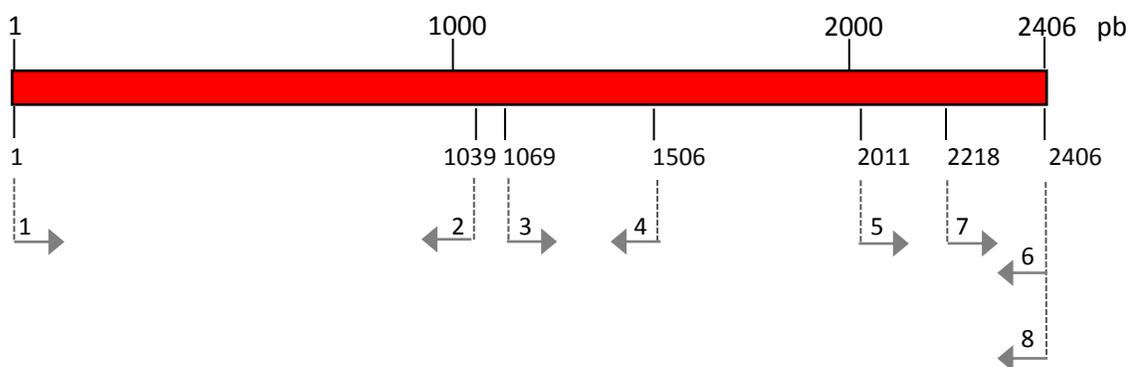
Planteamos la posibilidad de que debido a la alta similaridad entre PfMyoB y PfMyoA, se pueda llevar a cabo un fenómeno de redundancia funcional de las dos proteínas, por tanto, por medio de diferentes acercamientos experimentales *in vitro* pudimos demostrar que PfMyoB puede unirse a MTIP, éste último *partner* natural de PfMyoA.

PfMyoB y MTIP pueden unirse mediante secuencias parecidas a motivos IQ en PfMyoB, adoptando una conformación estructural similar a la que está reportada para la unión de PfMyoA y MTIP.

En el proteoma de *P. falciparum* encontramos varias secuencias que pueden ser candidatas o putativas de cadenas livianas de miosina, ya que tienen motivos EF-hand conservados y filogenéticamente están relacionadas entre sí.

A. Anexo: Secuencia de *primers*

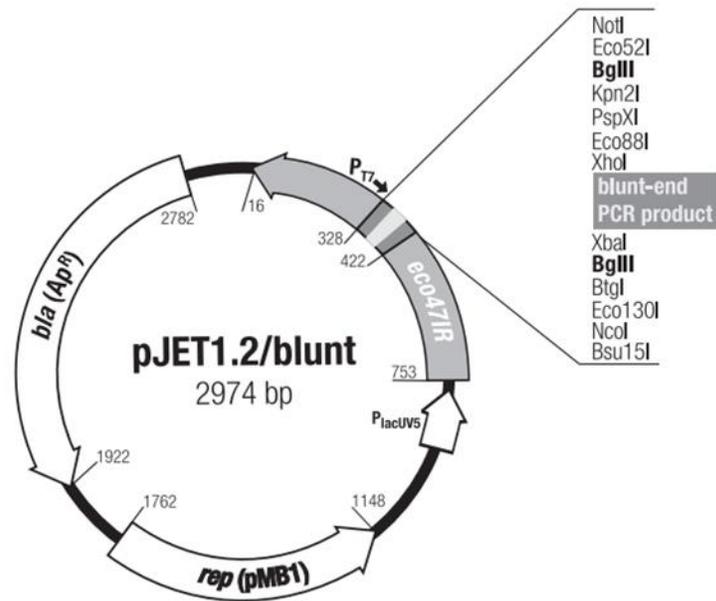
Esquema del ARNm de PfMyoB y localización de los *primers* para la obtención de fragmentos:



No.	<i>Primer</i>	Secuencia	Sitio de Restricción	Temperatura de fusión (°C)
1	MyoB1F	5'-GCGGCCGCATGGTGAATAAAATCAACGA-3'	NotI	63
2	MyoB1R	5'-GGATCCCAAAGTAACAACCCTGACA-3'	BamHI	59
3	MyoB38F	5'-CATATGGGTGGTAAATCTAATTGTAG-3'	NdeI	51.5
4	MyoB38R	5'-tcacaGGATCCTATGATTCAATTAGAGGTCCCTCC-3'	BamHI	61
5	MyoB3F	5'-GCGGCCGCTCTTTATCTATTGTTGAAAC-3'	NdeI	60
6	MyoB3R	5'-GGATCCTTATTCGTGTTCCCTTAATAT-3'	BamHI	53
7	MyoBColaF	5'-CATATGAAGGAAGCGGTTCCATAAAAT-3'	NdeI	54
8	MyoBColaR	5'-ggcgcCCTGCAGGTTATTCGTGTTCCCTTAATAT-3'	SbfI	64
9	MyoAMBPF	5'-CATATGTTTTTGAACAAGAAGGTGC-3'	NdeI	54
10	MyoAMBPR	5'-CCTGCAGGTTTATTGAGCTACCATTTTTT-3'	SbfI	58
11	MyoAHisR	5'-GGATCCTTATTGAGCTACCATTTTTT-3'	BamHI	53
12	MTIPF	5'-GGATCCATGAAACAAGAATGCAATGTA-3'	BamHI	56
13	MTIPR	5'-GCGGCCGCTTATTGTAATATATCTTCACAGA-3'	NotI	60
<i>Primers de los vectores para PCR de rastreo de colonias y secuenciación de fragmentos</i>				
14	pJET1.2F	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'		61
15	pJET1.2R	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'		56
16	malE <i>primer</i>	5'-GGTCGTCAGACTGTGCATGAAGCC-3'		61
17	pMAL R	5'-TGTCTACTCAGGAGAGCGTTTAC-3'		60
18	pGEX5'	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'		66
19	pGEX3'	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCTAGAGG-3'		64

B. Anexo: Mapas de vectores

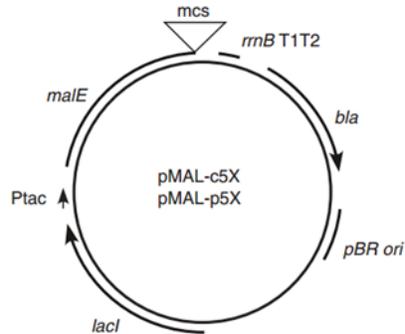
Vector de clonación pJET1.2 (Thermo)



Vectores de expresión:

- **pMAL (New England Biolabs):**

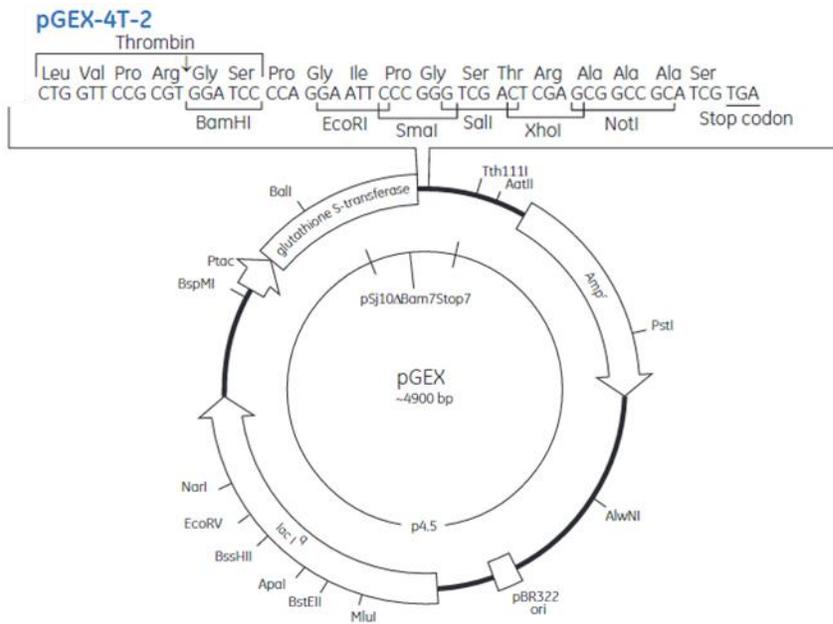
mcs: sitio de clonación múltiple; malE: gen que codifica para la proteína de unión a maltosa MBP; bla: gen de resistencia a ampicilina.



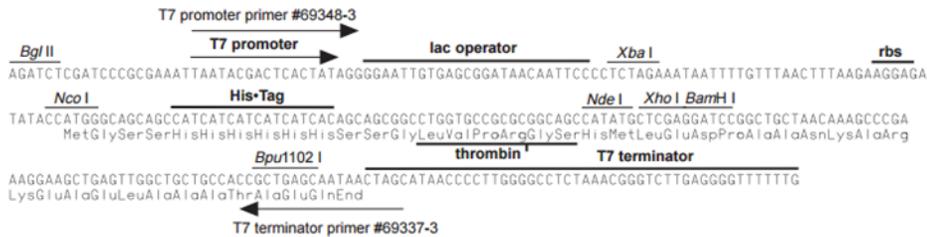
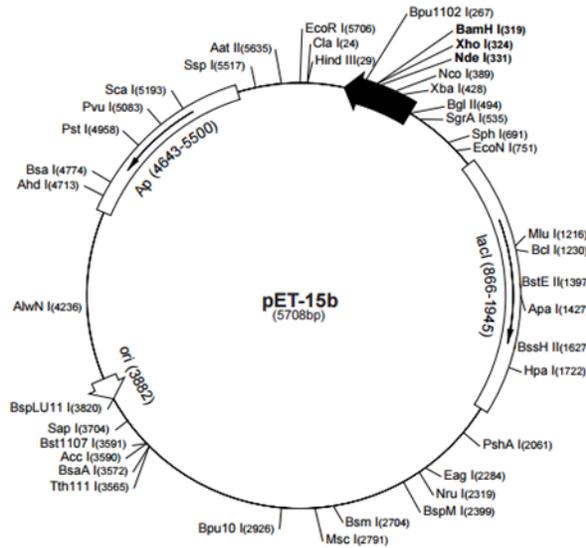
pMAL-c5X, -p5X MCS



- **Vector pGEX4T2 (GE Healthcare):** Amp: gen de resistencia a ampicilina



- **Vector pET15b (Novagen):**



Sitio de clonación múltiple

C. Anexo: Reporte de diseño de péptidos para obtención de anticuerpos policlonales de PfMyoB

Los antígenos escogidos están marcados en rojo en la secuencia y están encerrados en un cuadro rojo en la tabla.



Your Innovative Partner in Drug Discovery!

Antigen Design Result
(confidential)

860 Centennial Ave. Piscataway, NJ 08854, USA
Toll-Free: 1-877-436-7274
Telephone: 1-732-885-9188
Fax: 1-732-210-0262, 1-732-885-5878

Sequence :

MV NKINELN NYFR I **NSTFINKSENESEN** FYVW TYKSPNVDLYPDLVFFKCQVLNI **NGDNYEVKEISPET** NSVYTVKKEH
LFNCNMVNINSHRLNDMVHQNSAEVLNTLALRYEKNYIYTIAEPLISVNPYQV **IDTDMNEYKNKSTD** LLPPHVYTYA
KDAMLDFINT **KNSQSIISGESGS** GKTEASKLVIKFYLS **SGVREDNDISKTLW** DSNFILEAFGN **AKTVKNNSSRYGKY**
IKI **QLDENQIVSSSIEIFLLEKIRVVSQEPDERC** YHIFYEILKGMNDEM **KKKYKIKS** EEDYK **YISNKSINPEIDDAK**
DFENLMISFDKMKMSDLKDDLFLTL SGLLLLGNIQFNG **IEKGGKSNCELDD** ENLEV VNEASELLGIDYESLKN **SLVITE**
KSIANQKIEIP LSIEESLSICRSISKDIYNKIFEYI **TKRINNFLNNKEL** ENFIGILDIFGFEIFVKNSLEQLLINIANE
EIHNIYLFVV **YEKESNLYKKEGII** IESVKY **TNNESIIDLRLGKT** SIISILEDNCLAPGKK **DESIVSVYTNRF** SKNEHY
SVCKKNI TESFVIKHTVSDVTYSISNF **ISKNKDILSPNILK** LLKVSNNKLIQNL **YDDAEVTD** SLGRKNLITYKYLENLK
KICSYLKSTNIYFIK **CIKPNETKEKNNFNP** KKVYPQLFSL SIVETLN IKYFFQYKTFASFLSYQYLDI **AVSNDSSLD**
EKTKV TML **LERNFDKDSYKVGH** TMVFLKKEAVHKIRDI INSNLKC YRNLCCITSALIMKIKKKRIVEENIKNLQLAQA
YFRKYKIKEHE

Antigen Designed:

Warn:peptide--> YEKESNLYKKEGII :486 has no net charge, which may lead to dissolubility issues!

Warn:peptide--> ITEKSIANQKIEIP :393 has no net charge, which may lead to dissolubility issues!

No	Start	Antigenic Determinant	Length	Antigenicity/Surface/Hydrophilicity	Coil	Amphipathic	Synthesis	Mus_musculus Oryctolagus_cuniculus blast
3	526	CE ^D N ^C LAPGKKDESI	14	2.41/0.79/0.68	Y	Y	N	49% 50%
4	281	CGMN ^D EM ^K KKYKIKS	14	2.34/0.79/1.25	Y	Y	N	42% 42%
6	486	CY ^E KE ^S NLYKKEGII	14	2.08/0.71/0.58	Y	Y	N	56% 42%
8	720	CL ^E RNF ^D DK ^S YK ^V GH	14	2.00/0.57/0.56	Y	Y	N	49% 50%
9	56	NG ^D NY ^E V ^K EISP ^E TC	14	1.98/0.86/0.53	Y	Y	N	56% 56%
10	608	CY ^D DA ^E VTD ^S SLGRKN	14	1.88/0.64/0.59	Y	Y	N	49% 56%
11	547	C ^F SK ^N EHYSV ^C KKNI	14	1.88/0.71/0.45	Y	N	N	42% 42%
17	258	E ^K IR ^V VSQ ^E PDERC	14	1.46/0.71/0.71	Y	Y	N	70% 70%
18	197	SGV ^R EDND ^I SK ^T LWC	14	1.40/0.57/0.62	Y	Y	N	42% 56%
19	393	C ^I TE ^K SIANQ ^K IEIP	14	1.07/0.71/0.22	Y	N	N	71% 71%
20	239	IQL ^D ENQ ^N IVSS ^S IC	14	1.06/0.64/0.11	Y	Y	N	56% 56%
21	581	C ^I SK ^N KD ^I LSPN ^I LK	14	1.03/0.64/0.14	Y	Y	N	49% 56%
22	787	CAQ ^A YFR ^K YK ^Y IK ^E H	14	0.88/0.57/0.18	Y	Y	N	50% 57%
23	432	CT ^K R ^I NNFL ^N NNK ^E L	14	0.82/0.64/0.22	Y	Y	N	50% 50%

Note:

1. An extra "C" (high-lighted as green) is added to the C-terminus (or N-terminus) to facilitate conjugation.

2.

Positive charged residues (K,R,H) are in blue.

Negative charged residues (D,E) are in red.

3.

* Synthesis: "N" means this peptide is easy to synthesize. "Y" means it has difficulty to synthesize.

** For a basic peptide, initially try to dissolve the peptide in water; if the peptide does not dissolve, try 10% and higher solutions of acetic acid; if the peptide still does not dissolve, add TFA(<50ul) to solubilize the peptide and dilute to 1ml with deionized water.

*** For an acidic peptide, initially try to dissolve the peptide in water, if the peptide does not dissolve, add NH₄OH(<50ul) to solubilize the peptide and dilute to 1ml with deionized water.

Guideline on how to select suitable peptide antigen for antibody development:

The listed epitopes are predicted by GenScript OptimumAntigen™ design tool, Comprehensive analysis were performed on multiple aspects, including Antigenicity, Hydrophilicity, Hydrophobicity, Surface probability, Transmembrane, Homology, Flexible region, Helix region, Sheet region, Signal peptide and Modification.

The following instructions are based on experimental result from over 10,000 antibodies developed by GenScript. It assists on selection of best peptide for antibody development.

- Generally, the peptide close to C terminus or N terminus may generate antibodies with better performance in Western Blot and Immunoprecipitation (IP).
- Avoid glycosylation sites, transmembrane regions and signal peptide.
- The amino acid cysteine (C), which locates at the end of the peptide, is usually used for carrier protein conjugation. Avoid cysteine located within the middle of the peptide.
- For phosphospecific antibody projects, it is suggested to design the conjugation site away from the phosphosite (a distance of 2/3 peptide

length), and expose the end with higher antigenicity.

- e) Avoid peptides with more than 30% of aspartic acid (D) and glutamic acid (E).
- f) In the case of creating antibodies that recognizes two proteins simultaneously, the designed peptide from one protein should possess over 90% homology with the counterpart peptide in the other protein; on the other hand, the homology should be less than 70% to allow the antibodies to distinguish the two proteins. The best solutions vary case by case, please specify when specificity is required.
- g) Higher foreignness to host animals will contribute to higher antibody affinity. Choose peptide with low homology to the host.
- h) High complexity is helpful for high affinity and specificity antibody generation, so simple repeat sequence should be avoided.
- i) Neutral charged peptide may be hydrophobic, which hampers AbAg binding. If this sequence is too important to be excluded, it is suggested to add charged amino acid (lysine, K; arginine, R) to increase solubility.
- j) When multiple candidate peptides meet most of the criteria mentioned above, consider the parameters of Antigenicity, Surface, Hydrophilicity to make a decision.
- k) Peptides that are difficult to synthesize are likely to extend the project schedule, or in some cases, lead to failure of peptide synthesis. Choose peptides that are easier to synthesize.
- l) Basically, the designed peptide should be 14 amino acids. The length may vary from 6 to 40 AAs according to customer's requirement. However, longer peptides are usually difficult to synthesis and short sequence is usually accompanied by low immunogenicity.

▪ MyoB2

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
secuenciacion mRNA GGTGTAATCTAATTGTAGTGAACTTGATGATGAGAACTTAGAGGTGGTAAATGAGGCTAGTGAATATTAGGTATAGATTATGAGAGTTAAGAAATAGTTAGTTATTACTGAAAGAGTATAGCTA
Consensus          GGTGTAATCTAATTGTAGTGAACTTGATGATGAGAACTTAGAGGTGGTAAATGAGGCTAGTGAATATTAGGTATAGATTATGAGAGTTAAGAAATAGTTAGTTATTACTGAAAGAGTATAGCTA

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
secuenciacion mRNA ATCAGAAATCGAATTCCTTTGAGTATAGAGAGCTTTATCATATGTAGATCGATATCTAGGATATATATATAGATATTGAGTACATTACGAAAGAAATAAATATTTTTAAATATATATA
Consensus          ATCAGAAATCGAATTCCTTTGAGTATAGAGAGCTTTATCATATGTAGATCGATATCTAGGATATATATATAGATATTGAGTACATTACGAAAGAAATAAATATTTTTAAATATATATA

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
secuenciacion mRNA AGAATTAGAGAAATTCATAGGATTTTGGATATTTTGGATTTGAGATTTTGTGANGAATCATTAGAGCAGTTCGATATTATATAGCGAATGAGAGATACATATATATATTTTGTGTATAT
Consensus          AGAATTAGAGAAATTCATAGGATTTTGGATATTTTGGATTTGAGATTTTGTGANGAATCATTAGAGCAGTTCGATATTATATAGCGAATGAGAGATACATATATATATTTTGTGTATAT

391    400    410    420    430    440    450    460    465
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
secuenciacion mRNA GAAAAGGAGCGAATTTATATAAAGGAGGAAATATATATGATCGAATCGGATTCCTTCGAGGTAAT TAA
Consensus          GAAAAGGAGCGAATTTATATAAAGGAGGAAATATATATGATCGAATCGGATTCCTTCGAGGTAAT TAA
    
```

▪ MyoB3

Se encontraron dos cambios que no afectan la secuencia de la proteína porque los codones no cambiaron el aminoácido respectivo. Se hizo la traducción de la secuencia obtenida y es idéntica a la secuencia de la proteína.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
secuenciacion mRNA TCCTTATCTATGTTGAAGCGTTAATATAAATATTTTTTCAGTATAAATATACGTTTGCCTCTTCTTAGCAATTATATCATATTTGGATATTGCTGTTTCAAAATGATTCAGTTTGGATGAAAAA
Consensus          TCCTTATCTATGTTGAAGCGTTAATATAAATATTTTTTCAGTATAAATATACGTTTGCCTCTTCTTAGCAATTATATCATATTTGGATATTGCTGTTTCAAAATGATTCAGTTTGGATGAAAAA

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
secuenciacion mRNA CTAAAGTACCATGTTGTTGAAAGGAACTTTGACAGGATTCATATAGGTTGACATACCATGGATTTTAAAAGGAGCGGTTTCAAAATTCGGATATCATAAATCCCACTTGAATGTTA
Consensus          CTAAAGTACCATGTTGTTGAAAGGAACTTTGACAGGATTCATATAGGTTGACATACCATGGATTTTAAAAGGAGCGGTTTCAAAATTCGGATATCATAAATCCCACTTGAATGTTA

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
secuenciacion mRNA TAGAAATTTATGTTGTATACCTAGTGCACCTCATCATGAAATTAAGAAAAGAGAAATAGTAGAGAAACATAAAAATTTGCACCTAGCTCAGCATATTTAGGAAATATAATATATAGGAAAC
Consensus          TAGAAATTTATGTTGTATACCTAGTGCACCTCATCATGAAATTAAGAAAAGAGAAATAGTAGAGAAACATAAAAATTTGCACCTAGCTCAGCATATTTAGGAAATATAATATATAGGAAAC

391    400    410    415
|-----|-----|-----|-----|
secuenciacion mRNA GATAGGATCCGAATTCCTTCGAG TAA
Consensus          GATAGGATCCGAATTCCTTCGAG TAA
    
```


Bibliografía

- Andenmatten N, Egarter S, Jackson AJ, Jullien N, Herman JP, Meissner M. Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. *Nat Methods*. 2013. 10(2):125-7.
- Andrusier, N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: Fast Interaction Refinement in Molecular Docking. *Proteins*. 2007. 69(1):139-159.
- Antony HA, Parija SC. Antimalarial drug resistance: An overview. *Trop Parasitol*. 2016. 6(1):30-41.
- Bannister LH, Kent AP. Immunoelectron microscopic localization of antigens in malaria parasites. *Methods Mol Biol*. 1993. 21:415-29.
- Baum J, Gilberger TW, Frischknecht F, Meissner M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends Parasitol*. 2008. 24(12):557-63.
- Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJ, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiol Rev*. 2016. 40(3):343-72.
- Bergeron B. Bioinformatics computing. 2003. New Jersey, Prentice Hall Editorial. 439 p.
- Bergman LW, Kaiser K, Fujioka H, Coppens I, Daly TM, Fox S, et al. Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. *J Cell Sci*. 2003. 116:39-49.
- Bosch J, Turley S, Daly TM, Bogh SM, Villasmil ML, Roach C, et al. Structure of the MTIP-MyoA complex, a key component of the malaria parasite invasion motor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. 103:4852-7.
- Bosch J, Turley S, Roach CM, Daly TM, Bergman LW, Hol WG. The closed MTIP-myosin A-tail complex from the malaria parasite invasion machinery. *J Mol Biol*. 2007. 372:77-88.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976. 72:248-54.

- Brown EP, Normandin E, Osei-Owusu NY, Mahan AE, Chan YN, et al. Microscale purification of antigen-specific antibodies. *J Immunol Methods*. 2015. 425:27-36.
- Buscaglia AC, Coppens I, Hol W, Nussenzweig V. Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in *Plasmodium*. *Mol Biol Cell*. 2003. 14:4447-57.
- CDC. Centers for Disease Control and prevention. Consultado noviembre 2016. <https://www.cdc.gov/parasites/index.html>.
- Chaparro-Olaya J, Dluzewski AR, Margos G, Wasserman MM, Mitchell GH, et al. The multiple myosins of malaria: The smallest malaria myosin, *Plasmodium falciparum* myosin-B (Pfmyo-B) is expressed in mature schizonts and merozoites. *Europ J Protistol*. 2003. 39:423-427.
- Chaparro-Olaya J, Margos G, Coles DJ, Dluzewski AR, Mitchell GH, et al. *Plasmodium falciparum* myosins: transcription and translation during asexual parasite development. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005. 60(4):200-13.
- Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci*. 1993. 2(9):1511-9.
- Coluccio, L. Myosin I. In *Myosins A superfamily of molecular motors*. 2008. The Netherlands, Springer Editorial, 467 p.
- Cowman AF, Crabb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell*. 2006. 124:755–766.
- Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol*. 2012. 198(6):961-71.
- Cramer LP. Myosin VI: roles for a minus end-directed actin motor in cells. *J Cell Biol*. 2000. 150(6):F121-6.
- Crawley SW, Liburd J, Shaw K, Jung Y, Smith SP, Côté GP. Identification of calmodulin and MlcC as light chains for Dictyostelium myosin-I isozymes. *Biochemistry*. 2011. 50(30): 6579-6588.
- De Koning-Ward TF, Gilson PR, Crabb BS. Advances in molecular genetic systems in malaria. *Nat Rev Microbiol*. 2015. 13(6):373-87.
- Douse CH, Green JL, Salgado PS, Simpson PJ, Thomas JC, Langsley G, et al. Regulation of the *Plasmodium* motor complex: phosphorylation of myosin A tail-interacting protein (MTIP) loosens its grip on MyoA. *J Biol Chem*. 2012. 287(44):36968-77.

Douse CH, Vrielink N, Wenlin Z, Cota E, Tate EW. Targeting a dynamic protein-protein interaction: fragment screening against the malaria myosin A motor complex. *ChemMedChem*. 2015. 10(1):134-43.

Dobrowolski J, Sibley LD. The role of the cytoskeleton in host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Behring Inst Mitt*. 1997. 99:90-6.

Dobrowolski JM, Carruthers VB, Sibley LD. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol*. 1997. 26(1):163-73.

Egarter S, Andenmatten N, Jackson AJ, Whitelaw JA, Pall G, et al. The *Toxoplasma* Acto-MyoA motor complex is important but not essential for gliding motility and host cell invasion. *PLoS one*. 2014. 9(3): e91819.

Einarson MB, Pugacheva EN, Orlinick JR. GST Pull-down. *CSH Protoc*. 2007. 2007:pdb.prot4757.

Farrow RE, Green J, Katsimitsoulia Z, Taylor WR, Holder AA, Molloy JE. The mechanism of erythrocyte invasion by the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Semin Cell Dev Biol*. 2011. 22(9):953-60.

Forero C, Wasserman M. Isolation and identification of actin-binding proteins in *Plasmodium falciparum* by affinity chromatography. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000. 95(3):329-37.

Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. 103(10):3681-6.

Fox JD, Kapust RB, Waugh DS. 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 Sci*. 2001. 10(3):622-30.

Frénal K, Marq JB, Jacot D, Polonais V, Soldati-Favre D. Plasticity between MyoC- and MyoA-glideosomes: an example of functional compensation in *Toxoplasma gondii* invasion. *PLoS Pathog*. 2014.10(10):e1004504.

Gan HH, Perlow RA, Roy S, Ko J, Wu M et al. Analysis of protein sequence/structure similarity relationships. *Biophys J*. 2002. 83(5): 2781-2791.

Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J*. 2007. 405(2):199-221.

Goh LL, Loke P, Singh M, Sim TS. Soluble expression of a functionally active *Plasmodium falciparum* falcipain-2 fused to maltose-binding protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2003. 32(2):194-201.

- Graindorge A, Frénel K, Jacot D, Salamun J, Marq JB, Soldati-Favre D. The conoid associated motor MyoH is indispensable for *Toxoplasma gondii* entry and exit from host cells. *PLoS Pathog.* 2016. 12(1): e1005388..
- Green JL, Martin SR, Fielden J, Ksagoni A, Grainger M, et al. The MTIP-Myosin A complex in blood stage malaria parasites. *J Mol Biol.* 2006. 355:933-941.
- Gurr E. Role of eosin in Romanowsky staining of malaria nucleus. *Nature.* 1964. 202:1022-3.
- Hall RA. Studying protein-protein interactions via blot overlay or Far Western blot. *Methods Mol Biol.* 2004. 261:167-74.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999. 41:95-98.
- Hammer JA, Sellers JR. Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011. 13(1):13-26.
- Harlow E, Lane D. Immunoprecipitation: purifying the immune complexes. *CSH Protoc.* 2006. 1:2006(4).
- Hartman MA, Finan D, Sivaramakrishnan S, Spudich JA. Principles of unconventional Myosin function and targeting. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011. 27:133-55.
- Heintzelman MB. Cellular and molecular mechanics of gliding locomotion in eukaryotes. *Int Rev Cytol.* 2006. 251:79-129.
- Heintzelman MB. Gliding motility in apicomplexan parasites. *Semin Cell Dev Biol.* 2015. 46:135-42.
- Heissler SM, Sellers JR. Myosin light chains: Teaching old dogs new tricks. *Bioarchitecture.* 2014. 4(6):169-88.
- Hettmann C1, Herm A, Geiter A, Frank B, Schwarz E, Soldati T, Soldati D. A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. *Mol Biol Cell.* 2000. 11:1385–1400.
- Hillisch A, Pineda LF, Hilgenfeld R. Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discov Today.* 2004. 9(15):659-69.
- Holmes KC. Myosin Structure. In *Myosins A superfamily of molecular motors.* 2008. The Netherlands, Springer Editorial, 467 p.
- Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol.* 1999. 292:195-202.

- Jones ML, Kitson EL, Rayner JC. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: a conserved myosin associated complex. *Mol Biochem Parasitol*. 2006. 147(1):74-84.
- Keeley A, Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol*. 2004. 14:528–532.
- Khor BY, Tye GJ, Lim TS, Choong YS. General overview on structure prediction of twilight-zone proteins. *Theor Biol Med Model*. 2015. 12:15.
- Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci*. 2013. 73:Unit 9.9.
- Kneussel M, Wagner W. Myosin motors at neuronal synapses: drivers of membrane transport and actin dynamics. *Nature Rev Neuroscience*. 2013. 14:233-247.
- Koch M, Baum J. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. *Cell Microbiol*. 2016.18(3):319-29.
- Kortagere S, Welsh WJ, Morrissey JM, Daly T, Ejigiri I, et al. Structure-based design of novel small-molecule inhibitors of *Plasmodium falciparum*. *J Chem Inf Model*. 2010. 50(5):840-9.
- Krieger E, Vriend G. YASARA View — molecular graphics for all devices — from smartphones to workstations. *Bioinformatics*. 2014. 30(20):2981-2.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016. 33:1870-1874.
- LaCount D, Vignali M, Chettier R, Phansalkar A, Bell R, et al. A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2005. 438:103-108.
- Lamarque M, Besteiro S, Papoin J, Roques M, Vulliez-Le Normand B et al. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog* 2011. 7:e1001276.
- Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage in culture. *J Parasitol*. 1979. 65: 418–420.
- Langhi DM Jr, Bordin JO. Duffy blood group and malaria. *Hematology*. 2006. 11(5):389-98.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK — a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J App Cryst*. 1993. 26:283-291.
- Lebediker M, Danieli T. Purification of proteins fused to maltose-binding protein. *Methods Mol Biol*. 2011. 681:281-93.

- Lee D, Redfern O, Orengo C. Predicting protein function from sequence and structure. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007. 8(12):995-1005.
- Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, Grainger M, Moch JK, et al. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science.* 2003. 301:1503-1508
- Luo J, Vallen EA, Dravis C, Tcheperegine SE, Drees B, et al. Identification and functional analysis of the essential and regulatory light chains of the only type II myosin Myo1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 2004.165(6): 843-855.
- Mehlin C, Boni E, Buckner FS, Engel L, Feist T, et al. Heterologous expression of proteins from *Plasmodium falciparum*: results from 1000 genes. *Mol Biochem Parasitol.* 2006. 148(2):144-60.
- Meissner M, Schlüter D, Soldati D. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science.* 2002. 298(5594):837-40.
- Ménard R. Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cell Microbiol.* 2001. 3(2), 63-73.
- Millar SB, Cox-Singh J. Human infections with *Plasmodium knowlesi*--zoonotic malaria. *Clin Microbiol Infect.* 2015. 21(7):640-8.
- Mooseker MS, Foth BJ. The structural and functional diversity of the myosin family of actin-based molecular motors. In *Myosins A superfamily of molecular motors.* 2008. The Netherlands, Springer Editorial, 467 p.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, et al. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009. 16:2785-91.
- Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Bio Rev.* 2002. 66:21-38.
- Nebi T, Prieto JH, Kapp E, Smith BJ, Williams MJ, et al. Quantitative in vivo analyses reveal calcium-dependent phosphorylation sites and identifies a novel component of the *Toxoplasma* invasion motor complex. *PLoS Pathog.* 2011. 7(9):e1002222.
- Nishigaki R, Shinohara T, Toda T, Omori A, Ichinose S, et al. An extra human chromosome 21 reduces *mlc-2a* expression in chimeric mice and Down syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002. 295:112-8.
- Odrionitz F, Kollmar M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol.* 2007, 8:R196.

Otto TD, Wilinski D, Assefa S, Keane TM, Sarry LR, et al. New insights into the blood-stage transcriptome of *Plasmodium falciparum* using RNA-Seq. *Mol Microbiol.* 2010. 76(1):12-24.

PAHO, Organización Panamericana de la Salud, Malaria 2015. En http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2573&Itemid=2060&lang=en, consultado noviembre 2016.

Pinder JC, Fowler RE, Dluzewski AR, Bannister LH, Lavin, FM, et al. Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. *J Cell Sci.* 1998. 111: 1831–1839.

Pinder J, Fowler R, Bannister L, Dluzewski A, Mitchell GH. Motile systems in malaria merozoites: how is the red blood cell invaded? *Parasitol Today.* 2000. 16(6):240-5.

Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science.* 2009. 326(5957):1208-12.

Polonais V, Foth JB, Chinthalapudi K, Marq JB, Manstein DJ, et al. Unusual anchor of a motor complex (MyoD-MLC2) to the plasma membrane of *Toxoplasma gondii*. *Traffic.* 2011. 12:287-300.

Rhoads AR, Friedberg F. Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J.* 1997. 11:331-40

Riglar DT, Richard D, Wilson DW, Boyle MJ, Dekiwadia C, et al. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host & Microbe.* 2011. 9:9–20.

Rivadeneira EM, Wasserman M, Espinal CT. Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients. *J Protozool.* 1983. 30(2):367-70.

Rüegg C, Veigel C, Molloy JE, Schmitz S, Sparrow JC, Fink RH. Molecular motors: force and movement generated by single myosin II molecules. *News Physiol Sci.* 2002. 17:213-8.

Sambrook J, Russell DW. Detection of Protein-Protein Interactions Using the GST Fusion Protein Pulldown Technique. *CSH Protoc.* 2006. 2006(1).

Schliwa M, Woehlke G. Molecular motors. *Nature.* 2003. 422:759-765.

Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. 2005. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res.* 33: W363-367.

Sebé-Pedrós A, Grau-Bové X, Richards TA, Ruiz-Trillo I. Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach. *Genome Biol Evol.* 2014. 6(2):290-305.

Sibley LD, Håkansson S, Carruthers VB. Gliding motility: An efficient mechanism for cell penetration. *Curr Biol.* 1998. 8:R-12-R14.

Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. *Science.* 2004. 304:248-53.

Siden-Kiamos I, Ganter M, Kunze A, Hliscs M, Steinbüchel M, et al. Stage-specific depletion of myosin A supports an essential role in motility of malarial ookinetes. *Cell Microbiol.* 2011. 13(12):1996-2006.

Sievers F, Higgins DG. Clustal omega. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2014. 48:3.13.1-16.

Sirotkin V, Beltzner CC, Marchand JB, Pollard TD. Interactions of WASp, myosin-I, and verprolin with Arp2/3 complex during actin patch assembly in fission yeast. *J Cell Biol.* 2005. 170(4):637-48.

SIVIGILA, BES- Boletín Epidemiológico Semanal No. 41, 2016. Instituto Nacional de Salud, Colombia.

Skillman KM, Diraviyam K, Khan A, Tang K, Sept D, Sibley LD. Evolutionarily divergent, unstable filamentous actin is essential for gliding motility in apicomplexan parasites. *PLoS Pathog.* 2011. 7(10):e1002280.

Soldati D, Meissner M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr Opin Cell Biol.* 2004. 16:32-40.

Sultan AA, Thathy V, Frevert U, Robson KJH, Crisanti A, et al. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell.* 1997. 90:511-22.

Thomas JC, Green JL, Howson RI, Simpson P, Moss DK, et al. Interaction and dynamics of the *Plasmodium falciparum* MTIP-MyoA complex, a key component of the invasion motor in the malaria parasite. *Mol Biosyst.* 2010. 6:494-498.

Tonkin CJ, van Dooren GG, Spurck TP, Struck NS, Good RT, et al. Localization of organellar proteins in *Plasmodium falciparum* using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method. *Mol Biochem Parasitol.* 2004. 137(1):13-21.

Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 1976. 193, 673-675.

Trieu EP, Targoff IN. Immunoprecipitation: Western blot for proteins of low abundance. *Methods Mol Biol.* 2015. 1312:327-42.

- Trybus, K. M. Role of myosin light chains. *J Muscle Res Cell Motil.* 1994.15: 587–594.
- Vahokoski J, Bhargav SP, Desfosses A, Andreadaki M, Kumpula EP, et al. Structural differences explain diverse functions of *Plasmodium* actins. *PLoS Pathog.* 2014. 10(4):e1004091.
- Watson JD, Laskowski RA, Thornton JM. Predicting protein function from sequence and structural data. *Curr Opin Struct Biol.* 2005.15(3):275-84.
- Wakayama T, Kato Y, Utsumi R, Tsuji A, Iseki S. A Time- and Cost-Saving Method of Producing Rat Polyclonal Antibodies. *Acta Histochem Cytochem.* 2006. 39(3): 79–87.
- Webb SE, Fowler RE, O'Shaughnessy C, Pinder JC, Dluzewski AR, et al. Contractile protein system in the asexual stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology.* 1996. 112(5):451-7.
- Wesseling JG, Smits MA, Schoenmakers JG. Extremely diverged actin proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1988. 30(2):143-53.
- Wetzel DM, Hakansson S, Hu K, Roos D, Sibley LD. Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol Biol Cell.* 2003. 14:396–406.
- Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007. 35:W407-W410.
- Williamson RC, Bass MD. Comparing the Affinity of GTPase-binding Proteins using Competition Assays. *J Vis Exp.* 2015. (104).
- WHO, Organización Mundial de la Salud, World Malaria Report 2015. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>.
- Wu Y, Li Q, Chen XZ. Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat Protoc.* 2007. 2(12):3278-84.
- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods.* 2015. 12:7-8.
- Yeoman JA, Hanssen E, Maier AG, Klonis N, Maco B, et al. Tracking glideosome-associated protein-50 reveals the development and organization of the inner membrane complex of *P. falciparum*. *Eukaryot Cell.* 2011.10(4):556-64.
- Yusuf NA, Green JL, Wall RJ, Knuepfer E, Moon RW, et al. The *Plasmodium* Class XIV Myosin, MyoB, Has a Distinct Subcellular Location in Invasive and Motile Stages of the Malaria Parasite and an Unusual Light Chain. *J Biol Chem.* 2015. 290(19):12147-64.