



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización de la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT) mediante análisis estructural y de interacción proteína-proteína

Lesly Johanna Ortiz Joya

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

Caracterización de la nicotinamida/nicotinato mononucleótido
adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT) mediante
análisis estructural y de interacción proteína-proteína

Lesly Johanna Ortiz Joya

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

Directora

María Helena Ramírez Hernández Dr. rer. nat.

Línea de Investigación:

Bioquímica y biología molecular de parásitos

Grupo de Investigación Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica
(LIBBIQ)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2017

*Hay proyectos, sueños y retos toda la vida.
Soñar, creer y hacer es el continuo caminar.
Este es un sueño y una realidad gracias a Dios, mi familia,
amigos y personas que caminan a mi lado.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, mi alma mater, al departamento de Química y al Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ), por la formación académica, profesional y personal; además por proporcionarme las instalaciones para desarrollar mi trabajo de investigación.

A la Facultad de Ciencias por su colaboración y apoyo con las becas como auxiliar docente durante mi posgrado.

A Colciencias por la financiación del proyecto titulado: "Explorando las diferencias: Caracterización *in silico* e *in vitro* de los dominios estructurales exclusivos de la Nicotinamida/Nicotinato Mononucleótido Adenilil Transferasa de *Leishmania braziliensis* con miras a su bloqueo funcional" con código 110165843119.

A la doctora María Helena Ramírez Hernández por su ayuda en la planeación, diseño y ejecución de este trabajo. Además, por su confianza y enseñanzas tanto a nivel profesional como personal.

A las doctoras Giovana Granados y Magda Alvarado, por su colaboración a lo largo de este trabajo.

A Rosalbita por su ayuda y colaboración en todos los trámites administrativos que fueron necesarios e importantes.

A mi grupo de investigación (LIBBIQ). Es especial a Laura K. Guasca, Luis Contreras, Diana Sánchez, Nicolás Forero, Laura Jutinico, Andrés Herrera, Carlos Nieto, Carlos Niño, Paula Moreno, David Morales, Melissa Ostos, Gustavo Garzón y todos y cada uno de mis compañeros.

A mi familia y amigos, en especial a mi madre, mi hermano y mi tía Ofe, por su amor, comprensión, apoyo y paciencia durante esta experiencia.

Resumen

Los parásitos del género *Leishmania* son los agentes causales de la leishmaniasis, enfermedad endémica en regiones tropicales y subtropicales, que afecta a miles de personas en el mundo. Las estrategias farmacológicas actuales generan numerosos efectos secundarios, por lo que es necesario desarrollar tratamientos que controlen el parásito sin afectar al hospedero. La enzima NMNAT (EC: 2.7.7.1/18) representa una diana terapéutica promisoriosa, dado que cataliza el paso final en la biosíntesis del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD) y/o del dinucleótido de adenina y ácido nicotínico (NaAD), metabolitos esenciales en múltiples procesos celulares.

Como parte de la caracterización e identificación de la NMNAT de *L. braziliensis* (LbNMNAT), se realizó un análisis bioinformático, comparando NMNATs del género *Leishmania* con las tres isoformas humanas, con lo cual se logró determinar la existencia de inserciones exclusivas en la secuencia de aminoácidos de la enzima del parásito. Dada la importancia de estas inserciones como componentes estructurales propios de la LbNMNAT, se realizó el estudio *in vitro* de los mutante Δ_{8-42} LbNMNAT y $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT, al igual que del mutante Δ_{1-104} LbNMNAT. Se diseñaron las respectivas recombinantes a partir de análisis de modelos estructurales predictivos, tecnologías de ADN recombinante y estrategias de mutagénesis delecional. La expresión de las proteínas se efectuó en la cepa *E. coli* SHuffle T7 express y su purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad a níquel. La actividad catalítica de las proteínas parcialmente purificadas se evaluó tanto por ensayos enzimáticos acoplados como directos. Se encontró que la deleción 1-104 afecta uno de los motivos de unión a ATP, modificando la arquitectura del plegamiento Rossmann de la proteína conllevando a la inactivación de la enzima. Por su parte, la deleción 241-249, elimina un elemento estructural clave que conecta los dominios α/β y C-terminal disminuyendo drásticamente la solubilidad y actividad enzimática de la proteína recombinante correspondiente.

Por otro lado, para ampliar el conocimiento funcional de la LbNMNAT por interacción con otras proteínas, a partir de fracciones soluble de promastigotes de *L. braziliensis* transfectados con el vector pSP72 α neo α LbNMNAT-GFP, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas (Co-IP-MS/MS), identificando 38 proteínas que fueron clasificadas según su función celular. Se analizaron candidatos relacionadas con plegamiento de proteínas, homeóstasis redox y traducción, sugiriendo nuevas funciones celulares en las que puede participar la enzima. A nivel *in silico*, empleando STRING, se construyó una red de interacción proteína-proteína conformada por 11 nodos y 16 conexiones. La red fue enriquecida funcionalmente con las bases de datos KEGG, PFAM e INTERPRO, en donde 5 de las proteínas están relacionadas con la ruta metabólica del nicotinato y la nicotinamida, y cuatro con motivos de unión a ARN, en este caso, se adjudica que la mayoría de las interacciones son de tipo funcional. Con estas herramientas se da el paso inicial en la construcción de un modelo de interacción de proteínas con la LbNMNAT para establecer nuevas rutas funcionales.

Palabras claves: *Leishmania braziliensis*, Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida (NAD⁺), Nicotinamida/Nicotinato Mononucleótido Adenililtransferasa (NMNAT), mutagénesis, interacción de proteínas, red de interacción de proteínas.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	5
Lista de figuras	9
Lista de tablas.....	11
Lista de abreviaturas y símbolos	12
1. Introducción	14
2. Marco Teórico	16
2.1 Modelo de estudio: <i>Leishmania braziliensis</i>	16
2.2 Nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenililtransferasa (NMNAT)	18
2.3 ¿Por qué es importante el estudio del metabolismo del Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida (NAD ⁺)?	19
2.4 Metabolismo del NAD ⁺ en <i>Leishmania</i>	21
2.5 Estudio de mutantes de la NMNAT.....	21
2.6 Interacciones proteína-proteína: métodos experimentales y métodos Bioinformáticos.....	22
3. Antecedentes.....	23
4. Preguntas de investigación.....	24
5. Objetivos.....	24
5.1 General	14
5.2 Específicos	14
6. Materiales y métodos.....	25

Capítulo 1

6.1 Evaluar a nivel de proteína recombinante, la participación de las inserciones exclusivas de la LbNMNAT en su actividad enzimática, mediante el diseño y estudio de mutantes.....	25
6.1.1 Acercamiento computacional.....	25
6.1.1.1 Comparación de secuencias de la proteína LbNMNAT con las isoenzimas humanas.	25
6.1.1.2 Predicción de estructura secundaria, características fisicoquímicas y modificaciones postraduccionales.....	26
6.1.1.3 Predicción de estructura 3D, validación de modelos y superposición estructural.....	26
6.1.2 Acercamiento experimental	
6.1.2.1 Obtención del vector pQE30 - Δ_{8-42} LbNMNAT mediante mutagénesis dirigida.	26
6.1.2.2 Extracción e identificación del vector pQE30- Δ_{8-42} LbNMNAT mediante PCR y digestión enzimática con KpnI y BamHI.....	27

6.1.2.3	Obtención del vector pQE30 Δ_{1-104} LbNMNAT mediante sub-clonación.	28
6.1.2.4	Expresión de la proteína recombinante 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT.	29
6.1.2.5	Detección de la recombinante 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT.....	30
6.1.2.6	Purificación de la proteína recombinante 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC).	30
6.1.2.7	Estandarización de las condiciones óptimas de solubilización de la proteína recombinante 6xHis- $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT.....	31
6.1.2.8	Evaluación de la actividad enzimática de las proteínas recombinantes mediante ensayos acoplados.	31
6.1.2.9	Evaluación de la actividad enzimática de la NMNAT mediante ensayos directos.	32
6.2	Estudiar <i>in vivo</i> el efecto de modificaciones estructurales exclusivas de la LbNMNAT en la localización sub-celular, empleando parásitos transgénicos.	32
6.2.1	Construcción del vector pSP72 α neo α - Δ_{1-43} LbNMNAT-GFP.....	32
6.2.2	Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i>	33
6.2.3	Transfección de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i>	33

Capítulo 2

6.3.	Explorar experimentalmente posibles interacciones de la LbNMNAT con otras proteínas, utilizando técnicas de inmunoprecipitación y espectrometría de masas.	34
6.3.1	Preparación de extracto de proteínas.....	34
6.3.2	Co-inmunoprecipitación de las proteínas asociadas a LbNMNAT-GFP.	34
6.3.3	Análisis de proteínas mediante espectrometría de masas.....	35
6.4.	Identificar posibles interacciones de la LbNMNAT con otras proteínas implementando análisis de redes.....	35
8.	Resultados y discusión	37

Capítulo 1. Estudio de regiones específicas de la enzima a través del diseño y creación de mutantes

7.1	Existen regiones específicas en la NMNAT de <i>Leishmania braziliensis</i> con respecto a las isoenzimas humanas.	37
7.2	Las regiones específicas de la NMNAT de <i>Leishmania braziliensis</i> identificadas <i>in silico</i> , pueden presentar modificaciones postraduccionales.	40
7.3	La remoción de los residuos 241-249 de la proteína LbNMNAT afecta su solubilidad y su actividad enzimática <i>in vitro</i>	44
7.4	Mediante mutagénesis dirigida se construyó el plásmido pQE30- Δ_{8-42} LbNMNAT.....	51
7.5	Análisis de una versión corta de la NMNAT de <i>Leishmania braziliensis</i>	54
7.5.1.	Construcción, expresión y evaluación de la actividad enzimática de la proteína recombinante 6xHis Δ_{1-104} LbNMNAT.....	56
7.5.2.	Estudio de la actividad chaperona de las NMNATs.....	61

7.6. Estudio <i>in vivo</i> del efecto delecional del extremo amino terminal de la LbNMNAT en la localización sub-celular.	63
Capítulo 2. Exploración de posibles interacciones de la NMNAT de <i>Leishmania braziliensis</i> con otras proteínas implementando herramientas experimentales y análisis de redes.	65
7.7. Co-inmunoprecipitación de proteínas que interactúan con la enzima LbNMNAT bajo condiciones de sobre-expresión en promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	67
7.7.1 Análisis de interacción de proteínas de unión al ARN y constituyentes del ribosoma con la LbNMNAT.	73
7.7.2. La LbNMNAT puede estar participando en el plegamiento de otras proteínas a través de su interacción con un complejo de chaperonas.	74
7.7.3. Proteínas co-inmunoprecipitadas con la NMNAT son importantes en homeóstasis redox.	77
7.8. Análisis bioinformático y generación de una red de interacción de la NMNAT de <i>L. braziliensis</i>	78
9. Conclusiones	85
10. Anexos	87
Anexo 1. Construcción del vector pQE30 Δ_{8-42} LbNMNAT mediante mutagénesis dirigida mediante PCR.	87
Anexo 2. Existe una inserción amino terminal en NMNATs de organismos pertenecientes al orden Trypanosomatida en comparación con sus ortólogas humanas.	88
Anexo 3. Predicción del Plot de Ramachandran de los modelos 3D de la proteína LbNMNAT y las versiones delecionadas.	89
Anexo 4. Expresión, purificación y determinación de la actividad enzimática de la proteína recombinante 6xHisLbNMNAT.	90
Anexo 5. Cromatogramas para la determinación de los tiempos de retención de los compuestos NMN, ATP y NAD ⁺	91
Anexo 6. Proteínas identificadas en co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas para la LbNMNAT-GFP. (Control)	92
10. Bibliografía	93

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1	Clasificación taxonómica de <i>Leishmania braziliensis</i>16
Figura 2-2	Ciclo de vida y transmisión antroponótica y zoonótica de <i>Leishmania</i>17
Figura 2-3.	Esquema general de la reacción catalizada por la NMNAT.....18
Figura 2-4.	Importancia del NAD(P) en el metabolismo redox y la señalización.....20
Figura 2.5.	Representación de la biosíntesis de NAD ⁺ por la vía de <i>novo</i> y de reciclaje.....20
Figura 6.1.	Técnica de sub-clonación para el vector pQE30- Δ_{1-104} LbNMNAT.....28
Figura 7.1.	Comparación de la secuencia primaria de la LbNMNAT, en el extremo amino terminal, con NMNATs de diferentes organismos.....38
Figura 7.2.	Identificación de regiones específicas de la NMNAT de <i>Leishmania braziliensis</i>39
Figura 7.3.	Comparación estructural de las isoenzimas humanas 1 y 3 con la LbNMNAT.....40
Figura 7.4.	La secuencia de la LbNMNAT contiene mayoritariamente aminoácidos no polares.....42
Figura 7.5.	Modelos de estructura terciaria de la proteína silvestre y las versiones mutadas..43
Figura 7.6.	Modelos de estructura terciaria de la LbNMNAT silvestre con las proteínas $\Delta_{205-212}$ LbNMNAT y $\Delta_{264-276}$ LbNMNAT en unión con ATP.....43
Figura 7.7.	Esquema de la proteína 6xHis-LbNMNAT completa, al igual que las proteínas 6xHis- Δ_{8-42} LbNMNAT, 6xHis- $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT y 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT.....44
Figura 7.8.	Cisteínas presentes en el modelo tridimensional de la proteína Lb $\Delta_{241-249}$ NMNAT.....45
Figura 7.9.	Representación esquemática de las rutas redox implicadas en la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma de SHuffle.46
Figura 7.10.	Evaluación de la expresión de la proteína recombinante 6xHis $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT en las fracciones solubles e insolubles de la cepas de expresión <i>E. coli</i> SHuffle y su purificación parcial mediante IMAC.48
Figura 7.11.	La delección carboxi-terminal afecta la actividad catalítica de la LbNMNAT.....49
Figura 7.12.	La remoción de los residuos 241-249 de la LbNMNAT afecta su actividad adenililtransferasa.49
Figura 7.13.	La delección 241-249 en la LbNMNAT elimina un elemento estructural clave de las NMNATs.51
Figura 7.14.	Construcción del plásmido recombinante pQE30- Δ_{8-42} LbNMNAT.....53
Figura 7.15.	Evaluación de la expresión de la proteína recombinante 6xHis Δ_{8-42} LbNMNAT.....53
Figura 7.16.	Modelos predictivos de la estructura terciaria de la LbNMNAT silvestre y el mutante 8-42 en unión con ATP.....54
Figura 7.17.	Análisis de un sitio alternativo del inicio de la transcripción en la secuencia codificante de la LbNMNAT.....56
Figura 7.18.	Construcción del plásmido recombinante pGEMT- Δ_{1-104} LbNMNAT.57
Figura 7.19.	Construcción del plásmido recombinante pQE30- Δ_{1-104} LbNMNAT.57
Figura 7.20.	Expresión de la proteína recombinante 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT (~26kDa) en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) como cuerpos de inclusión.58

Figura 7.21.	Solubilización y purificación parcial de la proteína recombinante 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT (~26kDa).	59
Figura 7.22.	La proteína recombinante 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT no presenta actividad adenililtransferasa.	59
Figura 7.23.	Modelos predictivos de la estructura terciaria de las proteínas LbNMNAT y Δ_{1-104} LbNMNAT.	60
Figura 7.24.	Motivos de unión a ATP en las proteínas LbNMNAT y Δ_{1-104} LbNMNAT según el modelo de estructura terciaria.	60
Figura 7.25.	La región N-terminal de la DmNMNAT no es necesaria para la actividad chaperona.....	61
Figura 7.26.	La LbNMNAT y la versión Δ_{1-104} LbNMNAT presentan semejanza estructural con la NMNAT- Δ N de <i>Drosophila melanogaster</i> que tiene actividad chaperona.	62
Figura 7.27.	La enzima LbNMNAT y la Usp presentan semejanza estructural significativa.....	63
Figura 7.28.	Construcción de los plásmidos pGEMT- Δ_{1-43} LbNMNAT y pSP72 Δ_{1-43} LbNMNAT-GFP.....	64
Figura 7.29.	Diagrama co-inmunoprecipitación-espectrometría de masas para identificar las proteínas que interactúan con la LbNMNAT.	66
Figura 7.30.	Expresión de las proteínas LbNMNAT-GFP (60 kDa) y GFP (27 kDa) en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i>	67
Figura 7.31.	Identificación de proteínas que co-inmunoprecipitan con la NMNAT de <i>L. braziliensis</i>	69
Figura 7. 32.	Proteínas co-inmunoprecipitadas agrupadas con base en la función y proceso biológico en el que participan.	72
Figura 7.33.	Las chaperoninas identificadas en la Co-IP interactúan entre sí en una red de interacción teórica.	75
Figura 7.34	Red de interacción de la NMNAT en <i>L. braziliensis</i>	79
Figura 7.35.	Enriquecimiento funcional de la red de interacción de la LbNMNAT.	80
Figura 7.36.	Metabolismo del nicotinato y nicotinamida en <i>Leishmania braziliensis</i>	81

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2.1	Cuadros clínicos presentados por el hospedero según especies de <i>Leishmania</i> distribuidas en el viejo y nuevo mundo 17
Tabla 7.1	Predicción de potenciales sitios de fosforilación de la LbNMNAT con NetPhos 3.0...41
Tabla 7.2.	Parámetros fisicoquímicos de la NMNAT de <i>Leishmania braziliensis</i> y los mutantes delecionales.....42
Tabla 7.3.	Composición porcentual de aminoácidos no polares, polares cargados y polares no cargados de las inserciones identificadas.42
Tabla 7.4.	Enlaces disulfuro predichos para la proteína Lb Δ 241-249NMNAT empleando Dipro.....45
Tabla 7.5.	Predicción de la estructura secundaria de las proteínas LbNMNAT y Δ 241-249LbNMNAT.....50
Tabla 7.6.	Proteínas identificadas en co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas para la LbNMNAT-GFP. (Muestra 1)70
Tabla 7.7.	Proteínas identificadas en co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas para la LbNMNAT-GFP. (Muestra 2)71
Tabla 7.8.	Listado de proteínas que interactúan con la Hsp10 (XP_001562295.1) bajo la predicción en STRING. Se describe su ID, proteínas de interacción predichas y su respectivo score.76
Tabla 7.9.	Algunas bases de datos de interacción proteína-proteína.....79
Tabla 7.10.	Listado de proteínas que interactúan con LbNMNAT (XP_001563913.1) bajo la predicción de STRING.80
Tabla 7.11.	Características funcionales de las proteínas involucradas en la ruta metabólica de la nicotinamida/nicotinato.....82
Tabla 7.12	Interacciones proteicas predichas para la NMNAT de <i>L. braziliensis</i> por el método <i>Interolog Mapping</i> implementado por Rezende <i>et. al.</i>83

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
6xHis	Etiqueta de hexa histidinas
aa	aminoácido
ADH	Enzima alcohol deshidrogenasa
ADPR	ADP ribosa
ADPRc	ADP ribosa cíclico
AmB	Anfotericina B
ARTs	Mono- y poli ADP ribosiltransferasas
ATP	Adenosin trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3'-indoilfosfato
BioGRID	Database of Protein, Chemical, and Genetic Interactions
BSA	Albúmina sérica bovina
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternero
Co-IP	Co-inmunoprecipitación
CPN	Chaperoninas mitocondriales
CS	Citrato Sintasa
DEPC	Dietil pirocarbonato
DIP	Database of Interacting Proteins
DRX	Difracción de rayos x
GFP	Green fluorescent protein
GO	Gene ontology
gor	Glutación reductasa
hnRNP	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HSP	Proteínas de choque térmico
HST	Homologous of Sir Two
IMAC	Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados
IntAct	Molecular Interaction Database
IP	Inmunoprecipitado
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranósido
ISTIDs	Isoform Specific Targeting and Interaction Domains
kDa	Kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LB	Luria Bertani
MS	Espectrometría de masas
NA	Ácido Nicotínico
NaAD	Dinucleótido de adenina y ácido nicotínico
NaADP	Dinucleótido fosforilado de adenina y ácido nicotínico
NAD ⁺	Dinucleótido de adenina y nicotinamida Oxidado
NADH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido

NADK	NAD ⁺ Quinasa
NADP ⁺	NAD fosfato
Nam	Nicotinamida
NaMN	Mononucleótido de ácido nicotínico
NamPRT	Fosforibosil transferasa de la Nam
NAPRT	Fosforibosil transferasa del NA
NBT	Nitro-azul de tetrazolio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMN	Mononucleótido de nicotinamida
NR	Ribósido de nicotinamida
NRK	Enzimas quinasas
NTA	Ácido nitriloacético
OMS	Organización mundial de la salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PDB	Protein Data Bank
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PIN	Redes de interacción de proteínas
PKC	Protein Kinase C
PPI	Protein-protein interactions
PRPP	Fosforibosil pirofosfato
QA	Ácido quinolínico
QAPRT	Fosforibosil transferasa del QA
RNAP II	ARN polimerasa II
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
snRNPs	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
TAP	Purificación por afinidad en tándem
TCP1	El complejo-T proteína-1
TR	Tripanotión reductasa
TrxB	Tiorredoxin reductasa
TXNPx	Triparedoxin peroxidasa
USP	Universal Strees Protein
WB	Western blot
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactopiranosido

1. Introducción

La mayoría de países latinoamericanos son afectados por enfermedades tropicales infecciosas, muchas de ellas parasitarias, clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como enfermedades desatendidas. Entre estas enfermedades encontramos la leishmaniasis, una patología causada por parásitos del género *Leishmania*, y considerada como un problema significativo en salud pública, debido a su magnitud y complejidad clínica, biológica y epidemiológica [1].

Anualmente, presenta una incidencia de aproximadamente 1.3 millones de nuevos casos clínicos, prevalentes en 98 países, incluido Colombia. En el territorio nacional, se presentan las tres formas clínicas de la enfermedad: la leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral [2]. Para el control y tratamiento de la leishmaniasis, los fármacos más utilizados son costosos, tóxicos y frecuentemente requieren largos períodos de terapia supervisada [3]. Entre dichos tratamientos se destacan las sales de antimonio pentavalente (Sb^{5+}), sin embargo, causan graves y numerosos efectos secundarios como cardiotoxicidad, deterioro de la función hepática y renal, dolor abdominal, entre otros [4]. Adicional a ello, varias publicaciones resaltan resistencia por parte de los parásitos [5]–[7], y en la actualidad no existen vacunas eficaces frente a esta enfermedad [8].

Dada la inexistencia de fármacos específicos y menos agresivos, se requiere descubrir nuevas dianas moleculares y nuevos agentes terapéuticos que ayuden a prevenir y tratar la leishmaniasis. Para el diseño de fármacos es necesario desarrollar estudios integrales que permitan conocer la biología del parásito y la estructura de su maquinaria bioquímica, con el fin de establecer blancos potenciales y posibles inhibidores. Las enzimas son consideradas una de las clases más importantes de dianas farmacológicas debido a sus funciones catalíticas, esenciales en muchos procesos fisiológicos [9]. En nuestro grupo de investigación se estudia enzimas involucradas en el metabolismo del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD^+), dado que esta molécula tiene un papel central en el metabolismo celular, en la producción de energía, en numerosas reacciones redox en la célula, al igual que en mecanismos de reparación del ADN y en funciones de señalización de calcio [10].

Diversas investigaciones señalan que las enzimas implicadas en el metabolismo de NAD^+ son dianas atractivas para el desarrollo de fármacos contra una variedad de enfermedades humanas [11]. Por ello, nuestro trabajo se enfoca en la **Nicotinamida/Nicotinato mononucleótido adenililtransferasa (NMNAT)**; enzima que cataliza la condensación del mononucleótido de nicotinamida (NMN) o mononucleótido de ácido nicotínico (NaMN) con el grupo adenilil del ATP para formar NAD^+ o NaAD (dinucleótido de adenina y ácido nicotínico) [12].

En el parásito *Leishmania braziliensis*, nuestro laboratorio, ha llevado a cabo la caracterización bioquímica de la única NMNAT encontrada [13]; el estudio se ha centrado en aspectos tanto estructurales como funcionales de la enzima que evidencian diferencias notables entre la proteína y sus homólogas humanas. Por lo que en este proyecto de investigación se hace hincapié en diferencias a nivel de estructura primaria de la proteína del parásito con respecto a las isoenzimas humanas que se han identificado a través de análisis bioinformáticos. Actualmente, se desconoce la relevancia

funcional de estos dominios estructurales propios de la LbNMNAT y su intervención en la actividad enzimática y/o la localización intracelular en el parásito. Es por ello, que el análisis comparativo a nivel estructural de la NMNAT y las NMNATs humanas (hNMNAT), se convierte en un paso necesario hacia su caracterización funcional y la búsqueda de potenciales inhibidores selectivos contra la enzima del parásito o moduladores del metabolismo del NAD⁺.

Por otro lado, se conoce que las proteínas llevan a cabo sus funciones celulares a través de interacciones concertadas con otras proteínas, por lo que es importante conocer la naturaleza específica de estas relaciones. En el caso de la NMNAT de *L. braziliensis* no se han explorado las interacciones que presenta, favoreciendo el uso de herramientas experimentales y teóricas para su estudio. El poder construir una red de interacción de la enzima con otras proteínas, puede ofrecer nuevos conocimientos sobre la función de las proteínas identificadas y ayudar a la creación de un modelo metabólico en el que se contextualicen sus funciones.

2. Marco Teórico

2.1 Modelo de estudio : *Leishmania braziliensis*

Los parásitos del género *Leishmania* son protozoarios flagelados pertenecientes al orden Tripanosomátida y son considerados agentes etiológicos de la leishmaniasis, enfermedad endémica en regiones tropicales y subtropicales que pone en riesgo a cerca de 350 millones de personas en el mundo [8]. Esta enfermedad se conoce por diversas manifestaciones clínicas como lesiones en la piel, inflamación de las mucosas e infección visceral, conocidas como leishmaniasis cutánea, mucocutánea y kala-azar respectivamente [4]. En Colombia, se presentan las tres formas clínicas de la patología, siendo la leishmaniasis cutánea (95% de los casos) la más frecuente, además es endémica en casi todo el territorio y se estima que existen alrededor de 10 millones de personas en riesgo [14]. Según el último reporte de la Organización Panamericana de la Salud - OPS/OMS de abril del 2017, nuestro país presentó una incidencia de 33.6 por cada 100.000 habitantes y una ocurrencia de 7541 nuevos casos [1].

Se sabe que *Leishmania* presenta cerca de 30 especies, de las cuales 20 son patógenas para el humano; estas se clasifican en función de su biología, bioquímica, inmunología y filogenia molecular[15]. De igual forma, *Leishmania* está dividido en dos subgéneros: el subgénero *Leishmania* encontrado tanto en el viejo mundo (África, Asia, el Mediterráneo y el sur de Europa) como en el nuevo mundo (centro y sur América); y el subgénero *Viannia*, característico de sur América [16]. La especie *Leishmania braziliensis* es del género *Leishmania* y subgénero *Viannia*, como se muestra en la figura 2.1. En cuanto a los cuadros clínicos presentados por el hospedero, se registra que varían según la especie que infecta (tabla 2.1) [4].

Figura 2.1. Clasificación taxonómica de *Leishmania braziliensis*. Adaptado de Shoemaker et al. [17]

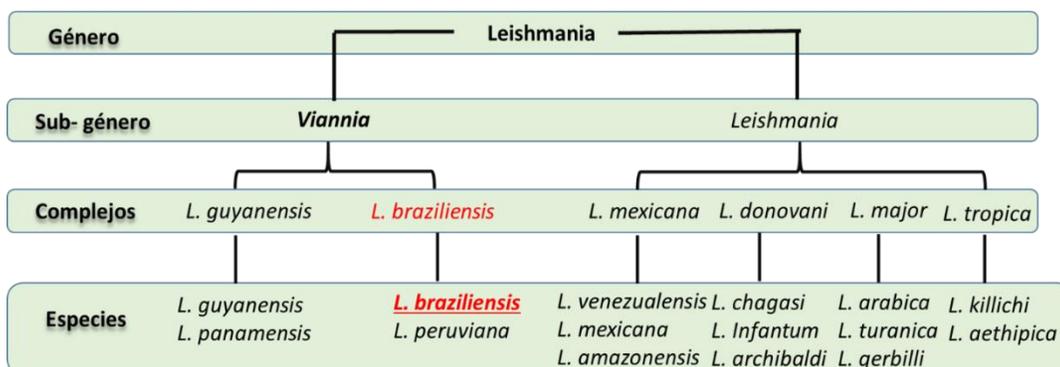
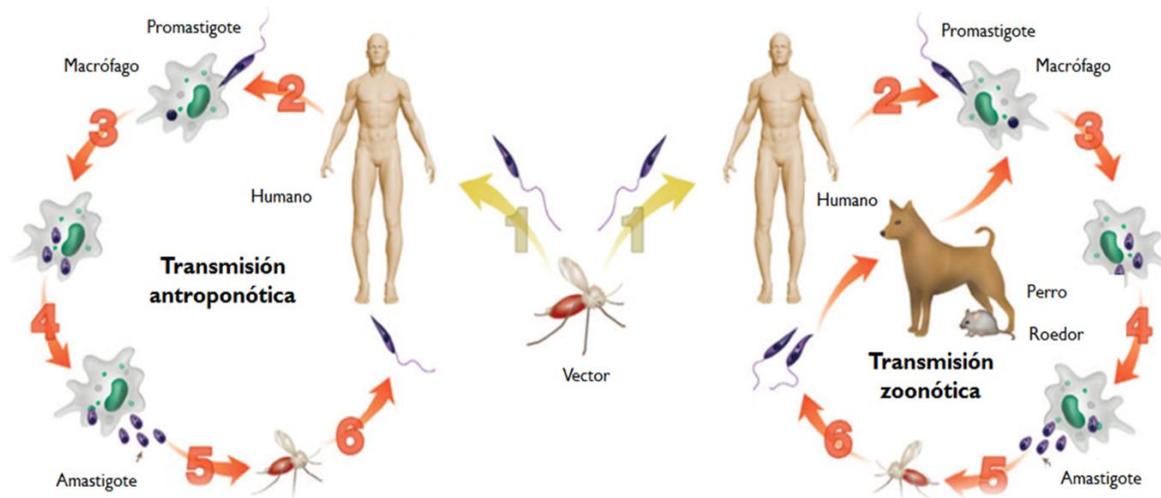


Tabla 2.1 Cuadros clínicos presentados por el hospedero según especies de *Leishmania* distribuidas en el viejo y nuevo mundo [4].

<i>Cuadro clínico</i>	<i>Especies (viejo mundo)</i>	<i>Especies (nuevo mundo)</i>
Leishmaniasis visceral	<i>L. donovani</i> y <i>L. infantum</i>	<i>L. chagasi</i>
Leishmaniasis cutánea	<i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. major</i> , <i>L. infantum</i> y <i>L. donovani</i>	<i>L. mexicana</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. peruviana</i> y <i>L. braziliensis</i>
Leishmaniasis mucocutánea	<i>L. major</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. tropica</i>	<i>L. mexicana</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. amazonensis</i> y <i>L. braziliensis</i>

Hay 30 diferentes especies de vectores involucrados en el proceso de transmisión de la enfermedad, son insectos hembras hematófagas pertenecientes a la subfamilia *Phlebotominae*, a la cual pertenece el género *Lutzomyia* que es predominante en sur América [16]. La transmisión de los parásitos *Leishmania* es antroponótica (de humano a humano a través del vector) en Asia y la India, mientras que en África, Europa y las Américas, es zoonótica (transmitida de animal a humano a través del vector), donde los perros y roedores actúan como principales reservorios (figura 2.2).

Figura 2.2. Ciclo de vida y transmisión antroponótica y zoonótica de *Leishmania*. El ciclo de vida del parásito es dimórfico, dividido entre el estado promastigote en el vector y el estado amastigote en el hospedero. El ciclo inicia con parásitos en el estado promastigote que se inyectan cuando los flebotomos hembra infectados ingieren sangre (1), luego son absorbidos por las células dendríticas y los macrófagos, ya sea a través de fagocitosis de los parásitos libres o de neutrófilos infectados (2). De manera seguida, los promastigotes se convierten en amastigotes (forma no flagelada) en el interior del fagolisosoma del macrófago (3) y se divide por fisión binaria (4). Los amastigotes son liberados por la ruptura de los macrófagos (5) para posteriormente ser absorbidos por otro flebotomo durante otra picadura y succión de sangre. De esta manera, del estadio amastigote se pasa a la forma promastigotes en el intestino medio de la mosca, y así se transmite a otro hospedero (6) [4], [15].

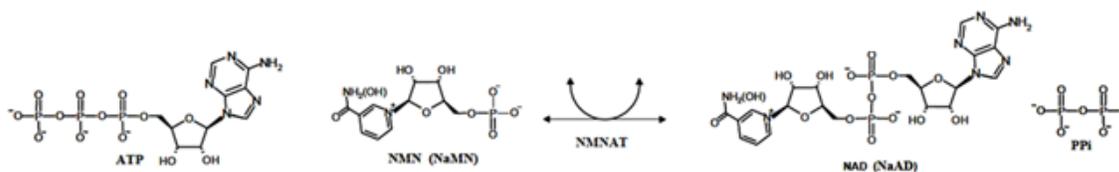


Las medidas actuales para contrarrestar la leishmaniasis involucran tratamientos quimioterapéuticos, al igual que el uso de fármacos derivados de antimonio pentavalente (Sb^{5+}), como el antimoniato de meglumina, el estibogluconato de sodio (Pentostam), la anfotericina B (AmB), entre otros. Sin embargo, el empleo de estos fármacos se asocia a problemas de costos elevados, tratamientos de alta duración, efectos secundarios tóxicos y sobre todo desarrollo de resistencia por parte del parásito ante los medicamentos, debido a la variación en la sensibilidad de las especies de *Leishmania* a las drogas, la variación en la farmacocinética, y la variación en la interacción de las drogas con la respuesta inmune del hospedero [7]. Por esta razón, las investigaciones se enfocan en el desarrollo de nuevas medidas de control, prevención y tratamiento de la patología. Entre estas nuevas estrategias se encuentran las enzimas, consideradas como dianas farmacológicas debido a sus funciones catalíticas en numerosos procesos celulares. En el caso de este proyecto investigativo, se estudia la NMNAT como un potencial blanco farmacológico en la leishmaniasis.

2.2 Nicotinamida/Nicotinato Mononucleótido Adenilil Transferasa (NMNAT)

Como ya se mencionó, la NMNAT (EC: 2.7.7.1/18) es una enzima clave en el metabolismo del NAD^+ , puesto que cataliza la conversión del mononucleótido de nicotinamida (NMN) o su forma de mononucleótido de ácido nicotínico (NaMN), en nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) o nicotinato adenina dinucleótido (NaAD), respectivamente (figura 2.3) [18]. La anterior reacción transcurre a través de un ataque nucleofílico del fosfato 5' del mononucleótido al fosfato α del ATP, liberando así el dinucleótido y pirofosfato. Es de resaltar que la reacción es catalizada por la enzima de manera reversible, dado que también presenta actividad NAD^+ pirofosforilasa; sin embargo, fisiológicamente está regulada hacia la síntesis del NAD^+ , principalmente, por la concentración de sustratos [19].

Figura 2.3. Esquema general de la reacción catalizada por la NMNAT [18]



Las NMNATs son proteínas globulares, constituidas generalmente por homo oligómeros de 2 a 6 cadenas polipeptídicas idénticas, con masas moleculares que varían entre 20 y 50kDa; presentan temperaturas óptimas de reacción entre 30 y 37°C, puntos isoeléctricos entre 5 y 6.5 (cálculos teóricos) y un rango óptimo de pH que varía entre 6 y 9. De igual forma, se ha establecido que todas las NMNATs estudiadas, dependen de concentraciones milimolares de iones metálicos divalentes, predominando el uso del Mg^{2+} [20]. A nivel de estructura terciaria presentan el plegamiento tipo Rossmann, motivo estructural de proteínas de unión a nucleótidos, estructura compuesta por tres o más láminas beta paralelas unidas por dos hélices alfa en el orden topológico beta-alfa-beta-alfa-

beta. En cuanto al motivo catalítico y de unión al sustrato, se conoce que el motivo GxFxPx [H/T] xxH se puede encontrar en el N-terminal de los enzimas, al igual que un segundo motivo C-terminal, ISSTxxR que está implicado en la unión del sustrato [21].

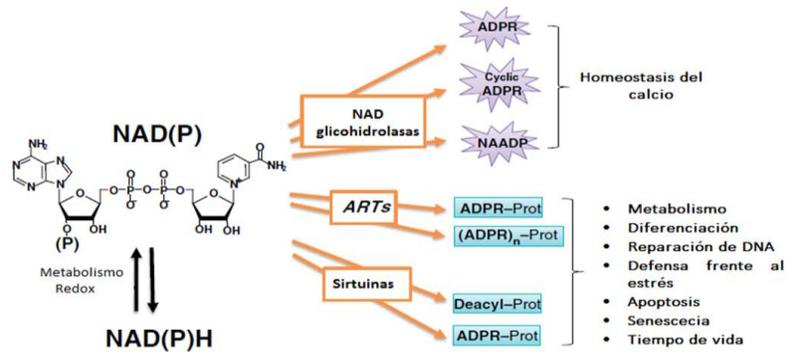
La NMNAT se ha caracterizado cinética y estructuralmente en varios organismos, que van desde archea [12], eubacterias [22], hasta los seres humanos [23]. En los seres humanos, se han identificado tres isoformas conocidas como: hNMNAT-1 (homohexámero) localizada en el núcleo, hNMNAT-2 (homodímero) en el complejo de Golgi y la hNMNAT-3 (homotetrámero) en las mitocondrias; como se observa, estas isoformas presentan diferente distribución tejido específica, localización subcelular, al igual que presentan diferente tamaño lo que sugiere que estas isoenzimas tienen funciones específicas distintivas, y no son únicamente redundantes en su función [9].

2.3 ¿Por qué es importante el estudio del metabolismo del Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida (NAD⁺)?

Al hablar del nucleótido de adenina y nicotinamida se hace una asociación directa con su función como transportador de electrones y co-sustrato de varias reacciones redox, sin embargo, diversas investigaciones han demostrado que este nucleótido de piridina tiene un rol importante en el metabolismo energético, la reparación del ADN y las vías de protección celular, así como las vías de muerte celular [18], [24]. El NAD⁺ y sus derivados, tales como el NADH y NADP(H), son coenzimas esenciales que participan en reacciones celulares tanto del catabolismo como del anabolismo: el NAD(H) participa principalmente en la producción de ATP, mientras que el NADP(H) se utiliza en el anabolismo para modular el estado redox celular [25].

Se conoce que para el mantenimiento de los niveles celulares NAD⁺/NADP⁺, existe una enzima crucial denominada NAD⁺ Quinasa (NADK), la cual cataliza la síntesis de NADP⁺, llevando a cabo la fosforilación del NAD⁺ empleando ATP o un polifosfato inorgánico como grupo fosforil donador [26]. Hay varias enzimas conocidas que emplean el NAD⁺ tanto en su forma reducida como oxidada, al igual que el NADP⁺ para llevar a cabo diferentes funciones celulares (figura 2.4). Entre dichas enzimas encontramos **i)** las mono- y poli ADP ribosiltransferasas (ARTs (EC: 2.4.2.31)) que transfieren el grupo ADP-Ribosa del NAD(P) a proteínas diana, generando una modificación covalente y modulación de su función. El proceso de ADP ribosilación está implicado en una amplia gama de procesos celulares, incluyendo la respuesta al daño del ADN, el mantenimiento de los telómeros, la regulación transcripcional, el control de la respuesta inmune y muerte celular [27], [28]. **ii)** Las NAD⁺ glicohidrolasas (EC: 3.2.2.5), que generan derivados del NAD⁺ como el dinucleótido fosforilado de adenina y ácido nicotínico (NAADP), el ADPR Y ADPR-cíclico, todos ellos con un papel bien reconocido en la señalización de calcio [29]. **iii)** Las sirtuinas (EC: 2.3.1.-), enzimas NAD-dependientes que actúan como desacetilasas de histonas, factores transcripcionales y enzimas metabólicas. Se ha determinado que afectan el metabolismo energético, la proliferación, la reparación del ADN, la apoptosis, la senescencia, la señalización endocrina, y la vida media celular ante diversos tipos de estrés [30].

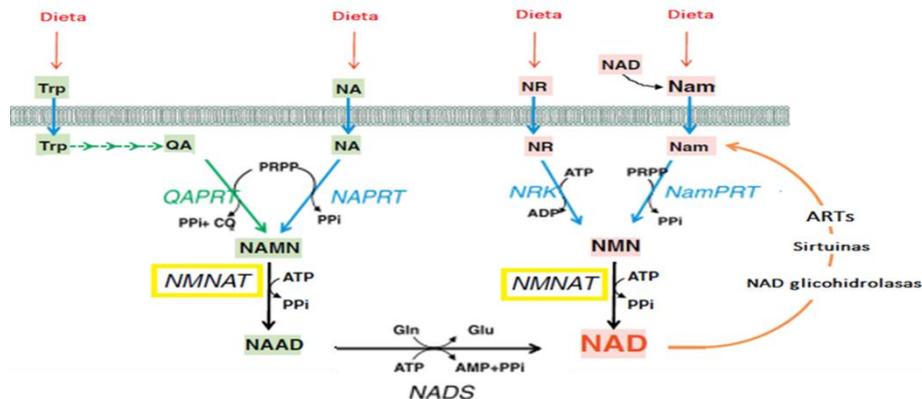
Figura 2.4. Importancia del NAD(P) en el metabolismo redox y la señalización [31].



En cuanto a la biosíntesis del NAD⁺ (figura 2-5), se han identificado ciertas moléculas precursoras, las cuales están presentes en algunas de las dos rutas de síntesis conocidas: la síntesis de *novo* en la cual se utiliza el aminoácido triptófano, en especial para organismos eucariotas, y la vía de reciclaje, en dónde participan metabolitos como la nicotinamida (Nam), el ácido nicotínico (NA) y el ribósido de nicotinamida (NR). Ambas rutas convergen en el punto enzimático catalizado por la **NMNAT**, proteína encargada del paso central en la síntesis del NAD⁺ [19].

En el caso de la síntesis de *novo*, los aminoácidos como precursores son catabolizados enzimáticamente para generar ácido quinolínico (QA), sustrato de la enzima fosforibosil transferasa del QA (QAPRT). Esta enzima cataliza la decarboxilación y fosforibosilación del QA, empleando fosforibosil pirofosfato (PRPP) como co-sustrato para sintetizar el mononucleótido del ácido nicotínico (NAMN). El NA, también puede ser empleada como precursor para obtener NAMN, gracias a la acción de la enzima fosforibosil transferasa del NA (NAPRT). Para la vía de reciclaje, La Nam es modificada por la enzima fosforibosil transferasa de la Nam (NamPRT) para generar el mononucleótido de nicotinamida (NMN). El ribósido de nicotinamida (NR) y el ribósido del ácido nicotínico (NAR) son dos precursores adicionales que, al ser fosforilados por enzimas quinasas (NRK), generan NMN y NAMN, respectivamente [13].

Figura 2.5. Representación de la biosíntesis de NAD⁺ por la vía de *novo* y la vía de reciclaje [31]. Tanto los precursores de la vía de reciclaje, como el quinolinato (QA), producto de la degradación del triptófano, son transferidos al fosforibosil pirofosfato por fosforibosil transferasas específicas que producen el NMN o el NaMN. Adicionalmente, el ribósido de nicotinamida puede ser fosforilado para dar lugar al NMN. Estas moléculas son convertidas en los correspondientes dinucleótidos por una reacción de adenilación catalizada por la NMNAT [31].



2.4 Metabolismo del NAD⁺ en *Leishmania*

Las rutas metabólicas son claves para la supervivencia y desarrollo de los organismos patogénicos a lo largo de todo su ciclo de vida, por lo que dichos procesos son dependientes de moléculas ricas energéticamente como es el caso del NAD⁺. En *Leishmania*, este metabolito participa en varios procesos bioquímicos y fisiológicos, pues resulta primordial para el correcto desarrollo, proliferación y supervivencia del parásito [32], participa en el control del fenómeno apoptótico del protozoo [33], y le ayuda en la protección contra radicales libres mediante un balance redox intracelular [34].

En estos parásitos intervienen proteínas pertenecientes a la familia HST (por Homologous of Sir Two), las cuales utilizan el NAD⁺ como sustrato para catalizar reacciones de deacetilación de proteínas. Previa investigación han reportado la existencia de HSTs en *Leishmania major* (LmSIR2) [35] y *Leishmania infantum* (LiSIR2) [36], proteínas que se distribuyen citoplasmáticamente a lo largo del ciclo de vida del parásito. Sin embargo, y a pesar que se ha estudiado los procesos bioquímicos y fisiológicos en los que participa el NAD⁺ en parásitos intracelulares como *Leishmania*, no se ha identificado a plenitud la maquinaria enzimática involucrada en dichos procesos, por lo que es necesario incursionar en el estudio de estas proteínas, como es el caso de la NMNAT.

2.5 Estudio de mutantes de la NMNAT

El estudio de mutantes es una herramienta clave para la comprensión de procesos biológicos importantes. Investigadores como Brunetti *et al.* [37] mediante la creación de mutantes delecionales lograron estudiar el dominio central de la hNMNAT-2, postulando que dicha región puede ser prescindible para la actividad catalítica, de hecho, confirmaron experimentalmente que la eliminación de fragmentos de longitud diferente de este dominio central no comprometía la actividad catalítica de la enzima o la estructura tridimensional global del sitio activo, sin embargo, sí establecieron que representa un dominio de control isoenzima-específica dentro de la arquitectura general de la hNMNAT2.

Por otro lado, análisis realizados por Lau, C. *et al.* [38] han demostrado que los tres genes para las NMNATs humanas contienen exones que codifican isoformas de inserciones únicas de secuencias específicas, denominadas ISTIDs (Isoform Specific Targeting and Interaction Domains) que se vinculan en la localización subcelular, en funciones regulatorias y como sitios de modificaciones postraduccionales. La presencia de ISTIDs en regiones catalíticas, los ubican como mediadores de funciones reguladoras. Por ejemplo el ISTID de la hNMNAT1 participa en la regulación de la actividad de PARP1 en el núcleo [39], y la palmitoilación transitoria del ISTID2 puede tener un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis citosólica del NAD⁺ mediante el control del estado activo de hNMNAT2. La identificación de ISTIDs como unidades funcionales en las NMNATs de mamíferos, proporciona una base molecular para funciones importantes no catalíticas. Por tanto, es válido plantear que la creación de mutantes delecionales de la NMNAT de *L. braziliensis*, servirán para determinar la importancia de sus inserciones exclusivas.

2.6 Interacciones proteína-proteína: métodos experimentales y métodos bioinformáticos

Las interacciones proteína-proteína son eventos críticos para muchos procesos celulares que se extienden desde la formación de estructuras macromoleculares y complejos enzimáticos, hasta la regulación y la transducción de señales. Se ha revelado que más del 80% de las proteínas no trabajan solas sino en complejos, por lo que comprender estas interacciones en detalle, permite inferir la función de las proteínas dentro de la célula, pues la funcionalidad de las proteínas no identificadas se puede predecir con evidencia de su interacción con una proteína cuya función ya está revelada. El conocimiento de interacciones entre proteínas también da información útil sobre el mecanismo molecular del funcionamiento celular, y ayuda en el diseño de fármacos más específicos [40] [41].

A nivel experimental, los métodos para detectar interacciones entre las proteínas presentan diferencias en resolución y pueden clasificarse en cuatro categorías [40]. La primera categoría comprende el análisis atómico, donde la interacción es detectada por métodos muy sensibles como la difracción de rayos-X (DRX) que aporta información específica sobre los átomos y residuos que participan en la interacción. La segunda categoría agrupa los métodos que detectan la interacción de forma directa, por ejemplo, experimentos de doble-híbrido. La tercera categoría agrupa métodos de detección de complejos mediante técnicas de inmunoprecipitación o de espectrometría de masas, los cuales se manejan en este trabajo. Y en la cuarta categoría encontramos bioensayos realizados a escala celular, por ejemplo, la proliferación celular estimulada por la interacción ligando-receptor.

A nivel teórico, conocemos que el rápido avance y mejoramiento de las tecnologías proteómicas, incluyendo el desarrollo de la espectrometría de masas, están dando como resultado un amplio conjunto de información acerca del comportamiento de las proteínas durante los procesos celulares. Para la búsqueda, extracción automatizada y análisis de los datos, especialmente para interpretar y predecir funciones de proteínas en rutas intracelulares, existen herramientas como el análisis de redes [42].

El análisis de redes direccionado específicamente al estudio de interacciones de proteínas, se debe principalmente a que gran parte de los mecanismos fundamentales de casi todos los procesos biológicos están relacionados con interacciones proteína-proteína, es por ello, que se requiere la caracterización de todas las posibles interacciones que unen las proteínas identificadas en dichos procesos [42]. La generación de estas redes de interacción de proteínas (PIN), mejora claramente la interpretación de los datos proteómicos, en particular respecto a los análisis estadísticos [43]. Existen múltiples aproximaciones y paquetes de software comerciales disponibles para el estudio de interacciones hipotéticas proteína-proteína [44], [45]. La mayoría de ellas se representan como un gráfico donde las proteínas son los nodos y las interacciones las conexiones. De acuerdo con la teoría de redes complejas, las PIN son redes de escala libre, que se caracterizan por un grado de distribución que sigue la ley de potencias [42].

Las PIN generadas pueden contener relaciones "directas" y/o "indirectas" de proteínas. Interacciones directas se definen como aquellas en las que dos proteínas hacen contacto físico directo entre sí, sin paso intermedio. Estas interacciones pueden incluir modificaciones químicas, por ejemplo

fosforilaciones. Las interacciones indirectas se definen como una relación entre dos proteínas donde no hay contacto físico, por ejemplo, donde la expresión de una proteína puede aumentar la expresión de otra [42].

Una de las aplicaciones de las PIN es el estudio de la biología de organismos patógenos humanos como los parásitos protozoarios *Leishmania spp*, *Plasmodium spp*, y *Trypanosoma spp*, que requieren el continuo descubrimiento de blancos y dianas farmacológicas, pues es común encontrar en función del tiempo, resistencia a los medicamentos. La identificación de blancos farmacológicos es el primer paso en el desarrollo de tratamientos. Este paso es complicado debido a que los medicamentos deben satisfacer una variedad de criterios [46]. Principalmente, deben cumplir dos requisitos; (1) ser esencial para la supervivencia del parásito y (2) ser específico y no dar lugar a efectos tóxicos para el hospedero humano [47]. Por lo tanto, el análisis topológico y funcional de las PIN en patógenos de enfermedades humanas ofrece una estrategia potencialmente efectiva para identificar y priorizar nuevos objetivos farmacológicos [46].

3. Antecedentes

3.1 Estudio de la NMNAT en *Leishmania braziliensis*

Nuestro laboratorio de investigación, se ha enfocado en el estudio de enzimas claves en el metabolismo del NAD⁺ de los parásitos *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania braziliensis*. En el caso de este último, se demostró la existencia y expresión de la NMNAT en la fase móvil del parásito, mediante análisis bioinformáticos y herramientas bioquímicas y moleculares [48].

La NMNAT de *L. braziliensis* fue clonada y expresada en *Escherichia coli*, permitiendo así su sobre-expresión y posterior purificación, dando paso a la determinación de sus propiedades catalíticas a través de ensayos enzimáticos acoplados y directos. Por otro lado, se llevó a cabo la producción de anticuerpos policlonales (anti-LbNMNAT) en modelos murinos y aviares convirtiéndose en herramientas importantes en ensayos de localización subcelular, en los cuales se ha revelado una distribución citoplasmática de la enzima en el parásito [13].

A través de procedimientos bioinformáticos como modelamiento predictivo de proteínas, búsquedas cruzadas mediante blastp y blastn y alineamientos múltiples entre la estructura primaria de las NMNATs de diferentes especies del género *Leishmania* y las tres isoformas humanas, se hallaron regiones exclusivas y conservadas en los extremos amino y carboxilo terminales de las proteínas de los parásitos. Experimentalmente, se encontró una inserción amino terminal *Leishmania* específica en la NMNAT, cuya eliminación genera pérdida de la actividad enzimática de la proteína recombinante [49].

4. Preguntas de investigación

Teniendo en cuenta las investigaciones y estudios previos desarrollados sobre la NMNAT de *Leishmania braziliensis* [13], [48], [49], y en busca de continuar con la caracterización estructural de la enzima y su interacción con otras proteínas, se plantean para este trabajo, las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Las diferencias estructurales de la LbNMNAT con respecto a los ortólogos humanos puede relacionarse con mecanismos de regulación enzimática y/o localización intracelular?
- ¿Hay proteínas que presentan interacciones con la NMNAT de *Leishmania braziliensis*?
¿Cuáles y qué tipo de interacción presentan?

5. Objetivos

5.1 General

Estudiar estructural y funcionalmente la NMNAT de *Leishmania braziliensis*, mediante el análisis de secuencias específicas y potenciales interacciones con otras proteínas.

5.2 Específicos

- Evaluar a nivel de proteína recombinante, la participación de las inserciones exclusivas de la LbNMNAT en su actividad enzimática, mediante el diseño y estudio de mutantes.
- Estudiar *in vivo* el efecto de modificaciones estructurales exclusivas de la LbNMNAT en la localización subcelular, empleando parásitos transgénicos.
- Explorar experimentalmente posibles interacciones de la LbNMNAT con otras proteínas, utilizando técnicas de inmunoprecipitación y espectrometría de masas.
- Identificar posibles interacciones de la LbNMNAT con otras proteínas implementando análisis de redes.

6. Materiales y métodos

La estrategia metodológica esta direccionada, en primera instancia, hacia la creación de mutantes delecionales de la NMNAT de *L. braziliensis*, como herramienta clave para determinar la función de regiones específicas en la actividad enzimática (ensayos *in vitro*) y la localización intracelular en el parásito (ensayos *in vivo*). Para estas versiones de la enzima, se realizaron estudios bioinformáticos y la creación de los respectivos vectores de expresión, con el objeto de obtener, purificar y evaluar la actividad enzimática de las proteínas mutadas. Por otro lado, para el estudio de la función contextual de la LbNMNAT se hizo un análisis combinado de datos experimentales obtenidos de técnicas de co-inmunoprecipitación y espectrometría de masas, con datos de Interacciones proteína-proteína obtenidos a partir de bases de datos y métodos teóricos de predicción (redes de interacción).

A continuación, se describe la metodología implementada para estos dos componentes, divididos en dos capítulos:

CAPÍTULO 1

6.1 Evaluar a nivel de proteína recombinante, la participación de las inserciones exclusivas de la LbNMNAT en su actividad enzimática, mediante el diseño y estudio de mutantes.

- Estudio de mutantes delecionales de la NMNAT de *Leishmania braziliensis*: Para abordar este objetivo se realizaron acercamientos computacionales y experimentales. En el primero, se emplearon herramientas bioinformáticas útiles para la identificación de inserciones específicas en la proteína del parásito con respecto a las homólogas humanas, así como para el análisis de los diferentes niveles estructurales de las proteínas. En el caso experimental, para estudiar el significado funcional de algunas de las regiones específicas encontradas *in silico*, se usaron técnicas tanto de biología molecular como de bioquímica que permitieron obtener proteínas recombinantes de las versiones delecionales 6xHis- Δ_{8-42} LbNMNAT y 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT, y además, permitieron continuar con el estudio de la proteína 6xHis- $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT obtenida en un trabajo anterior [13].

6.1.1. Acercamiento computacional

6.1.1.1. Comparación de secuencias de la proteína LbNMNAT con las isoenzimas humanas.

Para la comparación, a nivel de estructura primaria, de las secuencias de las NMNATs de *Homo sapiens* y especies del género *Leishmania*, se realizó un alineamiento múltiple con los algoritmos ClustalW y Muscle incorporados en el programa CLC Sequence Viewer 7.8.1 (QIAGEN), se contrastaron las secuencias de las tres isoenzimas humanas (códigos de acceso en NCBI: NP_001284707.1, NP_055854.1 y NP_001307440.1), con las secuencias de las NMNATs hipotéticas de las especies *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *L. donovani* y *L. mexicana* (códigos

de acceso en NCBI: XP_001563913.1, XP_001464802.1, XP_001682392.1, XP_003860000.1, XP_003874000.1, respectivamente). Adicionalmente, se localizaron los residuos del motivo de unión a ATP.

6.1.1.2. Predicción de estructura secundaria, características fisicoquímicas y modificaciones postraduccionales.

Los análisis bioinformáticos para la LbNMNAT se basaron en la secuencia CAM37960.1 (código de acceso en el GenBank). La determinación de los parámetros fisicoquímicos se realizó empleando la herramienta bioinformática ProtParam [50] disponible en el servidor ExPASy [51] (<http://web.expasy.org/protparam/>). Para la búsqueda de posibles modificaciones postraduccionales como fosforilación, se empleó la herramienta bioinformática NetPhos 3.0 [52]. Para la predicción de estructura secundaria se utilizaron las herramientas GOR-IV [53], PHD [54] y PREDATOR [55], disponibles en el servidor Network Protein Sequence Analysis (NPS@)[56]. De igual forma, para predecir puentes disulfuros se usó el programa Dipro presente en el servidor SCRATCH Protein Predictor (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) [57].

6.1.1.3. Predicción de estructura 3D, validación de modelos y superposición estructural

Los modelos estructurales predictivos se generaron empleando los servidores I-TASSER [58] (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) y ROSETTA [59], (<http://rosetta.bakerlab.org/>). Se minimizaron energéticamente utilizando el servidor de refinamiento de estructura de proteínas 3D Refine [60], y se validaron con el plot Ramachandran en el servidor RAMPAGE [61]. La visualización y superposición de los modelos se efectuó con el programa UCSF Chimera versión 1.11.2 [62].

6.1.2. Acercamiento experimental

6.1.2.1. Obtención del vector pQE30- Δ_{8-42} LbNMNAT mediante mutagénesis dirigida.

El vector pQE30- Δ_{8-42} LbNMNAT fue generado por la técnica de mutagénesis dirigida mediante PCR, empleando el kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). En esta estrategia, los cebadores diseñados (Directo: 5' CCG GTC GTT CTC GTC ATC TGC GGC AGT 3'. Reverso: 5' - GGC AGC AGT AGA GGA TAA CAT GCA TGC -3'), se ubican a ambos lados del sitio de la deleción, de manera que la región delimitada no está incluida en el amplicón (anexo 1). El mutante fue construido a partir del plásmido recombinante pQE30-LbNMNAT [49], un vector con promotor T5, diseñado para la expresión de la proteína recombinante 6xHis-LbNMNAT; este vector permite la inmunodetección y purificación de la proteína mediante protocolos de cromatografía de afinidad a metales, dado que la

recombinante se expresa fusionada a una etiqueta de seis histidinas en su extremo amino terminal.

La reacción de PCR se realizó con 1,0 μ L de la enzima PfuUltra High-Fidelity (2.5 U/ μ L) a un volumen final de 50 μ L; se empleó 50 ng de DNA plantilla y una concentración final de cada uno de los cebadores de 125 ng. El perfil térmico tuvo un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 30 s, seguido de 18 ciclos con tiempos y temperaturas de desnaturalización, anillaje y extensión de 95°C (30 s), 55°C (1 min) y 68°C (3.5 min), respectivamente. La amplificación fue seguida mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TBE 0.5X (44.5 mM Tris, 44.5 mM Borato, 0.025 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) y tinción con bromuro de etidio 0.05% (v/v). A 45 μ L de reacción de amplificación se adicionó 1,0 μ L de la enzima de restricción DpnI (10 U/ μ L) y se incubó a 37°C por una hora con el fin de digerir el ADN parental. Posteriormente, células químicamente competentes XL1-Blue fueron transformadas con 5 μ L de reacción mediante choque térmico [63] e incubadas por 16 h a 37°C. Los clones resultantes se seleccionaron sobre medio sólido Luria Bertani (LB) suplementados con 100 μ g/ml de ampicilina, 80 μ g/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo- β -D-galactopiranosido (X-gal) y 10 mM de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido).

La identificación de colonias transformadas con el nuevo plásmido recombinante se realizó mediante PCR de colonia. En este caso, se emplearon los cebadores diseñados para la amplificación del gen de la LbNMNAT (Directo: 5' GCGGGGATCCATGTTATCCTCTACTGC 3'. Reverso: 5' GCGGGGTACCTCAGGACGGAAGCCCCTCTCC 3') bajo las condiciones establecidas por Contreras L, E. [13].

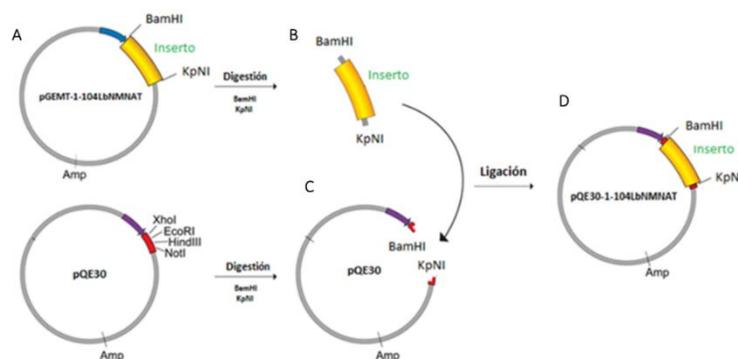
6.1.2.2. Extracción e identificación del vector pQE30- Δ_{8-42} LbNMNAT mediante PCR y digestión enzimática con KpnI y BamHI

El vector de interés presente en las colonias evaluadas, fue extraído mediante lisis alcalina [64]. Para ello, un inóculo bacteriano en 10 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL) fue incubado durante 12 h a 37°C, con agitación constante. Las células fueron obtenidas por centrifugación a 6000 rpm por 10 min (centrífuga Heraeus Megafuge 16R de Thermo) y resuspendidas en 300 μ L de una solución de glucosa 50 mM, Tris-HCl 25mM, EDTA 10 mM pH 8.0, posteriormente, se adicionó 300 μ L de solución de lisis (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y 300 μ L de solución de neutralización (acetato de potasio 3 M pH 4.8). La mezcla obtenida se centrifugó a 10000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue tratado con 2 μ L RNAsa (10mg/mL) e incubado por 30 min a 37°C. Seguidamente, se adicionó un volumen de mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se incubó a 4°C por 10 min y se centrifugó a 11000 rpm por 5 min. Al sobrenadante se adicionó 2,5 volúmenes de etanol (96%) frío y un décimo del volumen de acetato de sodio (3 M; pH: 5,2). La mezcla se incubó por 2 h a -80°C. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó 10 min a 12000 rpm a 4°C. Al precipitado se le realizó dos lavados con 1.0 mL de etanol (96%). De nuevo se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y el precipitado se secó a 37°C por 10min. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 μ L agua DEPC (dietil pirocarbonato).

El producto de la extracción se evaluó por PCR empleando *Taq polimerasa*, bajo las condiciones de amplificación citadas anteriormente. Adicionalmente, el vector (200ng) fue sometido a digestión enzimática por 16 h a 37°C con las enzimas KpnI (3U; Fermentas) y BamHI (1U; Fermentas), en buffer 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.02% Triton X-100 y 0.1 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA). Tanto el amplificado como los productos de digestión se siguieron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,0 % (p/v) en buffer TBE 0,5X y tinción con bromuro de etidio 0.05% (v/v).

6.1.2.3 Obtención del vector pQE30 Δ_{1-104} LbNMNAT mediante sub-clonación. Este mutante amino terminal fue generado por la técnica de sub-clonación (figura 6.1), cuya fase inicial implica la clonación en un vector TA, del cual se libera la secuencia de interés y se traslada a un vector de destino.

Figura 6.1. Técnica de sub-clonación para el vector pQE30- Δ_{1-104} LbNMNAT. A. El inserto Δ_{1-104} lbnmnat es clonado en el vector pGEMT-easy. B. Mediante corte con enzimas de restricción (BamHI y KpnI) se libera la secuencia de interés. C. las mismas enzimas son usadas para digerir el vector pQE30. D. Se liga el inserto con el vector de expresión.



El fragmento Δ_{1-104} lbnmnat fue amplificado mediante PCR utilizando como plantilla ADN genómico. La reacción se realizó con 2,5 U de *taq polimerasa*, 2,5 mM de MgSO₄ y 0.2 μ M de cada uno de los cebadores diseñados (directo: 5' GCGGGGATCCATGGAGAAGGCACTTTGTAC 3'; reverso: 5' GCGGGGTACCTCAGGACGGAAGCCCCTCTCC 3'). El perfil térmico presentó un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 2min y 30 ciclos de desnaturalización a 94°C (15 s), anillaje a 56°C (30 s) y extensión a 72°C (1 min). La extensión final se realizó durante 7 min a 72°C. El producto de amplificación (~632pb) se separó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) utilizando buffer TBE 0.5 X, en tinción con bromuro de etidio 0.05% (v/v). El producto se ligó con el plásmido de clonación pGEMT-Easy (Promega) a una razón molar entre el producto y el plásmido (3:1). La reacción de ligación se utilizó para transformar mediante choque térmico células de mantenimiento *E. coli* TOP10, químicamente competentes [63]. Los clones resultantes se seleccionaron sobre medios sólidos LB suplementados con 100 μ g/ml de ampicilina, 80 μ g/ml de X-gal y 0.5mM de IPTG y se rastrearon mediante PCR (condiciones descritas anteriormente). A las colonias positivas se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina [64].

Como paso seguido, los vectores pGEMT- Δ 1-104LbNMNAT y pQE30 se sometieron a ensayos de doble digestión con las enzimas BamHI y KpnI (Fermentas) en un tiempo de 16h a 37°C. Los productos obtenidos se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (p/v) utilizando buffer TAE1X (40 mM Tris Acetato, 1 mM EDTA), con tinciones de bromuro de etidio 0.05% (v/v). A partir de estos geles, el fragmento de interés y el vector pQE30 se purificaron mediante el método de filtración (montaje DNA Gel Extraction Kit, Millipore).

Posteriormente, estos productos se ligaron durante 12 h a 22°C empleando la enzima T4 ligasa (Promega). La reacción se empleó para transformar mediante choque térmico células *E. coli* JM109 químicamente competentes. Los clones se seleccionaron sobre medios sólidos LB suplementados con 100 μ g/ml de ampicilina. Las colonias positivas se identificaron mediante PCR. El vector se extrajo por lisis alcalina y se comprobó la identidad del mismo mediante PCR y ensayos de doble digestión con las enzimas BamHI y KpnI (Fermentas) en un tiempo de 16 h a 37°C. Los productos obtenidos se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (p/v) utilizando buffer TBE 0.5X.

6.1.2.4 Expresión de la proteína recombinante 6xHis- Δ 1-104LbNMNAT.

Las cepas de expresión *Escherichia coli* BL21 (DE3) y SHuffle T7 Express (New England Biolabs) fueron transformadas mediante choque térmico [63], con el plásmido pQE30- Δ 1-104LbNMNAT construido previamente (sección 6.1.2.3). Un volumen de 200 mL de medio líquido LB fue inoculado con bacterias transformadas hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600nm}) de \sim 0.65, en ese momento, se adicionó el inductor IPTG en una concentración final de 1,0 mM. El inóculo se incubó a 24°C durante toda la noche con agitación constante. Este cultivo se centrifugó a 4000 g por 10 min a 4°C. El pellet de células obtenido fue resuspendido en buffer de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 15 mM pH 7.5), en presencia de coctel de inhibidores de proteasas 1:300 (sigma) y lisozima (Thermo) a una concentración final de 1mg/mL e incubando a 4°C por 45min. Posteriormente, la muestra fue sometida a sonicación (pulsos de 15 s con pausas de 15 s y amplitud del 50%) durante 5 min, empleando el equipo Ultrasonic Processor, VCX130, 130 Watt, con sonda de 6 mm de diámetro. El paso final fue la centrifugación a 10000 g por 20 min a 4°C para separar el sobrenadante y el precipitado (fracción insoluble y soluble, respectivamente). En el caso del proceso de estandarización de las condiciones de expresión, con la cepa *E. coli* SHuffle se realizó la inducción de la proteína a diferentes concentraciones de inductor (0.5 y 1mM), diferentes temperaturas de inducción (20° y 25°C) y de manera adicional como agentes estabilizadores del plegamiento, se adicionó en el cultivo glicerol (0.6M) y etanol al 3% [65].

6.1.2.5 Detección de la recombinante 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT

La proteína fusión 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT (Proteínas totales y fracciones solubles e insolubles) se observaron por SDS-PAGE y western blot [63]. Para la electroforesis se usaron geles discontinuos al 12% y se corrieron a una diferencia de potencial de 100 V por 2h. Se empleó buffer de carga 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, Glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v) y β -mercaptoetanol 100 mM). Para la visualización de las bandas se utilizó azul de Coomassie 0,25% (p/v) en ácido acético: metanol: H₂O (50:33:1).

Para el western blot, se efectuó una electrotransferencia a una membrana de PVDF (floruro de polivinilideno) con un tamaño de poro de 0.45 μ m (Merck) a 200 mA por 2h en buffer de transferencia (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 M glicina, 10% (v/v) metanol). La membrana se bloqueó por 2 h en buffer TBS-T leche descremada 5% (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20). Se realizaron tres lavados con TBS-T cada uno por 10 min.

La inmunodetección de la proteína recombinante se realizó con el anticuerpo primario anti-6xHis (1:5000) (Abcam) y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a biotina (1:10000) (Sigma). La detección cromogénica de los complejos inmunológicos se realizó con estreptavidina A conjugada a fosfatasa alcalina (1:3000) (Promega) y los sustratos nitro-azul de tetrazolio (NBT) (50 mg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3'-indoilfosfato (BCIP) (50 mg/ml) (Promega) en buffer sustrato (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂). La detección inmunológica se detuvo con agua destilada al evidenciar productos coloreados sobre la membrana [13].

6.1.2.6 Purificación de la proteína recombinante 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC).

La purificación se realizó por medio de cromatografía de afinidad a níquel, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Quiagen). El extracto soluble obtenido después de la lisis celular se incubó 1 h sobre hielo, en agitación constante con la resina Ni-NTA (Ácido nitrilotriacético) previamente equilibrada con buffer de diálisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 15 mM, pH 7.5), por cada mL de fracción soluble a purificar se tomó 100 μ l de resina. Para recolectar las proteínas no unidas se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se realizaron lavados hasta alcanzar una OD_{280nm} cercana a cero con buffers suplementados con concentraciones crecientes de imidazol (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500mM e imidazol 35 mM y 75 mM, pH 8.0). Finalmente, se realizaron eluciones aumentando la concentración de Imidazol a 300 mM. La purificación se observó mediante SDS-PAGE 12% (según sección 6.1.2.5) y la cuantificación de los eluidos se efectuó con el método de Bradford midiendo espectrofotométricamente a 595 nm [66] usando BSA como patrón.

Para efectuar ensayos posteriores de actividad enzimática de la recombinante, fue necesario someter los eluidos a diálisis durante 12 h a 4°C, empleando una membrana con peso molecular nominal límite (MWCO, Molecular Weight Cut-Off) de 10kDa, con agitación

constante contra 500 mL de buffer de lisis. Se realizó un recambio del buffer (300 mL) cada dos durante otras 6 horas.

6.1.2.7 Estandarización de las condiciones óptimas de solubilización de la proteína recombinante 6xHis- $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT

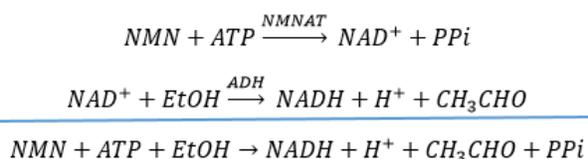
En un trabajo previo desarrollado por Contreras L. E. [13], se construyó el vector pQE30- $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT; plásmido que permitió la expresión de la proteína recombinante en diferentes sistemas bacterianos. Sin embargo, no se pudo llevar a cabo la evaluación del efecto deletional de la secuencia exclusiva de la proteína recombinante sobre su actividad enzimática, dado que no se logró la obtención de la misma de manera soluble. En este trabajo se retoma este estudio con el fin de solubilizar la proteína y evaluar su actividad enzimática. Para ello, se efectuó la siguiente metodología, en donde se hace uso de una cepa diferente de expresión y se somete el cultivo a diferentes temperaturas de inducción.

Células químicamente competentes de *Escherichia coli* SHuffle T7 Express (New England Biolabs) fueron transformadas mediante choque térmico [63] con el vector pQE30- $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT. Las condiciones de inducción y lisis celular fueron realizadas como se describen en el numeral 6.1.2.4. Se evaluó el efecto de la temperatura de inducción, por lo que a una concentración de inductor de 1.0 mM de IPTG y a un tiempo de inducción de 16h, se sometieron los cultivos bacterianos a temperaturas de 16, 25 y 37°C. La expresión y detección de la proteína fusión se realizó por SDS-PAGE 12% y mediante western blot (metodología descrita en 6.2.1.5).

- **Ensayos enzimáticos de las proteínas deletionales de la NMNAT de *L. braziliensis*.** La evaluación de la actividad enzimática de las proteínas recombinantes se llevó a cabo mediante dos metodologías: por un ensayo acoplado con medida indirecta de la actividad y por ensayo directo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). A continuación, se describe de manera detallada los métodos:

6.1.2.8 Evaluación de la actividad enzimática de las proteínas recombinantes mediante ensayos acoplados.

La actividad enzimática de las proteínas se determinó a través de un ensayo espectrofotométrico acoplado, basado en la reducción del NAD⁺ por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). En este ensayo la actividad de la enzima se mide con el incremento en la absorbancia a 340 nm, debido a la reducción del NAD⁺ a NADH, según muestra las siguientes reacciones [67].



Para llevar a cabo estas reacciones, se realizó una mezcla inicial que contenía 40 mM etanol, 25 mM buffer HEPES-KOH pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 2 mM de NMN (Sigma), 0.2 U de ADH (Sigma) y 2.5 µg de las muestras a evaluar. La reacción se inició al adicionar 1,0 mM de ATP (Sigma) registrando los valores de absorbancia cada 10 s a 340 nm durante 30 min. Las medidas se realizaron en el espectrofotómetro Jenway 7315.

6.1.2.9 Evaluación de la actividad enzimática de la NMNAT mediante ensayos directos.

En los ensayos directos, la síntesis de NAD⁺ por parte de la enzima a evaluar se analiza mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC), cuantificando los productos de la siguiente reacción:



En este caso, la enzima se incubó a 37°C durante 30 min, con una mezcla de reacción que contenía 40 mM HEPES pH 7.8, 10 mM MgCl₂ y 1.25 mM ATP. La reacción fue detenida con HClO₄ 1.2 M y se neutralizó con K₂CO₃ 1M. El dinucleótido obtenido como producto de la reacción se analizó mediante RP-HPLC, empleando el cromatógrafo Agilent 1200 Series y una columna en fase reversa C18 (100 cm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula, Phenomenex), a temperatura ambiente con un flujo de 1.0 ml/min, aplicando el buffer A (10 mM de NaH₂PO₄ pH 6.0) y buffer B (metanol), en el siguiente gradiente de elución: 2 min de buffer A (100%), 4 min de buffer A:B (80%-20%), 11 min de buffer A:B (75%:25%) y 10 min de buffer B (100%). La absorbancia de los analitos fue monitoreada a 260 nm.

6.2 Estudiar *in vivo* el efecto de modificaciones estructurales exclusivas de la LbNMNAT en la localización sub-celular, empleando parásitos transgénicos.

Con el propósito de conocer si la inserción presente en el extremo amino terminal de la enzima LbNMNAT es determinante en la localización intracelular, se buscó la expresión de la proteína delecionada en el parásito (en su fase móvil) para determinar los patrones de distribución subcelular, mediante técnicas de transfección e inmunofluorescencia. Para sobre expresar el mutante en el parásito, se hizo uso del vector de expresión para *Leishmania* pSP72RαneoαGFP, un vector que presenta un fragmento de 1,2 kb que contiene el promotor ribosomal de *L. braziliensis* y que permite la expresión de la proteína de interés fusionada a una etiqueta de GFP en el extremo carboxilo terminal [68], la cual se aprovecha para visualizar los patrones de localización mediante fluorescencia.

6.2.1 Construcción del vector pSP72Rαneoα-Δ₁₋₄₃LbNMNAT-GFP

El fragmento Δ₁₋₄₃lbnmnat fue amplificado mediante PCR, empleando como plantilla el plásmido pSP72RαneoαLbNMNAT-GFP [13] en una concentración final de 3,0 ng/µL. La

reacción se realizó con 2,5 U de *taq polimerasa*, 2,5 mM de MgSO₄ y 0,2 μM de los cebadores diseñados (directo: 5'-GGCTCTAGAATGGTCGTTCTCGTCATCTGC-3' y reverso:-5' GGCTCTAGAGGACGGAAGCCCCTC-3'). En este caso, se empleó la técnica de subclonación, por lo que se siguió el protocolo de amplificación, purificación y ligación del producto con el plásmido pGEMT-Easy como se describió en la sección 6.1.2.3. Para la liberación del fragmento Δ₁₋₄₃LbNmnat desde el plásmido pGEMT, se utilizó la endonucleasa XbaI (0,25 U; Fermentas), con un tiempo de digestión de 16 h a 37°C. Con la enzima T4 ligasa, se unió el fragmento obtenido con el vector de expresión pSP72RaneαGFP [69] previamente digerido con la enzima XbaI y sometido a procesos de defosforilación con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternero CIAP (Promega), atendiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de los clones se realizó mediante PCR de colonia y la identidad del plásmido recombinante se verificó por análisis de restricción y PCR.

6.2.2 Cultivo de promastigotes de *Leishmania braziliensis*

El cultivo celular se realizó con promastigotes de *Leishmania braziliensis* (M2904 MHOM/BR/75M2904), cultivados en medio Schneider pH 7.4 (Sigma) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (v/v) a una temperatura de 26°C, en flasks de 25 cm² (T25), sin agitación. Cada vez que el cultivo llegó a la fase de crecimiento estacionaria de los parásitos, se diluyó a una concentración inicial de 1 x 10⁶ células/mL [70].

6.2.3 Transfección de promastigotes de *Leishmania braziliensis*

Para la transfección de los parásitos se empleó el vector previamente construido (sección 6.2.1) que expresa la versión delecional Δ₁₋₄₃LbNMNAT-GFP. Se siguió un protocolo de electroporación previamente estandarizado [68]. Los parásitos provenientes de 10 mL de cultivo confluyente se lavaron con 3 mL de Cytomix (25 mM HEPES pH 7.6, 120 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0.15 mM CaCl₂) frío, centrifugando a 1000 gravedades durante 10 min a 4°C. El precipitado de parásitos se resuspendió en 1 ml de Cytomix, de los cuales se transfirieron 450 μl a celdas de electroporación de 4 mm conteniendo 25 μg del plásmido recombinante. La celda se incubó sobre hielo durante 10 min y se aplicaron 3 pulsos de 1600 V, 25 μF de capacitancia y resistencia infinita dejando intervalos de 20 s entre los pulsos. Las células electroporadas se incubaron 24 h a 26°C en un volumen final de 5 ml de medio Schneider suplementado con SFB 20% (v/v). Luego, se adicionaron 5 ml adicionales del medio mencionado suplementado con 120 μg/ml de geneticina G418 (Gibco-BRL). Los cultivos se monitorearon diariamente al microscopio. 15 días después se observaron parásitos vivos, los cuales se continuaron cultivando en medio Schneider suplementado con SFB 10% (v/v) y 60 μg/ml G418 [13].

Los parásitos transgénicos cultivados, fueron empleados en los ensayos de inmunodetección (western blot empleando anticuerpos anti-GFP) y microscopía de fluorescencia.

CAPITULO 2

- Interacciones proteína-proteína de la LbNMNAT: A continuación, se describe la metodología de dos de los objetivos planteados anteriormente, los cuales tienen como fin identificar posibles interacciones de la LbNMNAT con otras proteínas. Para ello, se abordaron dos estrategias complementarias que aportan un conocimiento tanto experimental como bioinformático.

6.3 Explorar experimentalmente posibles interacciones de la LbNMNAT con otras proteínas, utilizando técnicas de inmunoprecipitación y espectrometría de masas.

Entre los métodos experimentales disponibles para detectar interacciones entre proteínas, en este estudio se plantea el uso de métodos de detección de complejos mediante técnicas de co-inmunoprecipitación y de espectrometría de masas (MS). La co-inmunoprecipitación es una técnica para capturar indirectamente proteínas que están unidas a una proteína diana específica; aquí el antígeno proteico es precipitado de una solución usando un anticuerpo que se une específicamente a esa proteína. Para el análisis del complejo proteico, se usa la MS, que es un poderoso método para estudiar las interacciones macromoleculares *in vitro*. El principio del método es producir iones que pueden ser detectados con base en la relación masa/carga, lo que permite la identificación de secuencias polipeptídicas [71]. A continuación, se describe la metodología desarrollada para cumplir con este objetivo:

6.3.1 Preparación de extracto de proteínas.

Se trabajaron dos líneas celulares: parásitos transgénicos de *Leishmania braziliensis* (M2904 MHOM/BR/75M2904) transfectados tanto con el vector pSP72Rane α GFP [68] (empleado como control), como con el vector pSP72Rane α LbNMNAT-GFP [13], (empleado para la sobre expresión de la proteína de interés), obtenidos en trabajos anteriores.

Para cada línea celular, mediante centrifugación a 8000 rpm por 10 min a 4° C, se colectaron promastigotes provenientes de 100 mL de cultivo. Se lavaron 2 veces con 10 mL de PBS pH: 7.4, se resuspendieron en 500 μ L de buffer de lisis (0.1X PBS, coctel de inhibidores de proteasas (1:200), 0.1% (v/v) Tritón X-100) y se incubaron durante 30 min a 4°C con agitación constante. La suspensión se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4°C y se almacenó el sobrenadante a -20°C (*Fracción soluble*)[13].

6.3.2 Co-inmunoprecipitación de las proteínas asociadas a LbNMNAT-GFP.

Con aras de inmunoprecipitar la LbNMNAT-GFP se empleó el anticuerpo comercial anti GFP, un anticuerpo policlonal producido en conejo de la marca molecular probes. Para la co-inmunoprecipitación, una vez se obtuvieron los extractos como se describe en la sección anterior, se realizó un proceso de aclarado incubando por cada 900 μ L de extracto, 100 μ L de perlas de proteína A unida a sefarosa de *Staphylococcus aureus* (Sigma) por 1 h a 4°C con

agitación constante. Luego, se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos a 4°C. Al sobrenadante aclarado obtenido, se adicionó el anticuerpo anti-GFP, a una concentración final de 0.2 µg/mL, dejando incubar por 16 h a 4°C con agitación constante. Posteriormente, se agregaron perlas proteína A-sefarosa, incubándolas por 2 h con agitación constante a 4°C. Para obtener el inmunoprecipitado (IP) se centrifugó a 3000 rpm a 4°C. Las perlas se lavaron tres veces con buffer IP (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol 5% (v/v)), y el IP se resuspendió en buffer de carga 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, Glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v) y β-mercaptoetanol 100 mM), finalmente fue sometido a calentamiento a 96°C por 10 minutos.

Para evaluar el proceso de inmunoprecipitación, se miraron los diferentes pasos a través de SDS-PAGE y western blot. En la inmunodetección se empleó como anticuerpo primario, anti-LbNMNAT (1:5000) o anti-GFP (1:500) en TBS y como anticuerpo secundario se usó anti ratón ó anti-conejo IgG conjugado a peroxidasa (1:5000). Como sistema de revelado se empleó 4-Cloronaftol y H₂O₂, según el protocolo descrito en la sección 6.1.2.5. Se contrastaron los resultados obtenidos tanto para extractos proteicos provenientes de parásitos que expresan la LbNMNAT fusionada a GFP, como aquellos que sólo expresan la proteína GFP, como control.

6.3.3 Análisis de proteínas mediante espectrometría de masas.

La identificación de potenciales interacciones de proteínas con la LbNMNAT, se realizó a partir de los extractos proteicos obtenidos de los experimentos de inmunoprecipitación señalados en el apartado 6.4.2 y su análisis mediante espectrometría de masas.

Para ello, 60 µL del inmunoprecipitado, se corrieron en un SDS-PAGE al 12% con una diferencia de potencial de 200 V por 5 min, la tinción se realizó con Coomassie coloidal (G-250) ((NH₄)₂SO₄ 10% (p/v), Coomassie G-250 0,1% (p/v), ácido ortofosfórico 3% (v/v), etanol 20% (v/v)) durante 16 h.

Las bandas de las proteínas inmunoprecipitadas se cortaron del gel de poliacrilamida y se enviaron a identificación por nano LC-MS/MS a la empresa ALPHALYSE™ [72] (<https://www.alphalyse.com/>). Nano-LC-MS/MS es una técnica lenta, delicada y muy sensible donde la mezcla de péptidos se separa mediante HPLC y cada péptido se analiza en solución mediante ionización por electroespray o ESI-MS/MS en un espectrómetro de masas QTOF.

6.4 Identificar posibles interacciones de la LbNMNAT con otras proteínas implementando análisis de redes.

Para la creación de la red de interacción proteína-proteína de la NMNAT en el parásito *Leishmania braziliensis*, se empleó la plataforma STRING V. 10.5 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) [73], que emplea un enfoque integrador y proporciona una red interactiva de proteínas y sus socios funcionales. Se utilizó la información de las fuentes:

neighborhood, *gene-fusion*, *text-mining*, co-expresión, co-ocurrencia, bases de datos y resultados experimentales, estableciendo un valor de 0.400 como puntuación de interacción mínima. Para las proteínas de la red se realizó un enriquecimiento funcional de las proteínas, usando sistemas de clasificación funcionales en GO (Gene Ontology); posteriormente, se hizo la predicción de módulos funcionales y conservados empleando las bases de datos InterPRO (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) y KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). Se efectuó un análisis topológico teniendo en cuenta algunos parámetros calculados. Finalmente, se analizaron las proteínas hipotéticas y las interacciones de interés. Para contrastar los resultados con interacciones físicas proteína-proteína confirmadas experimentalmente, se hizo búsqueda de interacciones físicas de la NMNAT en organismos como *homo sapiens*, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*, en las bases de datos en línea: DIP (Database of Interacting Proteins) <http://dip.doe-mbi.ucla.edu/dip/Main.cgi>, BioGRID (Database of Protein, Chemical, and Genetic Interactions) <https://thebiogrid.org/> e IntAct (Molecular Interaction Database) <https://www.ebi.ac.uk/intact/>.

7 Resultados y discusión

El NAD^+ desempeña un papel vital en el metabolismo energético dentro de las células eucariotas, pues vincula el metabolismo celular con cambios en eventos de señalización y transcripción. Esta molécula no solo desempeña su función como coenzima, sino que ella y sus metabolitos son sustratos de numerosas enzimas [74]. Al hablar del NAD^+ y su biosíntesis, se vincula de manera directa a la **NMNAT**, ya que es una enzima clave en este proceso. Por ende, se resalta la importancia de ampliar su estudio y caracterización, en especial en organismos patógenos como *Leishmania*, que son objeto de continua investigación. Este trabajo hace parte de un proyecto más amplio que busca caracterizar tanto bioquímica como funcionalmente la enzima del parásito; aquí el enfoque comprende dos componentes principales: el estudio de regiones específicas de la enzima a través del diseño y creación de mutantes; y la exploración de potenciales interacciones proteína-proteína en las que esté involucrada la **LbNMNAT**. A continuación, se muestran los resultados obtenidos al abordar los componentes mencionados:

CAPÍTULO 1.

Estudio de regiones específicas de la enzima a través del diseño y creación de mutantes

- Acercamiento computacional

7.1 Existen regiones específicas en la NMNAT de *Leishmania braziliensis* con respecto a las isoenzimas humanas.

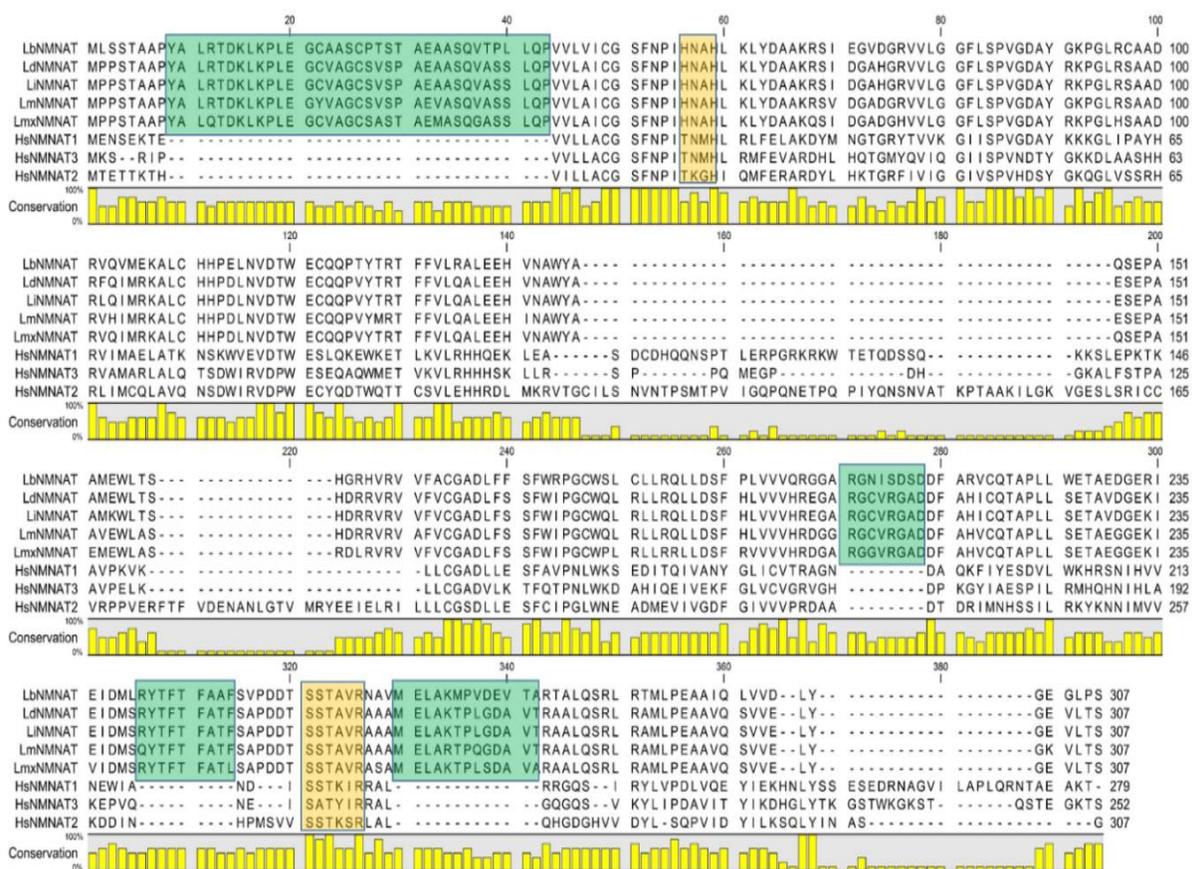
En una investigación previa [49], como parte de la caracterización y evaluación funcional de la LbNMNAT, se identificaron regiones presentes exclusivamente en las secuencias del parásito en contraste con las NMNATs humanas. Ampliando este análisis, en este trabajo, se actualizó y se profundizó en el análisis bioinformático, en especial de las proteínas producto de las deleciones de las regiones génicas identificadas.

Para este estudio, de manera inicial se realizó un alineamiento múltiple entre las secuencias de aminoácidos de la NMNAT de cinco especies del género *Leishmania* con las NMNATs tanto de procariotas como eucariotas. Se involucraron miembros de bacterias, protozoos, plantas y animales, específicamente los organismos: *Escherichia coli*, *Caenorhabditis elegans*, *Trypanosoma cruzi*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, y *Homo sapiens*. Este alineamiento se realizó empleando los algoritmos T-Coffe [75], MUSCLE [76] y ClustalO [77].

Bajo los parámetros de cada método de análisis se observó una inserción en el extremo amino terminal en las especies de *Leishmania* con respecto a dichos organismos (Figura 7.1). Este hecho se presentó también en *Arabidopsis thaliana* y *Trypanosoma cruzi*; en este último, un análisis previo mostró también que la NMNAT de diferentes cepas presentan una región de 19 aminoácidos en el

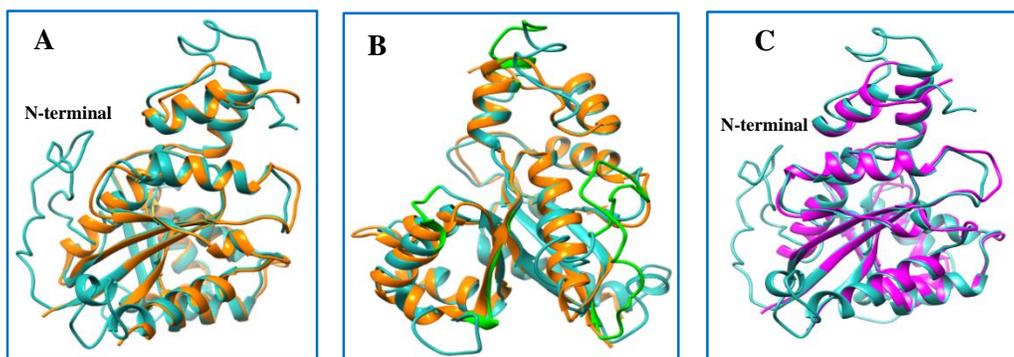
generaron cuatro mutantes con deleciones de diferentes longitudes, eliminando desde 32 hasta 82 residuos, encontrando que los mutantes conservan la capacidad de sintetizar NAD⁺ a partir de NMN y ATP, demostrando que el dominio central no es esencial para el plegamiento funcional del núcleo catalítico [37].

Figura 7.2. Identificación de regiones específicas de la NMNAT de *Leishmania braziliensis*. Alineamiento múltiple de proteínas NMNATs de diferentes especies de *Leishmania* y las iso-enzimas humanas HsNMNAT1-3. (LbNMNAT: *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904, Ld: *L. donovani*, Li: *L. infantum* JPCM5, Lm: *L. major* Friendlin, Lmx: *L. mexicana*). En los recuadros verdes se señala las cuatro regiones específicas cuyas posiciones corresponden a los aminoácidos: 8-43, 205-212, 241-249 y 264-276. En los recuadros naranjas se señalan los dos motivos reportados de unión a ATP: [H/T]xxH y SxxxR [80]. El porcentaje de identidad entre las secuencias es proporcional a la altura de las barras amarillas. El alineamiento se generó con el programa CLC Sequence Viewer 7.8.1.



Si la comparación se hace a nivel de estructura terciaria entre el modelo de la LbNMNAT (obtenido mediante *threading* con el servidor I-TASSER) con las estructuras resueltas mediante cristalografía de rayos X de las iso-enzimas 1 y 3 humanas (Figura 7.3), se confirma que la similitud estructural es interrumpida particularmente en el extremo amino terminal, dada la adición de aproximadamente 35 residuos. Con análisis similares entre las HsNMNATs y la ortóloga de *E. coli* la comparación estructural reveló que pese a su similitud existe una región variable que precede la cuarta lámina β del plegamiento común tipo Rossmann, y que son propias de las enzimas humanas, son dominios que median la localización subcelular de estas enzimas [38].

Figura 7.3. Comparación estructural de las isoenzimas humanas 1 y 3 con la LbNMNAT. (A y B) superposición estructural de la HsNMNAT1 (código PDB 1KQN/ color naranja) con el modelo predicho de la LbNMNAT (azul), presentan un RMSD entre 188 pares de átomos de 0.832Å. En (A) se resalta la inserción N.terminal, en (B) se señalan las cuatro inserciones determinadas por alineamiento múltiple en color verde. (C) Superposición estructural de la HsNMNAT3 (código PDB 1NUP/color magenta) con el modelo predicho de la LbNMNAT, presentan un RMSD entre 176 pares de átomos de 0.725 Å. Visualización en el programa UCSF Chimera 1.11.2.



7.2 Las regiones específicas de la NMNAT de *Leishmania braziliensis* identificadas *in silico*, pueden presentar modificaciones postraduccionales.

Las modificaciones postraduccionales afectan la función y estabilidad de las proteínas, y contribuyen en la modulación de la expresión génica, en especial, en organismos como los tripanosomátidos. Se ha demostrado que modificaciones como la fosforilación, metilación, acetilación y glicosilación de proteínas regulan su función y estabilidad [81]. Por ello, la secuencia LbNMNAT se analizó con NetPhos 3.0, que a partir de redes neuronales detecta sitios de fosforilación en serinas, treoninas y tirosinas de proteínas eucariotas con una sensibilidad en el rango del 69 al 96% [52]; con esta herramienta bioinformática, se encontraron trece potenciales sitios de fosforilación, de los cuales cinco serinas y dos treoninas se encuentran en tres de las inserciones identificadas (Tabla 6.1). La presencia de posibles sitios de fosforilación en estas regiones, sugiere que podrían estar involucradas en mecanismos celulares habituales de regulación y control del estado de funcionamiento de la enzima, al igual que en la mediación de funciones de localización intracelular.

En este tripanosomátido, varias proteínas quinasas y fosfatasa se han clonado y caracterizado, y se ha demostrado que participan en la regulación del ciclo celular y el desarrollo del parásito [82]–[84]. Entre las predicciones de quinasas específicas dadas por el programa se encontró de manera recurrente la PKC (Protein Kinase C), ya caracterizada en *Leishmania* y asociada por su papel crítico en la adhesión y en los pasos de internalización involucrados en el proceso de invasión [85].

En NMNATs de organismos como *Trypanosoma cruzi* eventos de fosforilación fueron analizados experimentalmente, estableciendo que la enzima es potencial blanco de serin-quinasa [86]. Para el caso de la NMNAT-1 de *Homo sapiens* se encontró que también es sustrato de fosforilación, con tres residuos de serina con alta probabilidad de presentar esta modificación (predicciones *in silico*). De los roles de otras modificaciones post-traduccionales como metilaciones, acetilaciones y glicosilaciones, se dispone de información limitada en el parásito [81].

Tabla 7.1. Predicción de potenciales sitios de fosforilación de la LbNMNAT con NetPhos 3.0 [52].

Residuo	Secuencia	Puntaje/0,500	
S4	MLS S TAAP	0.663	
T13	YALRTDKLK	0.865	
S29	SCPT S TAEA	0,975	Inserción 8-43
S35	AEAAS S QVTP	0,603	
S69	AAKR S IEGV	0,946	
Y90	VGD A YGKPG	0.807	
S158	EWL T SHGRH	0,884	
S210	RGN S DSDD	0,991	Inserción 205-212
S212	NIS S DDFA	0,923	
T245	RYT F FAAF	0.892	Inserción 241-249
S250	FAAF S VPDD	0,987	
T255	VPDD T SSTA	0,665	
T287	SRLR T MLPE	0,632	

Con el propósito de conocer la importancia de las secuencias específicas a nivel estructural y funcional en la enzima, se propuso el diseño de mutantes carentes de estas regiones. Para la selección y diseño de las proteínas, inicialmente se determinaron características de tamaño, longitud y punto isoeléctrico (datos registrados en la tabla 7.2). Para la proteína silvestre se determinó la composición porcentual de aminoácidos, predominando los residuos con carácter hidrofóbico (figura 7.4). El mismo análisis se realizó para las cuatro inserciones estudiadas, con un porcentaje mayor de aminoácidos polares en tres de ellas (Tabla 7.3).

Posteriormente, se realizaron predicciones de estructura terciaria a través del servidor I-TASSER (Figura 7.5), las cuales fueron refinadas con 3Drefine y validadas con el gráfico de Ramachandran (Anexo 3). Con este diagrama se hizo un análisis de la calidad estereoquímica de cada modelo, pues permite visualizar todas las combinaciones posibles de los ángulos diédricos Ψ (Psi) y Φ (phi) en los aminoácidos que conforman la estructura de la proteína. Para todos los modelos más del 90% de los residuos presentan combinaciones de los ángulos phi y psi dentro de las regiones favorecidas y permitidas. Según las estructuras 3D, las delecciones de los residuos 205-212 y 264-276 muestran pérdida de giros aleatorios y parte de aminoácidos componentes de hélices alfa; por su parte, en la región 8-43 se elimina la estructura no resuelta del extremo amino terminal, mientras que en la 241-249 una lámina β .

Aunque todos los componentes estructurales son interesantes de estudio, a nivel *in vitro* se trabajó la inserción amino terminal, siendo la de mayor longitud y sobresaliente en la comparación tridimensional con las ortólogas humanas. También se estudió la región 241-249 cercana al motivo C-terminal de unión a ATP. Para los mutantes producto de la remoción de los aminoácidos 205-212 y 264-276, se realizó una superposición estructural entre la proteína silvestre y la correspondiente versión delecional, comparando específicamente los posibles cambios espaciales de los residuos conservados involucrados en la unión con el adenosín trifosfato (H56, H59, S256 y R261). En el caso

de la proteína $\Delta_{264-276}$ LbNMNAT las cadenas laterales de los aminoácidos señalados no sufren un cambio significativo (figura 7.6 B), situación diferente para la proteína $\Delta_{205-212}$ LbNMNAT en donde hay notorias diferencias espaciales (figura 7.6 A). Aunque la unión con este sustrato es relevante en la actividad enzimática, es necesario determinar otros factores estructurales para determinar si pueden o no ser catalíticamente activos.

Tabla 7.2. Parámetros fisicoquímicos de la NMNAT de *Leishmania braziliensis* y los mutantes delecionales.

Proteína	Número de residuos	Peso Molecular teórico (Da)	Punto Isoeléctrico teórico (pI)
LbNMNAT	307	33737.6	5.41
Δ_{8-43} LbNMNAT	272	30123.5	5.38
$\Delta_{205-212}$ LbNMNAT	299	32936.8	5.40
$\Delta_{241-249}$ LbNMNAT	298	32632.4	5.29
$\Delta_{264-276}$ LbNMNAT	291	31965.5	5.51

Figura 7.4. La secuencia de la LbNMNAT contiene mayoritariamente aminoácidos no polares. (A) Composición porcentual de aminoácidos no polares, polares cargados y polares no cargados. (B). Composición porcentual de cada uno de los 20 aminoácidos que constituyen la proteína.

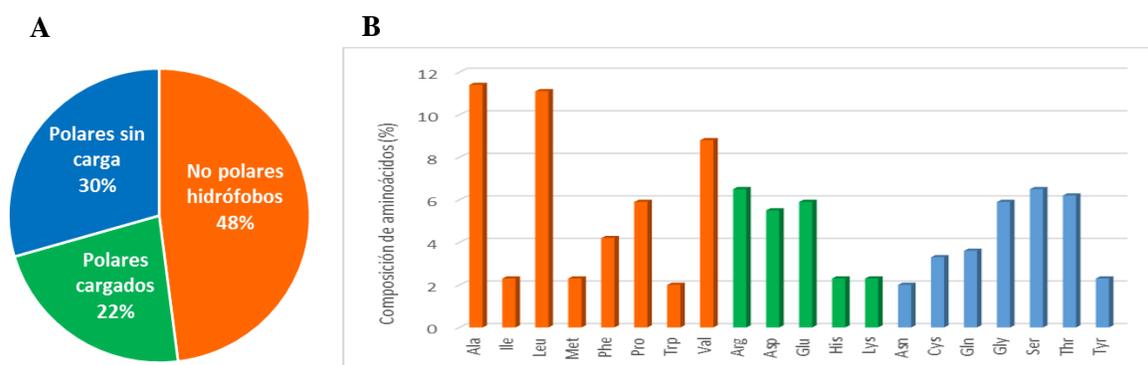


Tabla 7.3. Composición porcentual de aminoácidos no polares, polares cargados y polares no cargados de las inserciones identificadas.

Aminoácidos	Región Δ_{8-43}	Región 205-121	Región 241-249	Región 264-276
No polares o hidrofóbicos	47.3%	25%	55.5%	61.5%
Polares no cargados	16.5%	25%	11.1%	30.8%
Polares cargados	36.2%	50%	33.3%	7.7%

Figura 7.5. Modelos de estructura terciaria de la proteína silvestre y las versiones mutadas. (A) LbNMNAT (en color magenta, verde, naranja y amarillo están las regiones específicas ausentes en los mutantes deletoriales correspondientes), C-score= -1,46, TM-score= $0,53 \pm 0,15$ (B) $\Delta 8-43$ LbNMNAT, C-score= -0,30, TM-score= $0,67 \pm 0,12$. (C) $\Delta 205-212$ LbNMNAT, C-score= -1,25, TM-score= $0,56 \pm 0,15$ (D) $\Delta 264-276$ LbNMNAT C-score= -1,41, TM-score= $0,54 \pm 0,15$ (E) $\Delta 241-249$ LbNMNAT, C-score= -1,20, TM-score= $0,56 \pm 0,15$. Generados en el servidor I-TASSER y visualizados en el programa UCSF Chimera 1.10.1.

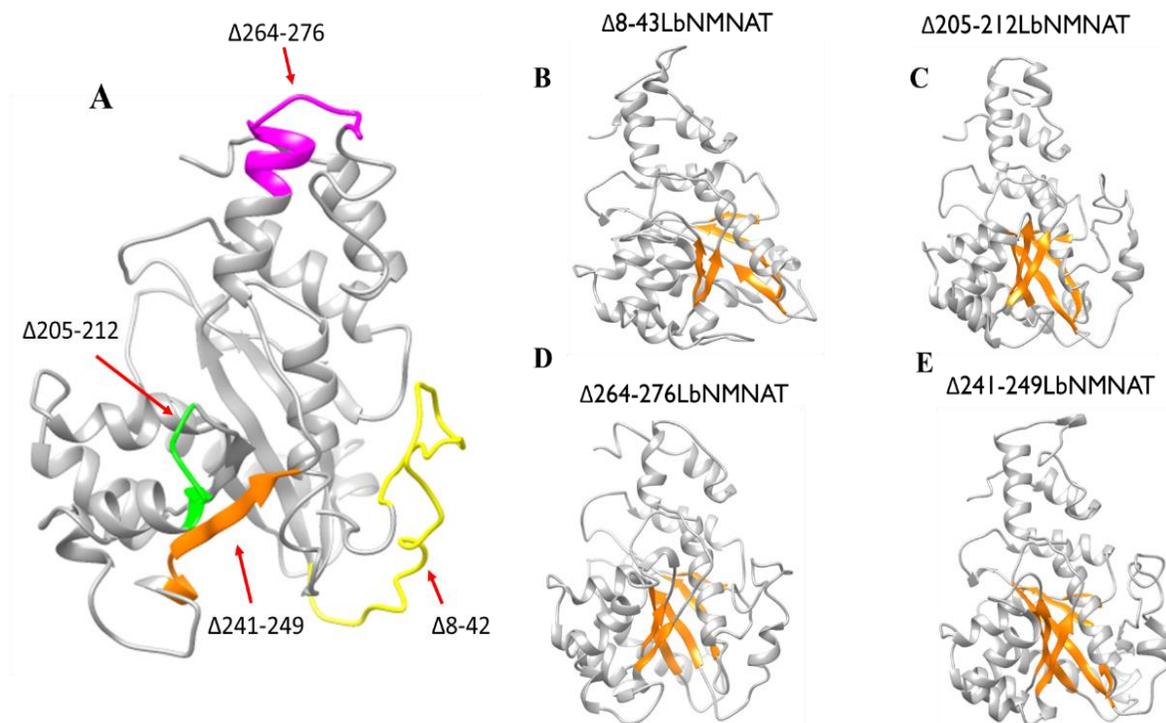
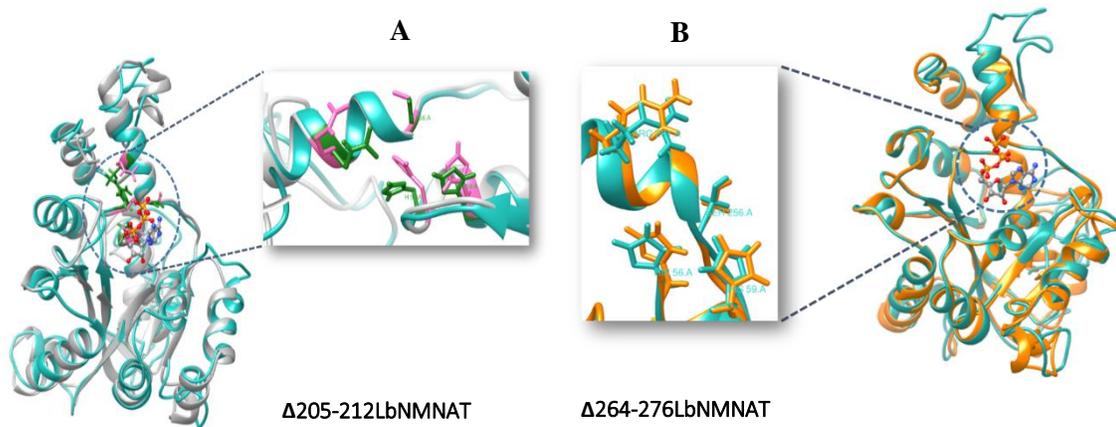


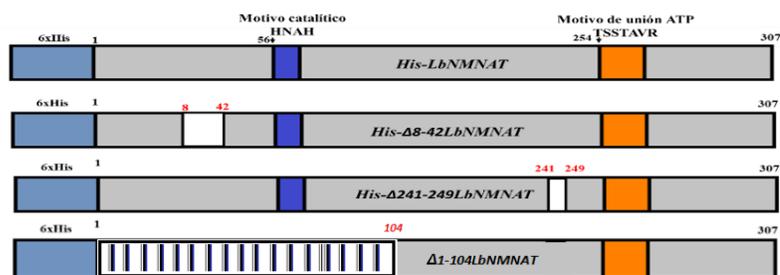
Figura 7.6. Modelos de estructura terciaria de la LbNMNAT silvestre con las proteínas $\Delta 205-212$ LbNMNAT y $\Delta 264-276$ LbNMNAT en unión con ATP. (A y B) superposición estructural de las proteínas LbNMNAT (azul), $\Delta 205-212$ LbNMNAT (gris) y $\Delta 264-276$ LbNMNAT (naranja) en presencia de ATP, respectivamente. Los residuos involucrados en la interacción con el sustrato (H56, H59, S256 y R261) se resaltan en el recuadro. Visualización en UCSF Chimera 1.10.1.



- Acercamiento experimental

A nivel experimental este trabajo aborda dos las versiones truncadas de la proteína LbNMNAT: la $\Delta 8-43$ y la $\Delta 241-249$, ahora denominadas deleciones amino y carboxilo terminales, respectivamente. Adicionalmente, se trabajó con un tercer mutante que representa una versión corta de la proteína ($\Delta 1-104$ LbNMNAT) como herramienta para el estudio funcional del extremo amino terminal. Para la deleción 8-43, fue necesario realizar la construcción del vector de expresión empleando la técnica de mutagénesis dirigida por PCR (en la sección 7.4 se describe los resultados obtenidos a partir de la técnica). En cuanto al extremo carboxilo terminal, se buscó la solubilización de la recombinante con el fin de determinar su actividad enzimática. Las proteínas trabajadas se esquematizan en la figura 7.7.

Figura 7.7. Esquema de la proteína 6xHis-LbNMNAT completa, al igual que las proteínas 6xHis- $\Delta 8-42$ LbNMNAT, 6xHis- $\Delta 241-249$ LbNMNAT y 6xHis- $\Delta 1-104$ LbNMNAT. (Los recuadros blancos representan las regiones delecionadas).



7.3 La remoción de los residuos 241-249 de la proteína LbNMNAT afecta su solubilidad y su actividad enzimática *in vitro*.

La proteína 6xHis $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT fue expresada en *E. coli* BL21 (DE3) en forma de agregados insolubles, a partir del vector recombinante pQE30- $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT, construido previamente en nuestro laboratorio [13]. Pese a que se realizaron modificaciones en condiciones de expresión como temperatura y sistemas bacterianos, no se logró la obtención de la proteína de manera soluble, hecho que imposibilitó la determinación del papel de esta inserción en la actividad enzimática [13].

Usualmente, altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* producen proteínas mal plegadas que se acumulan como agregados intracelulares conocidos como cuerpos de inclusión [87]. Por lo general, cuando el nivel de expresión de la recombinante supera el 2% de las proteínas totales de la célula, se conduce a la formación de cuerpos de inclusión, probablemente por alcanzar concentraciones no fisiológicas que generan estrés celular y saturación de la maquinaria encargada del plegamiento celular [88]. Entre los factores que promueven la formación de estos agregados encontramos: las altas temperaturas de inducción, elevadas concentraciones de inductor y expresión en sistemas de promotores fuertes que favorecen la expresión a una tasa alta de transcripción. Pese a que estos factores fueron evaluados en un estudio previo con la proteína mutante, no se obtuvieron resultados satisfactorios. Entre las estrategias propuestas para contrarrestar esta situación, se incluyó

la clonación de chaperonas y foldasas que promuevan el plegamiento de las proteínas. Siguiendo este método, se co-expresó la 6xHis $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT con chaperonas moleculares (DnaK, DnaE, GrpE, GroES y GroEL), sin lograr obtener la proteína de manera soluble. Esta estrategia pudo no ser exitosa, dado que no es posible predecir qué chaperona facilita el plegamiento de esta proteína en particular, o si se requiere más de una chaperona o cofactor [89].

Retomando este trabajo, se buscó una alternativa experimental que permitiera obtener proteína activa y plegada correctamente para su evaluación como adenilil transferasa. Por lo cual, se estudió otro factor que afecta la formación de cuerpos de inclusión en *E. coli*: alteraciones estructurales de las proteínas por ausencia de puentes disulfuro. Se conoce que la ubicación de los agregados es principalmente en uno o ambos polos de las células, debido al apilamiento macromolecular en el citoplasma [90], hecho que establece que la agregación también puede ser el resultado de la falta o incorrecta formación de enlaces disulfuro debido al entorno reductor del citoplasma bacteriano [89]. Esto se debe principalmente a que en la mayoría de los sistemas de sobre-expresión, la proteína recombinante producida se expresa en el citoplasma, pero la formación del enlace disulfuro se lleva a cabo por la oxidasa DsbA en el periplasma, donde *E. coli* está poco adaptada para producir con altos rendimientos proteínas unidas por múltiples puentes disulfuro [91]. Dado que todas las células vivas estudiadas hasta la fecha tienen enzimas dedicadas a reducir los enlaces disulfuro en su citoplasma, la formación de estos enlaces se ha dividido en compartimentos extra citoplasmáticos, como el periplasma en bacterias Gram negativas [92] o retículo endoplasmático en eucariotas [93].

Teniendo en cuenta este aspecto, se realizó una predicción de los posibles enlaces disulfuro que se pueden presentar en la proteína, empleando el programa Dipro del servidor SCRATCH, que permiten predecir la existencia o no de enlaces entre cisteínas, estimando el número de enlaces entre ellas [57]. Como resultado, se obtuvo que la recombinante tiene en total diez residuos de cisteína, entre los cuales se predice la formación de cuatro enlaces, descritos en la tabla 7.4. Dado que estos enlaces sirven principalmente para estabilizar la estructura de la proteína, se extiende el análisis a nivel de estructura terciaria, en donde se observa cercanía espacial de los aminoácidos, es especial entre las cisteínas 22 y 26, al igual que entre la 182 y 186, siendo las más probables para la formación del enlace (Figura 7.8).

Figura 7.8. Cisteínas presentes en el modelo tridimensional de la proteína Lb $\Delta_{241-249}$ NMNAT. En naranja se señalan las Cys que participan en los enlaces disulfuros predichos, en verdes aquellas que no participan.

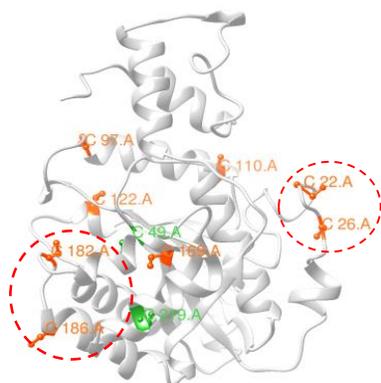


Tabla 7.4. Enlaces disulfuro predichos para la proteína Lb $\Delta_{241-249}$ NMNAT empleando Dipro. Pares de cisteínas ordenados por probabilidad en orden descendente.

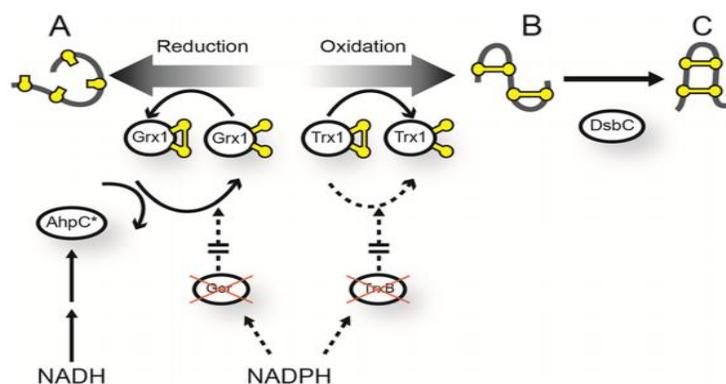
Enlace disulfuro	Posición Cys-1	Posición Cys-2
1	22	26
2	182	186
3	97	110
4	122	169

Teniendo en cuenta que la proteína 6xHis $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT podría estar siendo expresada en el sistema heterólogo sin presentar de manera correcta sus puentes disulfuro, y sabiendo que estos son críticos para el correcto plegamiento, estabilidad y/o actividad, se buscó una alternativa enfocada en el uso de una cepa de expresión modificada en su ambiente redox citoplasmático.

A nivel comercial, existen pocas cepas de expresión en *E. coli* dedicadas a modificaciones postraduccionales [91]. En el caso de los puentes disulfuro encontramos cepas como: Origami, AD494, BL21trxB, Rosetta-gami™ y SHuffle, caracterizadas por presentar mutaciones en los genes de la tiorredoxin reductasa (trxB) y la glutatión reductasa (gor). Estas mutaciones se hacen ya que la presencia de numerosas tiorredoxinas (Grx1, Grx2, Grx3, Trx1, Trx2), de glutatión y otros reductores del grupo tiorredoxina mantienen reducidas las cisteínas en el citoplasma [91].

Experimentalmente, se empleó la cepa SHuffle T7 Express, una cepa que carece de las reductasas trxB y gor (la letalidad conferida por estas mutaciones se suprime por una mutación en la peroxidasa *AhpC**, que no tiene la capacidad de reducir los peróxidos, pero tiene la capacidad de reducir Grx1); además, también expresa la DsbC, una disulfuro isomerasa que convierte los enlaces disulfuros anómalos en correctos. El esquema de la ruta redox en el citoplasma de SHuffle se muestra en la figura 7.9 [91].

Figura 7.9. Representación esquemática de las rutas redox implicadas en la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma de SHuffle. Las líneas punteadas representan interacciones proteicas deshabilitadas debido a la eliminación de trxB y gor. Se indica el estado redox de las cisteínas (esferas amarillas) (oxidado = esfera + barra, reducido = esfera). **(A)** La proteína se reduce por Grx1 o se oxida por Trx1. **(B)** La proteína parcialmente oxidada se isomeriza a su estado nativo plegado correctamente **(C)** por DsbC. Figura tomada de [91].



Para evaluar si este sistema favorecía la obtención de la proteína en su forma soluble, se transformaron las células mediante choque térmico con el plásmido pQE30- $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT (Figura 7.10-A). Se realizó la expresión de la proteína (~36.5kDa), analizando mediante SDS-PAGE y western blot proteínas totales y fracciones soluble e insoluble (Figura 7.10-B y C). Bajo las condiciones experimentales utilizadas se observa que la proteína se expresa de manera mayoritaria en la fracción insoluble; sin embargo, en esta cepa de expresión se logra obtener parte de la recombinante de manera soluble. Aprovechando la expresión de proteína solubilizada, se evaluó el efecto de la temperatura de inducción en el plegamiento de la misma ya que ha sido bien documentado y es uno de los factores más comunes para optimizar durante la producción de proteínas [65].

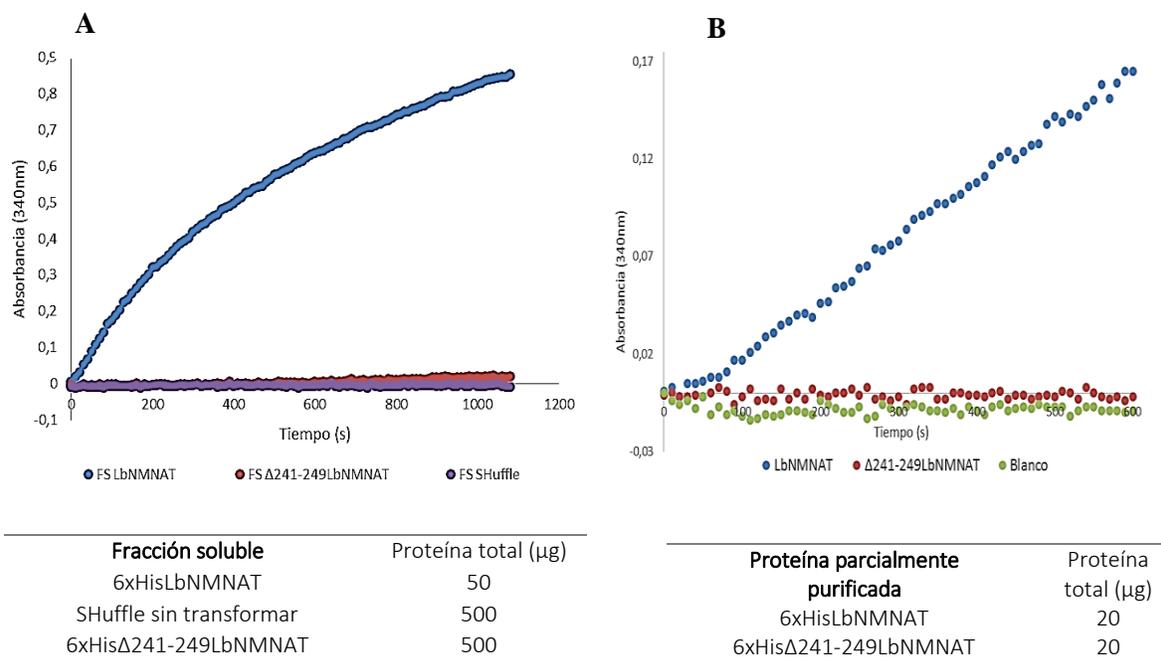
Se sometieron los cultivos bacterianos a temperaturas de 16°C, 25°C y 37°C, a una concentración de inductor de 1.0 mM y a un tiempo de inducción de 16 h. Como se detalla en la figura 7.10-D y E, la mayor producción de proteína tanto en fracción soluble como insoluble se registra a 37°C; esta es la temperatura óptima de crecimiento de *E. coli*, que coincide con la temperatura de máxima actividad de la T7 RNA polimerasa, aunque no es necesariamente la temperatura óptima de producción de proteínas heterólogas [94]. En células SHuffle, otros investigadores han determinado el papel de la temperatura en la expresión. Siete diferentes proteínas se indujeron con IPTG 1.0mM, con modificación de la temperatura de crecimiento a 16 °C, 25°C y 37°C, encontrando que la temperatura óptima varió entre ellas, permitiendo concluir que el efecto de la temperatura es específico de cada proteína [91].

En este caso, el uso de la cepa SHuffle permitió obtener parte de la proteína en la fracción soluble, dando a conocer que para su plegamiento y estabilidad es altamente probable la formación de puentes disulfuro. Una vez solubilizada, y empleando la cola de histidinas adicionada en el extremo amino terminal de la enzima, se realizó una cromatografía de afinidad a metales, específicamente níquel, obteniendo la proteína parcialmente purificada (figura 7.10-F).

Para determinar la importancia de la inserción carboxi-terminal en las propiedades catalíticas de la LbNMNAT, la proteína truncada presente tanto en la fracción soluble de SHuffle, como parcialmente purificada, fue sometida a ensayos de actividad determinados espectrofotométricamente. En este ensayo el NAD⁺ producto de la síntesis de la NMNAT es reducido a NADH por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, registrando el incremento en la absorbancia a 340 nm. Se empleó como control de actividad la proteína silvestre (LbNMNAT) presente tanto en fracción soluble de SHuffle como purificada (los resultados de expresión, purificación y actividad se registran en el Anexo 4), de igual forma se empleó fracción soluble de la cepa sin transformar y buffer de elución como controles negativos.

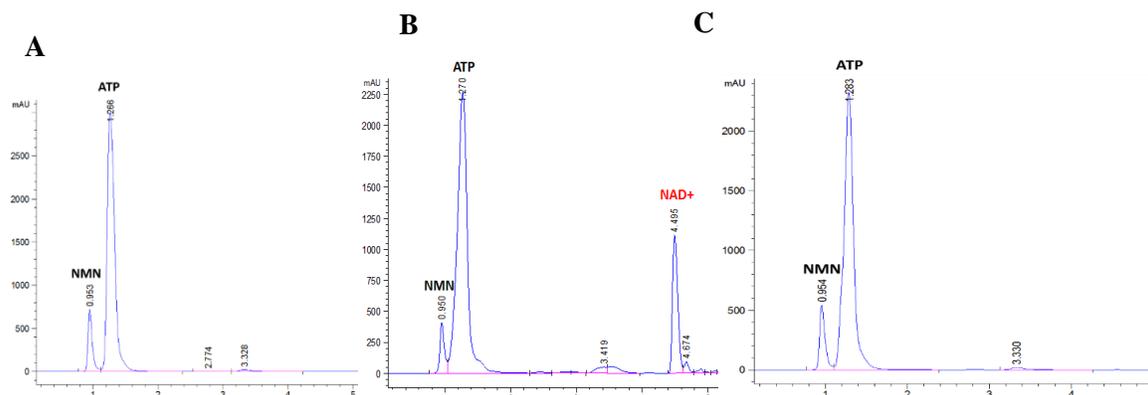
En la figura 7.11 (A-B) se compara la actividad enzimática entre la 6xHisLbNMNAT y la 6xHis $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT, observando pérdida de la actividad por parte de la proteína mutada. En el caso de las fracciones solubles, se ratifica que ninguna proteína del sistema bacteriano presenta actividad adenililtransferasa y que pese a que se empleó 10 veces más de proteína total con presencia de la proteína mutante con respecto a la proteína silvestre, esta no presentó aumento significativo en la absorbancia. Resultado similar se obtuvo al comparar la actividad de las proteínas parcialmente purificadas, en ensayos independientes.

Figura 7.11. La delección carboxi-terminal afecta la actividad catalítica de la LbNMNAT. Ensayos enzimáticos acoplados para: **(A)** Fracción soluble de SHuffle con las recombinantes 6xHisLbNMNAT (control positivo), 6xHis $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT y fracción soluble de la cepa sin transformar (control negativo). **(B)** Las proteínas recombinantes (silvestre y mutada) parcialmente purificadas mediante cromatografía de afinidad a Ni-NTA



Para confirmar el resultado anterior se contrastó con un ensayo enzimático directo, en donde la proteína parcialmente purificada es incubada con los sustratos (ATP, NMN y su cofactor Mg^{2+}), con el fin de seguir la producción de NAD^+ mediante HPLC en fase reversa. Inicialmente, se establecieron las condiciones de la corrida cromatográfica y se determinaron los tiempos de retención para cada una de las moléculas (Anexo 5). Al comparar los cromatogramas obtenidos (figura 7.12), se ratifica la pérdida de actividad de la proteína con la delección carboxi-terminal.

Figura 7.12. La remoción de los residuos 241-249 de la LbNMNAT afecta su actividad adenililtransferasa. La síntesis de NAD^+ se verificó mediante RP-HPLC. Se indican los picos correspondientes para los sustratos NMN y ATP, así como para el producto NAD^+ . Evaluación de la actividad enzimática de: **A.** Buffer de reacción (control negativo de actividad). **B y C** Proteínas silvestre 6xHisLbNMNAT y 6xHis $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT parcialmente purificadas, respectivamente.



Para conocer los posibles cambios estructurales de la proteína producto de la remoción de los residuos 241-249, se analizó tanto la estructura secundaria como la terciaria. En la primera de ellas se encontró que los aminoácidos sustraídos están involucrados en la formación de una lámina β , como se señala en el perfil gráfico en la tabla 7.5, que fue construida con el predictor PREDATOR, que usa estadísticas de pares de aminoácidos para predecir puentes de hidrógeno entre láminas β vecinas y entre residuos $i, i+4$ en hélices, con una precisión aproximada del 75% [55]; esta lámina β es observada de igual forma en el modelo tridimensional obtenido mediante *threading* con I-TASSER (figura 7.5-A).

Estructuralmente, las NMNATs contienen un dominio α/β que involucra láminas β rodeadas por hélices α y un dominio C-terminal formado por dos hélices α . El dominio α/β es conocido como plegamiento tipo Rossmann y proporciona los determinantes estructurales necesarios para la unión a sustratos, oligomerización y catálisis [80]. Sin embargo, es de resaltar que al comparar las estructuras resueltas mediante cristalografía de rayos x de diferentes NMNATs, es característica la presencia de un elemento estructural conformado por un *loop* ó un *loop* y una hoja β , que conecta la topología Rossmann con el dominio C-terminal, como se muestra en la figura 7.13. Tal elemento estructural está sujeto a cambios conformacionales que acompañan la catálisis y también proporciona una contribución clave para la estabilización del ensamblaje oligomérico [80]. En el mutante carboxi-terminal se altera la estructura y composición de la hoja β que sirve de conector entre los dos dominios mencionados, hecho que afecta su actividad enzimática pese a que la delección no involucra de manera directa residuos claves en la catálisis. De esta manera se muestra la relevancia estructural y funcional de dicha región y se abre como alternativa la evaluación de su rol en los procesos de oligomerización de la enzima.

Tabla 7.5. Predicción de la estructura secundaria de las proteínas LbNMNAT y Δ 241-249LbNMNAT. Porcentaje de residuos predichos como hélices α (azul), láminas β (rojo) o regiones aleatorias (púrpura) en comparación con el número total de aminoácidos de la secuencia de la proteína LbNMNAT (307 aa) y la versión Δ 241-249 (298 aa).

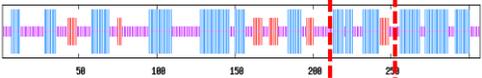
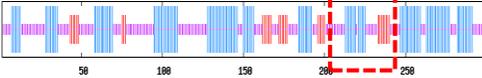
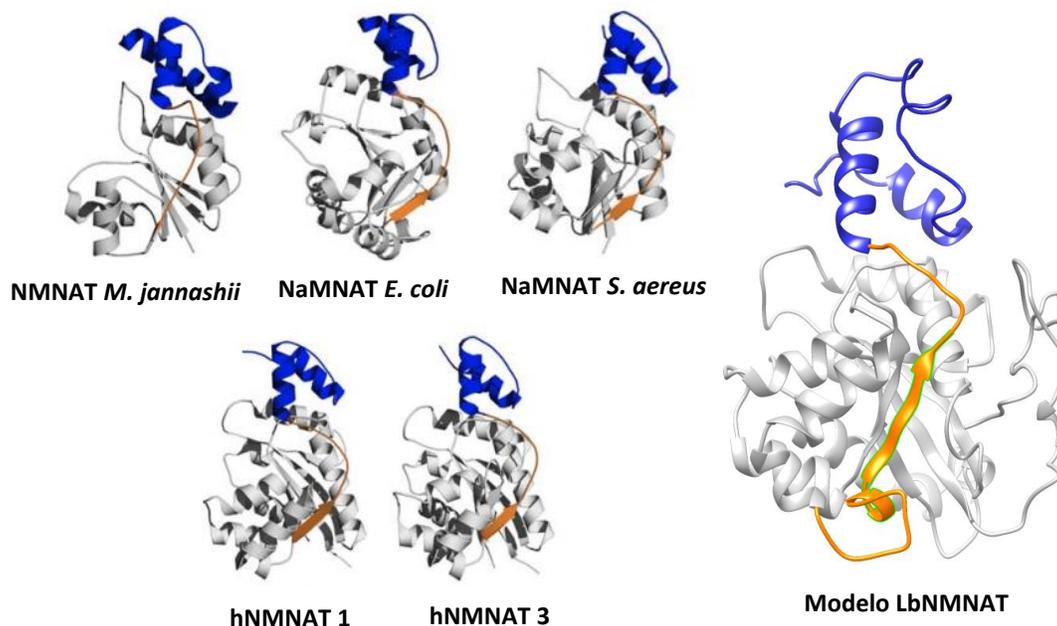
Predictor	LbNMNAT			Perfil gráfico estructura secundaria
	(%) Hélices α	(%) Láminas β	(%) Giros aleatorios	
PREDATOR	44.63	10.42	44.95	
	Δ 241-249LbNMNAT			
	42.28	11.41	46.31	

Figura 7.13. La delección 241-249 en la LbNMNAT elimina un elemento estructural clave de las NMNATs. Representación de diferentes NMNATs cristalizadas en donde se resalta el dominio C-terminal (azul), el plegamiento Rossmann (gris) y el elemento estructural (loop/ loop- hoja β en naranja) que conecta el dominio α/β con el dominio C-terminal. En el modelo de la LbNMNAT se resalta en verde la región sustraída 241-249.



7.4 Mediante mutagénesis dirigida se construyó el plásmido pQE30- Δ_{8-42} LbNMNAT

Entre las regiones encontradas *in silico*, también se llevó al plano experimental la delección de los residuos 8-42 de la enzima. Para ello, fue necesaria la construcción del vector mediante mutagénesis dirigida, una técnica que permite la manipulación química de un gen y por ende la proteína codificada por este DNA. Esta herramienta ha demostrado ser valiosa para estudiar la relación estructura-función de las proteínas, dado que los cambios estructurales resultantes, pueden estar vinculados a cambios en función, estabilidad y/o actividad [95]. Para llevar a cabo esta metodología se requiere un vector de expresión que contiene la secuencia de interés y cebadores que flanqueen la región a deleccionar. En este caso, se cuenta con el vector pQE30-LbNMNAT, que permite expresar la proteína fusionada a una cola de histidinas.

Al realizar el diseño de cebadores para la mutación 8-43 de la secuencia de interés, se encontró un alto contenido de guaninas en el cebador directo, situación que aumentó la probabilidad de formar dímeros de *primers* a la hora de realizar la PCR. Para contrarrestar esta situación, se evaluó diferentes longitudes del cebador, temperatura de anillamiento y porcentaje GC; sin embargo, las modificaciones de estos parámetros no dieron un resultado promisorio. Por esta razón, se realizó el diseño de *primers* para llevar a cabo la delección 8-42, permitiendo adicionalmente insertar sitios de

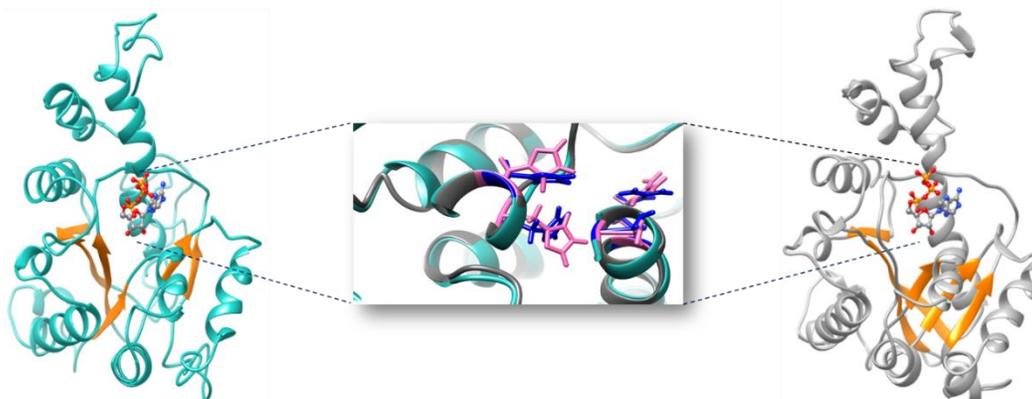
corte para las enzimas BamHI y KpnI, empleadas posteriormente para la confirmación de la identidad del constructo.

El proceso de obtención del vector de expresión se resume en la figura 7.14. En donde células químicamente competentes fueron transformadas con el producto de amplificación que corresponde al vector linealizado de un tamaño de ~4227 pb. Con el fin de detectar los clones que presentaron el nuevo plásmido recombinante, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa para amplificar específicamente la secuencia codificante mutada. La secuencia nucleotídica del gen de la NMNAT del parásito tiene un tamaño de 936 pb, pero al realizar la delección la secuencia queda con un tamaño de 831 pb. De las colonias rastreadas una presentó amplificado en el tamaño esperado. Para confirmar la identidad del mutante se hizo extracción del vector por lisis alcalina, se realizó PCR sobre el mismo y se sometió a doble digestión enzimática, obteniendo los resultados esperados.

Una vez diseñado y obtenido el vector, se buscó la expresión de la proteína en el sistema heterólogo *E. coli* (cepa BL21 DE3). Pese a modificaciones en las condiciones de expresión, no fue posible la inmunodetección de la recombinante (figura 7.15). A nivel experimental varios factores pueden afectar el proceso de expresión de proteínas. En el caso de mutagénesis dirigida, es probable que ocurra omisión de nucleótidos en el sitio de la ligación en la construcción del vector, hecho que cambia el marco abierto de lectura y por ende la proteína expresada. Para confirmar si existe alteración en la secuencia, se esperan los resultados de la secuenciación del plásmido construido. Vale la pena aclarar que se abordaron diversas estrategias para la obtención del vector, sin embargo, a la fecha se trabaja en la construcción del mismo.

A pesar de que los resultados experimentales aun no son concluyentes, se estudió *in silico* los posibles cambios estructurales que pudiese presentar la enzima al realizarse la delección; dado que la región de interés presenta proximidad al motivo de unión de ATP en el extremo amino terminal, se generaron modelos tridimensionales predictivos en donde se comparó la disposición espacial de los residuos conservados de unión a esta molécula, encontrando que las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados podrían presentar variación afectando la actividad catalítica (figura 7.16).

Figura 7.16. Modelos predictivos de la estructura terciaria de la LbNMNAT silvestre y el mutante 8-42 en unión con ATP. Proteínas LbNMNAT (azul) y Δ_{8-42} LbNMNAT (gris) en presencia de ATP. Los residuos involucrados en la interacción con el sustrato (H56, H59, S256 y R261) se muestran en color azul y morado, respectivamente. Visualización en UCSF Chimera 1.10.1.



7.5 Análisis de una versión corta de la NMNAT de *Leishmania braziliensis*

El estudio de mutantes deletacionales de la LbNMNAT no sólo abarcó las inserciones específicas señaladas anteriormente, sino que involucró también el estudio de una versión truncada de la enzima que prescinde de los primeros 104 residuos y que busca conocer el significado funcional del extremo amino terminal. Es de remarcar que el diseño y creación de la proteína recombinante con variación significativa en el tamaño (Δ_{1-104} LbNMNAT), busca responder un interrogante generado a raíz de evidencias experimentales obtenidas previamente en nuestro grupo de investigación y que es fundamentado en las particulares formas de regulación génica que se ha observado en *Leishmania*.

Experimentalmente hemos encontrado que al analizar extractos de proteínas totales, solubles e insolubles de promastigotes de *L. braziliensis* mediante western blot, y empleando anticuerpos anti 6xHis-LbNMNAT producidos tanto en modelos murinos como en modelos aviáres (IgYs), se detectó de manera específica una señal intensa de ~ 22 kDa; es decir, 12 kDa menos que el peso molecular teórico de la proteína LbNMNAT (33,7 kDa). Este mismo resultado se obtuvo al emplear anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante NMNAT de *Trypanosoma cruzi* (6xHis-TcNMNAT) que presenta un 40% de identidad con la enzima de *Leishmania*. Adicionalmente, en ensayos de western blot efectuados sobre extractos solubles de diferentes especies, no solo del nuevo sino del viejo mundo (*L. braziliensis*, *L. major*, *L. mexicana*), se reveló la misma banda específica de ~ 22 kDa [13]. La inmunodetección de la NMNAT endógena del parásito con un tamaño significativamente menor al esperado se puede analizar teniendo en cuenta varios procesos biológicos, sin embargo, basados en resultados previos de nuestro grupo [49], en donde a partir de ADNc se amplificó la secuencia completa (924 pb) que codifica una proteína de 33.7 kDa, se plantea que la enzima puede ser blanco de modificaciones post transcripcionales.

La organización génica en *Leishmania spp* es especial entre eucariotas, pues no contiene intrones [96]. Los genes se organizan en series de secuencias codificantes en tándem, posicionadas direccionalmente y transcritas de forma policistónica. Además, carecen de la capacidad de regular

el inicio transcripcional de la ARN polimerasa II (RNAP II) al no tener promotores canónicos Pol II. Por lo tanto, la regulación de la expresión génica en estos organismos se produce exclusivamente a nivel postranscripcional e implica el procesamiento del pre-ARNm, la estabilidad de la proteína y el control post traduccional [97].

En detalle, poco se sabe de la síntesis de proteínas en los parásitos protozoarios pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*. Sin embargo, la presencia de la estructura *cap* altamente modificada y la secuencia líder empalmada en el extremo 5' en todos los ARNm sugieren posibles diferencias en el reclutamiento de los ARNm por parte de los ribosomas [98]. Aunque en eucariotas superiores el 95% de la traducción se inicia en el triplete AUG cerca al extremo 5', algunos transcritos eucariotas tienen disposiciones más complejas y la secuencia que rodea el codón AUG puede potenciar o inhibir el inicio de la traducción en ese sitio. Por lo tanto, si el primer triplete AUG aparece en un contexto de reconocimiento de secuencia no óptimo, algunas subunidades 40s omitirán este triplete e iniciarán la traducción en un sitio de inicio posterior mediante un proceso denominado " *Leaky scanning*" [99]. En este sentido es interesante estudiar si la existencia de una variante de la LbNMNAT podría ser producto de un sitio de inicio alternativo en la transcripción.

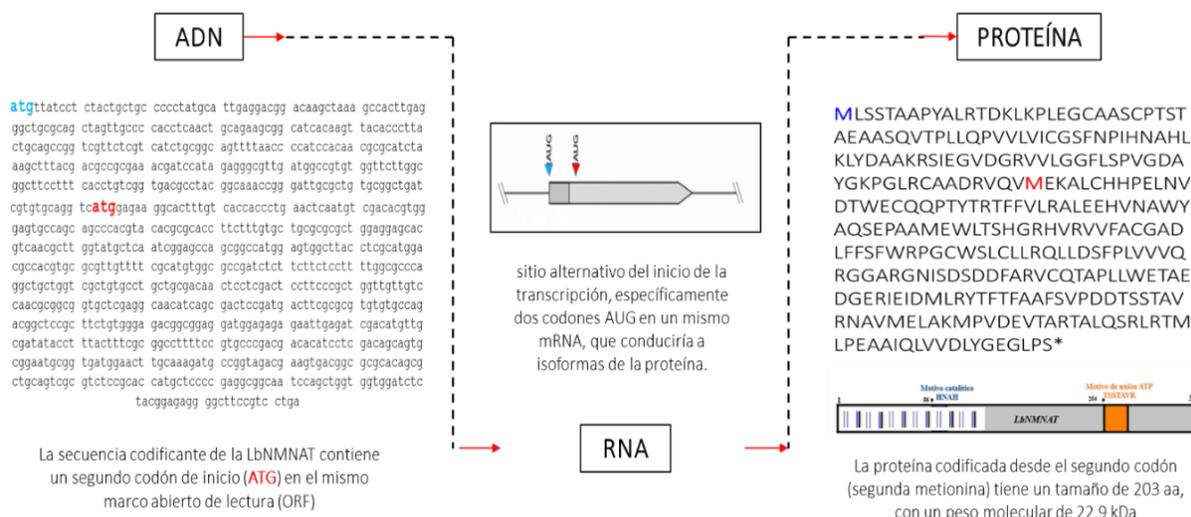
Al analizar la secuencia codificante de la NMNAT de *Leishmania braziliensis* se observa que contiene un segundo codón de inicio (ATG) en el mismo marco abierto de lectura (ORF), que puede ser sitio potencial para el inicio de la traducción (figura 7.17). La secuencia primaria de la proteína codificada desde dicho codón (segunda metionina), presenta un tamaño de 203 aminoácidos y un peso molecular de 22962.1 Da, peso molecular que corresponde con la evidencia experimental obtenida. Por ello, se plantea la posibilidad que del mismo gen que codifica para la LbNMNAT se observe la expresión de la proteína pero con longitudes variables del extremo amino terminal. En este caso, se estudiaría la existencia de un sitio alternativo del inicio de la transcripción, específicamente dos codones AUG en un mismo ARNm, que conduciría a isoformas de la proteína [100].

Se conoce que diversos organismos se benefician de mecanismos elaborados para modificar sus proteínas, creando variantes de las mismas (isoformas), ya sea para aumentar la diversidad de sus funciones como para regular sus actividades. Por ejemplo, en *Leishmania major*, la enzima serin-hidroximetiltransferasa (SHMT) presenta dos isoformas con variación en la extensión del extremo amino terminal lo que les permite tener diferente localización subcelular (citoplasmática y mitocondrial)[101]. En *Saccharomyces cerevisiae* el gen SUC2 invertasa contiene múltiples codones ATG, y la iniciación en el primer sitio produce una proteína invertasa glicosilada que es secretada. Sin embargo, cuando la traducción se inicia desde un AUG cadena abajo, el resultado es una proteína invertasa no glicosilada que permanece en la célula [99].

El gen RAD52 de *Saccharomyces* contiene cinco potenciales sitios de la traducción y se detecta múltiples especies de Rad52 con diferentes movilidades electroforéticas. Estas múltiples especies de proteínas se deben a una elección mezclada de codones de inicio así como a modificaciones postraduccionales [99]. Para el caso de *Drosophila melanogaster* que posee tan sólo un gen *Nmnat*, existe dos codones de inicio en la traducción en el primer exón, lo que aumenta la diversidad de las proteínas. A través de *splicing* alternativo se regula la expresión de variantes *DmNmnat*

funcionalmente distintas. La enzima DmNmnat asume dos identidades: una variante que se expresa constitutivamente con una vida media larga, y una variante que exhibe una expresión aumentada de transcritos como respuesta al estrés. Con este modo de regulación postranscripcional, el organismo aumenta la tolerancia celular al estrés sin agregar nuevos genes [102].

Figura 7.17. Análisis de un sitio alternativo del inicio de la transcripción en la secuencia codificante de la LbNMNAT.



7.5.1 Construcción, expresión y evaluación de la actividad enzimática de la proteína recombinante 6xHis Δ_{1-104} LbNMNAT.

Para llevar al plano experimental la proteína codificada desde el segundo codón de inicio y verificar si ésta versión es activa, se buscó la expresión de la recombinante mediante la construcción del vector pQE30- Δ_{1-104} LbNMNAT utilizando la técnica de subclonación en el vector pGEMT-easy.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la construcción de los dos vectores: en la figura 7.18 se encuentran los pasos de clonación para la creación del constructo pGEMT- Δ_{1-104} LbNMNAT que fue empleado como plantilla de la secuencia de interés. Una vez corroborada su identidad mediante PCR y tratamiento con enzimas de restricción, el inserto se ligó con el vector pQE30 digerido. Los resultados de la técnica de subclonación se resumen en la figura 7.19.

Figura 7.18. Construcción del plásmido recombinante pGEMT- Δ_{1-104} LbNMNAT. (A). Mapa del plásmido recombinante, figura generada con el programa SnapGene Viewer 3.3.3. (B). Amplificación del fragmento Δ_{1-104} lbnmnat (~632pb) mediante PCR utilizando ADN genómico como plantilla. El producto amplificado se purificó desde el gel y se ligó con el vector de clonación pGEMT-Easy. La reacción de ligación se empleó para transformar células *E. coli* TOP 10. (C). Análisis mediante PCR de colonia, amplificación del inserto Δ_{1-104} lbnmnat, C+ (control positivo vector pQE30-LbNMNAT como plantilla) C- (control negativo, agua como plantilla). (D). Generación virtual del gel de agarosa al 1% (p/v) de la reacción de doble digestión con BamHI y KpNI del vector recombinante en el programa NEBcutter V2.0. (E). Gel de agarosa al 1% (p/v), tratamiento del vector pQE30 vacío y con inserto con las enzimas de restricción BamHI y KpNI.

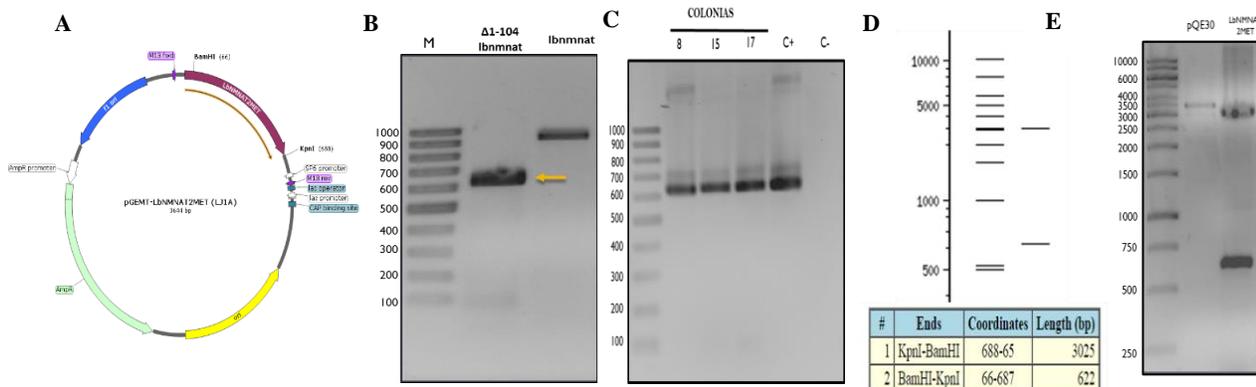
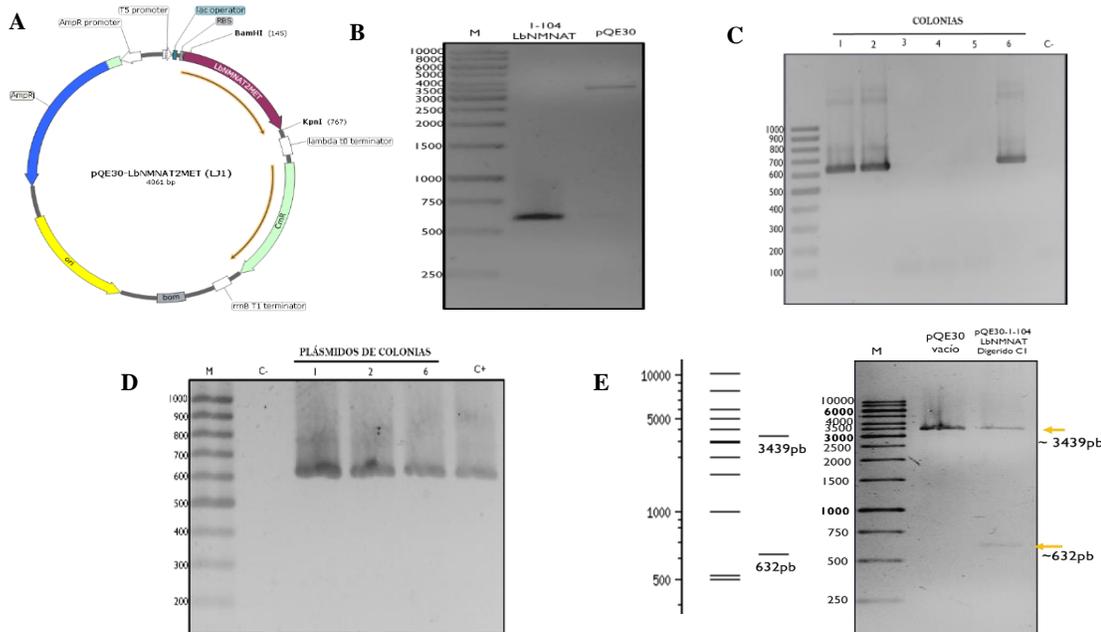


Figura 7.19. Construcción del plásmido recombinante pQE30- Δ_{1-104} LbNMNAT. (A). Mapa del plásmido recombinante. Figura generada con el programa SnapGene Viewer 3.3.3. (B). Fragmento Δ_{1-104} lbnmnat purificado y plásmido pQE30 previamente digerido con las enzimas de restricción KpnI y BamHI. Estas muestras se ligaron y la reacción de ligación se empleó para transformar células *E. coli* JM109. (C). Análisis mediante PCR de colonia, amplificación del inserto Δ_{1-104} lbnmnat, C- (control negativo, agua como plantilla). (D). Confirmación de la identidad del plásmido mediante PCR, amplificación del inserto delecionado (~632pb). C+ (control positivo vector pQE30-LbNMNAT como plantilla). (E). Gel de agarosa al 1% (p/v), tratamiento del vector pQE30 vacío y con inserto con las enzimas de restricción BamHI y KpNI.

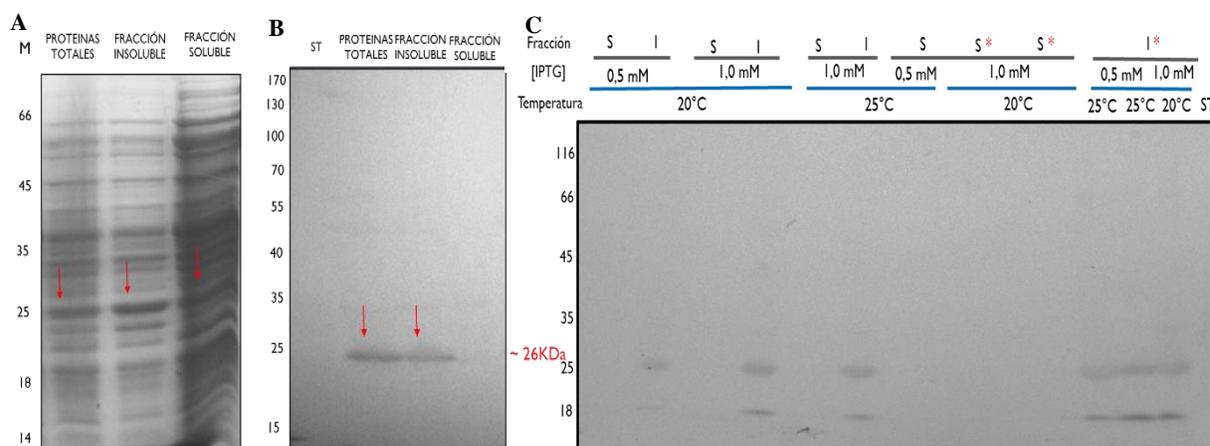


La proteína de ~26kDa, dada la adición de la cola de histidinas, fue expresada en el sistema bacteriano *E. coli* BL21 (DE3) encontrándose mayoritariamente en la fracción insoluble (Fig. 7.20 A-B). Se

emplearon diferentes estrategias para optimizar la producción de la proteína en la fracción soluble. Se varió la temperatura de inducción (20 y 25°C), la concentración del inductor (IPTG 0.5 y 1.0 mM) y se modificaron las condiciones del medio LB con la incorporación de glicerol (0.6 M) y etanol (3% v/v) como aditivos que facilitan el plegamiento y estabilizan la conformación proteica; a pesar de ello, ninguna de las condiciones mostró aumento significativo en la solubilidad (Figura 7.20 C).

Como estrategia alterna, se empleó la cepa de expresión *E. coli* SHuffle, que favoreció parcialmente el correcto plegamiento de la recombinante y permitió la inmunodetección de la fracción soluble pese a que la proteína se expresó de manera mayoritaria como cuerpos de inclusión (figura 7.21 A-B). Mediante cromatografía de afinidad a níquel, se logró enriquecer y purificar parcialmente el mutante (figura 7.21 C). Se observó co-purificación de complejos macromoleculares de *E. coli* debido a que varias proteínas bacterianas nativas exhiben una afinidad relativamente alta por cationes divalentes. Se conoce que la mayoría de estas proteínas corresponden a enzimas sensibles al estrés, producidas en gran cantidad como respuesta celular a la expresión proteica heteróloga [103].

Figura 7.20. Expresión de la proteína recombinante 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT (~26kDa) en *E. coli* BL21 (DE3) como cuerpos de inclusión. Proteínas totales, fracción soluble (S) e insoluble (I) analizadas mediante SDS-PAGE 12% (A) y mediante western blot utilizando el anticuerpo primario anti-6xHis y el sistema de revelado con fosfatasa alcalina (B). La modificación de las condiciones de cultivo con aditivos, cambios de la temperatura de inducción y concentración del inductor (IPTG) para fracciones solubles e insolubles se analizaron mediante western blot. ST (*E. coli* BL21 sin transformar), los asteriscos son las muestras cuyos medios contenían adicionalmente glicerol 0.6M y etanol 3% (C).



Con el fin de evaluar la capacidad de sintetizar NAD^+ por parte de la recombinante, se realizaron ensayos enzimáticos acoplados medidos espectrofotométricamente a 340 nm y ensayos directos por RP-HPLC (figura 7.22). Por los dos métodos se observó que la proteína no presenta actividad adenililtransferasa. Como control positivo de actividad se utilizó la proteína 6xHis-LbNMNAT codificada desde el primer codón de inicio de la secuencia estudiada.

Figura 7.21. Solubilización y purificación parcial de la proteína recombinante 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT (~26kDa). Células *E. coli* Shuffle sin transformar (ST) y transformadas con el vector pQE30- Δ_{1-104} LbNMNAT. **(A y B)** Fracciones solubles e insolubles de diferentes clones (C1, C2 y C3) analizadas mediante SDS-PAGE 12% y western blot (anti-6xHis y el sistema de revelado con fosfatasa alcalina, (*inespecificidad anticuerpo 2°)). **(C).** Purificación parcial de la recombinante mediante IMAC.

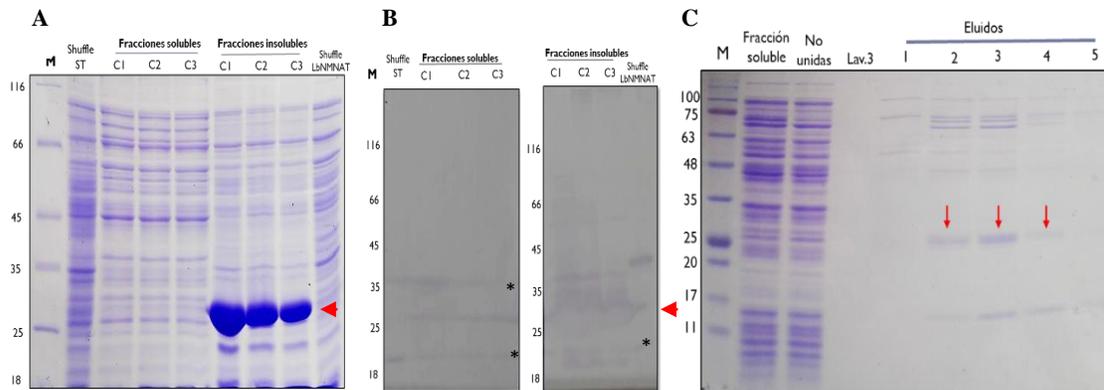
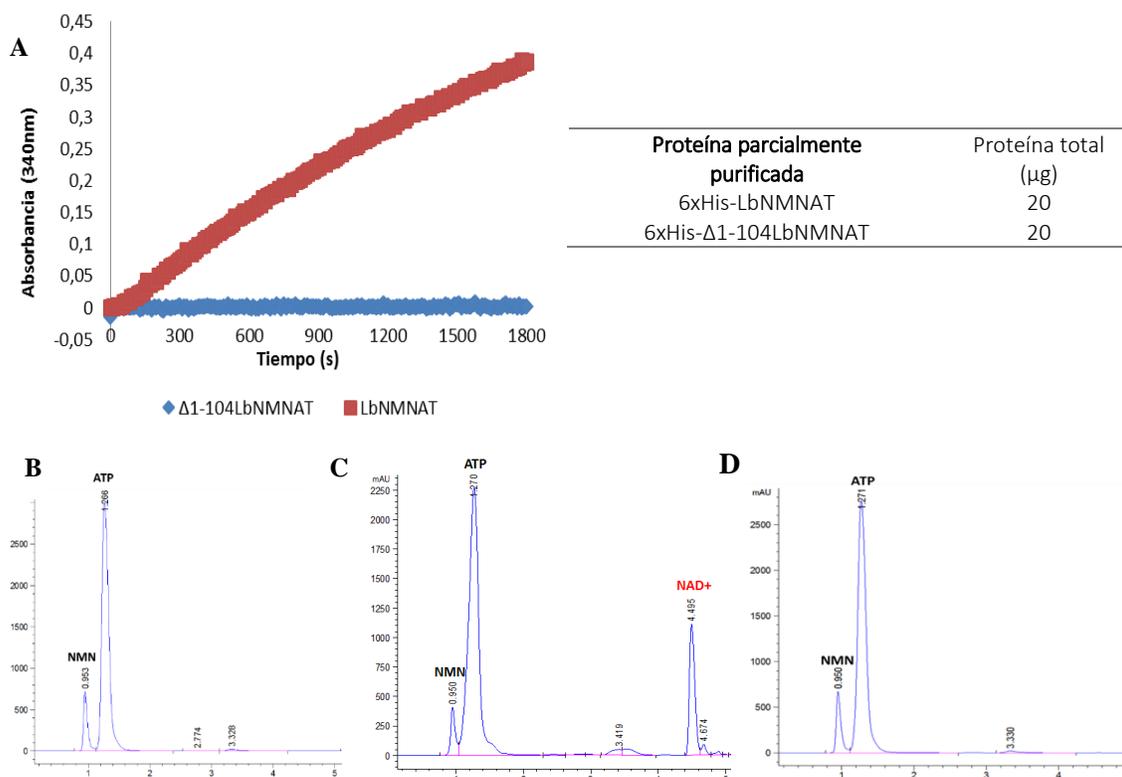


Figura 7.22. La proteína recombinante 6xHis- Δ_{1-104} LbNMNAT no presenta actividad adenililtransferasa. **(A)** Ensayos enzimáticos acoplados para las proteínas recombinantes (silvestre y mutada) parcialmente purificadas mediante cromatografía de afinidad a Ni-NTA. (En la tabla se especifica la cantidad de proteína empleada para el ensayo). La síntesis de NAD⁺ se verificó mediante RP-HPLC. Se indican los picos correspondientes para los sustratos NMN y ATP, así como para el producto NAD⁺. Evaluación de la actividad enzimática de: **(B)** Buffer de reacción (control negativo de actividad). **(C y D)** Proteínas silvestre 6xHisLbNMNAT y 6xHis Δ_{1-104} LbNMNAT parcialmente purificadas, respectivamente.



Para estudiar los posibles cambios estructurales presentados por la enzima, se generaron modelos tridimensionales con los que se comparó topológicamente las proteínas LbNMNAT y Δ_{1-104} LbNMNAT. Con la pérdida de los aminoácidos del extremo amino terminal hay modificación en la arquitectura del plegamiento Rossmann (Figura 7.23). Aunque la proteína de menor tamaño conserva el motivo de unión al mononucleótido de nicotinamida, pierde uno de los motivos de reconocimiento de ATP. De manera conservada en las NMNATs se encuentran dos motivos: el motivo conservado [H/T]xGH presente en el sitio activo que media el reconocimiento del ATP y la unión por parte de la NMNAT, y el motivo conservado ISSTxxR, que se sospecha facilita la unión del sustrato en el sitio catalítico y media la interacción con el fosfato- γ del ATP y, posiblemente, el PPI de salida [80]. La no existencia del motivo [H/T]xGH en la versión 1-104 se puede relacionar con la pérdida de la actividad NMNAT (Figura 7.24).

Figura 7.23. Modelos predictivos de la estructura terciaria de las proteínas LbNMNAT y Δ_{1-104} LbNMNAT. (A). Proteína silvestre, C-score= -1.46, TM-score= 0.53 ± 0.15 . (B) Δ_{1-104} LbNMNAT, C-score= -0.66, TM-score= 0.63 ± 0.14 . (C) superposición estructural de la proteína silvestre (azul) con el mutante (violeta), con valor RMSD de 0,623 Å. En verde se señalan la región ausente. Visualización en UCSF Chimera 1.10.1.

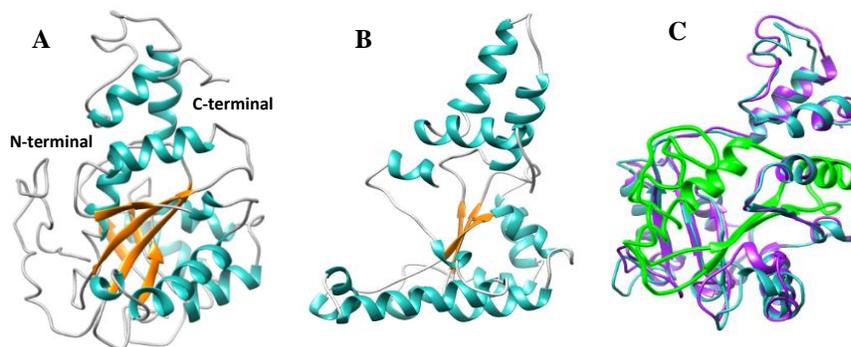
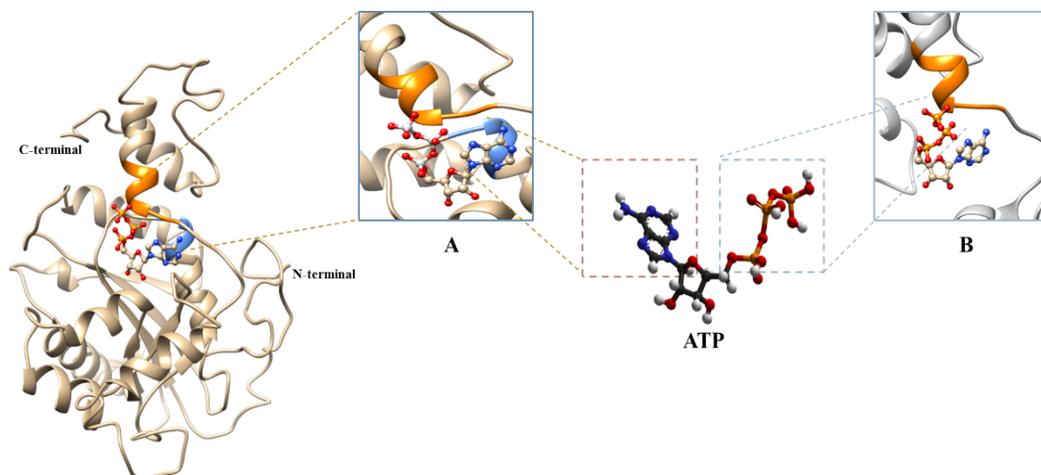


Figura 7.24. Motivos de unión a ATP en las proteínas LbNMNAT y Δ_{1-104} LbNMNAT según el modelo de estructura terciaria. Se resaltan el motivo [H/T]xGH (amino terminal-Azul) y el motivo ISSTxxR (carboxi terminal-naranja) de la LbNMNAT (A). Sitio de reconocimiento de unión a ATP en la proteína silvestre. (B). Sitio de reconocimiento de unión a ATP en la proteína mutada. Visualización en UCSF Chimera 1.10.1.

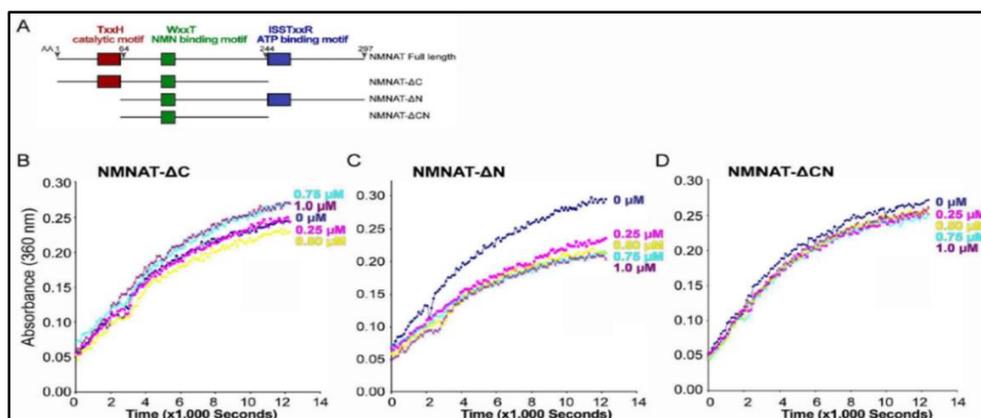


7.5.2 Estudio de la actividad chaperona de las NMNATs

Diversas investigaciones han demostrado funciones adicionales para la NMNAT, incluyendo un papel potencial en el proceso de reparación del ADN a través de interacciones proteína-proteína y funciones neuroprotectoras en el sistema nervioso de ratón, rata y *Drosophila* [80]. En este último modelo se mostró la actividad protectora de la NMNAT con enzimas inactivas indicando la existencia de funciones adicionales independientes a su actividad sintetizadora de NAD⁺ [104]; hecho que llevó al descubrimiento de su función chaperona. Investigadores demostraron tanto en ensayos bioquímicos como con células cultivadas que la NMNAT de *Drosophila* (DmNMNAT) tiene función chaperona, y comparte similitud estructural significativa con chaperonas conocidas [105]. Para la NMNAT-2 de *Homo sapiens* también se ha determinado esta función [106].

Para establecer la actividad chaperona de la NMNAT mediante ensayos *in vitro*, se evalúa la capacidad de reducir la agregación térmica de una proteína modelo como la citrato sintasa (CS) o la insulina. En la investigación de Grace Zhai et al [105], se observó que la DmNMNAT al igual que la chaperona Hsp70, reducen eficientemente la agregación térmica inducida de la CS en ausencia de ATP y de manera dependiente de la concentración, confirmando su actividad chaperona. Resultados similares registraron al evaluar versiones de la DmNMNAT enzimáticamente inactivas, lo que mostró que la actividad chaperona de NMNAT es independiente de su síntesis de NAD⁺. Para establecer qué dominio específico estaba asociado con esta función, crearon tres proteínas truncadas: la NMNAT- Δ C, que elimina el dominio carboxi-terminal incluyendo el motivo de unión a ATP; la NMNAT- Δ N, que elimina el motivo catalítico N-terminal; y la NMNAT- Δ CN, que elimina los extremos amino y carboxi. Como se muestra en la figura 7.25-C, el motivo catalítico N-terminal no es esencial para la actividad chaperona; sin embargo, se requiere el dominio C-terminal que contiene el dominio de unión a ATP, ya que ni NMNAT- Δ C ni NMNAT- Δ CN tienen actividad de chaperona (figura 7.25 B y D). Datos que proporcionan evidencia adicional de que las actividades de chaperona y de síntesis de NAD⁺ de la NMNAT se pueden dissociar [105].

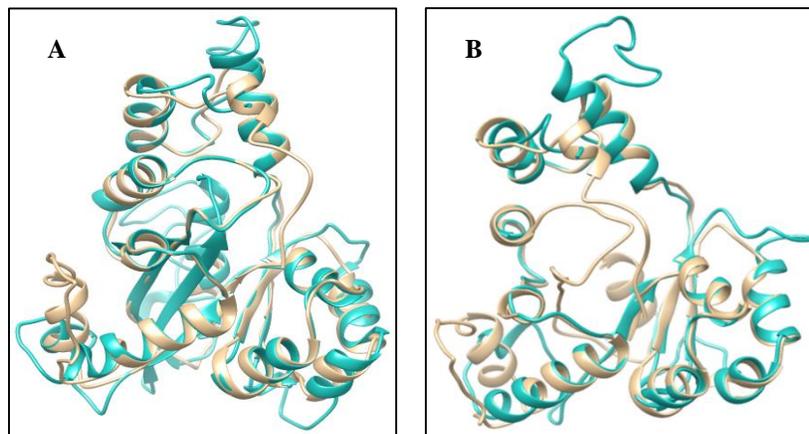
Figura 7.25. La región N-terminal de la DmNMNAT no es necesaria para la actividad chaperona. (A) Diagrama de las estructuras y dominios de la NMNAT de longitud completa y truncada. NMNAT- Δ C elimina el dominio de unión a ATP C-terminal (1-244). NMNAT- Δ N elimina el motivo catalítico N-terminal (64-297). NMNAT- Δ CN elimina los dominios N-terminal y C-terminal (64-244). (B-D) Actividad chaperona de las proteínas NMNAT truncadas. Tomada de [105].



La existencia de mutantes delecionales que suprimen el motivo de unión a ATP en el extremo amino terminal y conservan su actividad chaperona, dan paso a la importancia de evaluar si la NMNAT de *Leishmania braziliensis* puede actuar como chaperona molecular y si versiones de la proteína con longitud variable del extremo N-terminal, pueden ser expresadas en el parásito para llevar a cabo este papel biológico.

Incurсионando en el análisis de la LbNMNAT como potencial chaperona, se realizó una comparación estructural con la isoforma B de la NMNAT de *Drosophila melanogaster*, específicamente con la versión truncada NMNAT- Δ N que elimina el motivo catalítico N-terminal y que presenta actividad chaperona [105]. Se contrastó el modelo tridimensional de la DmNMNAT- Δ N con los modelos de la LbNMNAT silvestre y la proteína Δ_{1-104} LbNMNAT, encontrando que presentan alta similitud estructural. Las versiones truncadas de la NMNAT de *Drosophila* y *Leishmania* comparten varios elementos estructurales que pueden estar involucrados en el plegamiento de proteínas y que permiten postular a la Δ_{1-104} LbNMNAT como posible chaperona, siendo necesario llevarlo al plano experimental para corroborarlo (figura 7.26).

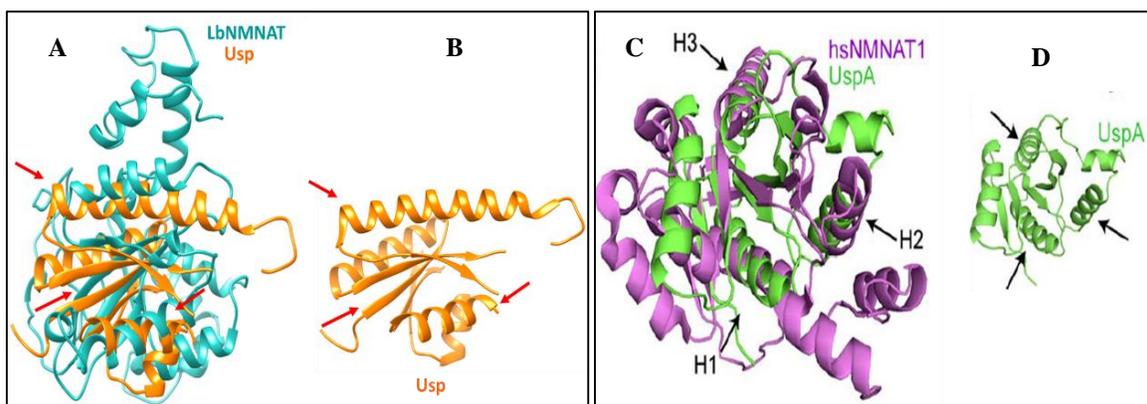
Figura 7.26. La LbNMNAT y la versión Δ_{1-104} LbNMNAT presentan semejanza estructural con la NMNAT- Δ N de *Drosophila melanogaster* que tiene actividad chaperona. (A). Superposición estructural de la LbNMNAT (azul) con la NMNAT- Δ N (dorado) con RMSD entre 145 pares de átomos de 0.632 Å, (entre todos los 207 pares de átomos 4.454 Å. **(B).** Superposición estructural de la Δ_{1-104} LbNMNAT (azul) con la NMNAT- Δ N (dorado) con RMSD entre 135 pares de átomos de 0.602 Å, (entre todos los 168 pares de átomos 6.130 Å).



También se realizó una comparación a nivel de estructura primaria con varias chaperonas de *Leishmania*, pero no se encontró homología de secuencia. Como alternativa, se empleó el servidor DALI [107], que compara estructuralmente la proteína con la base de datos PDB (Protein Data Bank), dando como resultado una lista de vecinos estructurales. Como era de esperar, las proteínas de mayor homología estructural fueron otras adenililtransferasas; sin embargo, de manera interesante se encontró que presenta homología con la proteína Usp (Universal Stress Protein) de *Archaeoglobus Fulgidus* (código 3DLO) que tiene actividad chaperona [108][109]; obteniendo un Z-score de 4.5 (valor >2 presenta semejanza estructural significativa). Las dos proteínas tienen un 7% de identidad y al realizar una superposición estructural se encuentra que en el centro catalítico de la NMNAT dos

hélices α y una lámina β presentan mayor similitud (figura 7.27 A-B). Este tipo de análisis ya se ha realizado con las ortólogas humanas 1 y 3, que tienen semejanza estructural significativa con la UspA (Z-score: 5.1) y a las cuales se les ha determinado experimentalmente su actividad chaperona (figura 6.27 C-D)[80][105].

Figura 7.27. La enzima LbNMNAT y la Usp presentan semejanza estructural significativa. (A). Superposición estructural de la LbNMNAT (azul) con la Usp (naranja), con un 7% de identidad y un RMSD entre los 114 pares de átomos de 11.859 Å, entre los 12 pares de átomos de mayor superposición 1.329 Å. (B). Estructura cristalina de la Usp (código 3DLO). Visualización en UCSF Chimera 1.10.1. (C) Superposición estructural de NMNAT1 y UspA, con un 13% de identidad y una RMSD de 3.0 Å para la longitud de la proteína UspA. (D) Estructura cristalina de la UspA. Figuras (C y D) tomadas de [105].

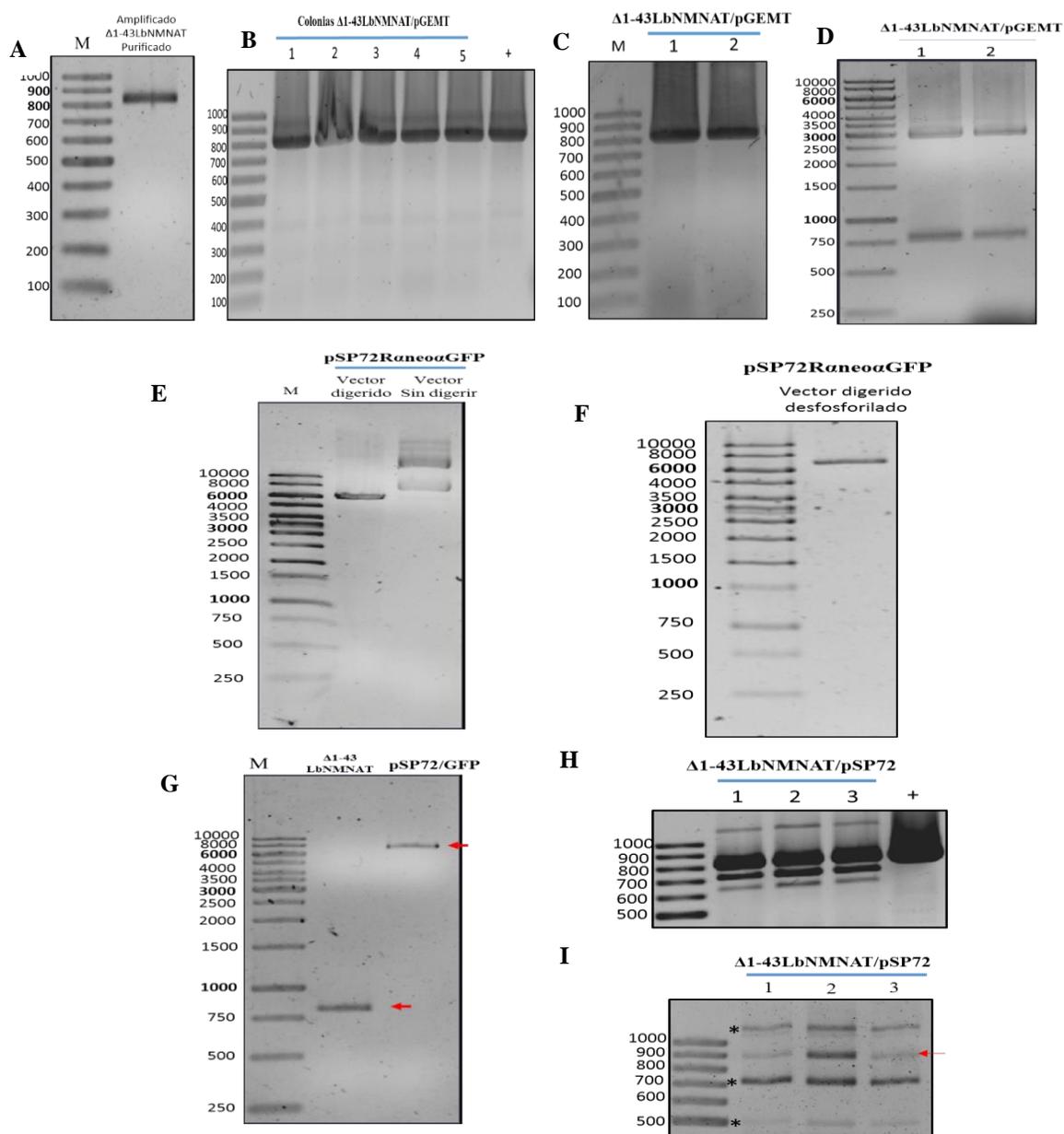


Encontrar elementos estructurales en la LbNMNAT que se asemejan a proteínas con actividad chaperona, es el primer paso hacia la confirmación experimental de dicha función. Esta acción dual sería de gran utilidad para el parásito, en especial, a la hora de responder a los cambios ambientales que sufre a medida que avanza en su ciclo de vida. La adaptación a dos entornos distintos (los macrófagos en el hospedador y el intestino del insecto), generan importantes diferencias en temperaturas, pH, nutrientes y defensas, que requiere cambios importantes en la expresión génica.

7.6 Estudio *in vivo* del efecto delecional del extremo amino terminal de la LbNMNAT en la localización sub-celular.

Además de estudiar la función de las inserciones en la actividad enzimática, también se estudió su rol en la localización sub-celular a partir de la expresión de los mutantes en promastigotes de *L. braziliensis*. Se trabajó con el mutante Δ_{1-43} LbNMNAT construyendo el vector de interés mediante sub-clonación en pGEMT y usando el plásmido pSP72R α neo α GFP. En la figura 7.28 se muestra los resultados de dicha estrategia experimental

Figura 7.28. Construcción de los plásmidos pGEMT- Δ_{1-43} LbNMNAT y pSP72 Δ_{1-43} LbNMNAT-GFP. El vector para la expresión de la proteína mutada en *Leishmania* fue construido por sub-clonación. Inicialmente se construyó el vector pGEMT- Δ_{1-43} LbNMNAT **(A)**. Amplificación del fragmento Δ_{1-43} lbnmnat (~800pb) mediante PCR utilizando ADN genómico como plantilla. El producto amplificado se purificó desde el gel y se ligó con el vector de clonación pGEMT. La reacción de ligación se empleó para transformar células *E. coli* TOP 10. **(B)**. Análisis mediante PCR de colonia, amplificación del inserto, + (control positivo vector pQE30-LbNMNAT como plantilla) **(C)**. Confirmación de la identidad del plásmido mediante PCR, amplificación del inserto deletado **(D)**. Tratamiento del vector pGEMT-- Δ_{1-43} LbNMNAT con la enzima de restricción XbaI. **Construcción del plásmido pSP72 Δ_{1-43} LbNMNAT-GFP.** **(E)** Vector pSP72Raneo α GFP sin digerir y digerido con la enzima XbaI. **(F)** Vector pSP72Raneo α GFP linealizado y sometido a desfosforilación con la enzima CIAP. **(G)**. Este plásmido linealizado y desfosforilado y el fragmento Δ_{1-43} lbnmnat purificado se ligaron y la reacción de ligación se empleó para transformar células *E. coli* Top 10. **(H)**. A tres de las colonias positivas se les realizó extracción del plásmido y estos se analizaron mediante PCR de colonia, amplificación del inserto Δ_{1-43} lbnmnat, + (control positivo, ADNg), *además se detectan algunas bandas adicionales debido a inespecificidad de los primers **(I)**. Verificación de la direccionalidad del inserto en el vector mediante PCR. Empleando uno de los primers del inserto y otro sobre el vector. Para la confirmación del vector se esperan resultados de secuenciamiento.



Para determinar los patrones de distribución subcelular de la proteína mutada en sus primeros 43 residuos, se buscó la expresión del transgen Δ_{1-43} lbnmnat-gfp en la fase móvil del parásito, por lo que el plásmido anteriormente construido se utilizó para transfectar promastigotes de *L. braziliensis*, los cuales se seleccionaron en medios suplementados con geneticina G418. A la fecha no se han obtenido parásitos viables, pero se sigue trabajando en ello. Una vez se establezca la línea celular, se observará la localización de la proteína directamente por fluorescencia de GFP. Adicionalmente, se abordó la construcción de los vectores pSP72 α neo α Δ_{8-42} LbNMNAT-GFP y pSP72 α neo α $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT-GFP mediante mutagénesis dirigida por PCR. Sin embargo, tras múltiples ensayos y modificaciones de reacción no ha sido posible la obtención de los mismos y se sigue trabajando en la estandarización del procedimiento.

En un trabajo anterior [13], en ensayos de inmunodetección con anticuerpos anti His-LbNMNAT y la expresión de la proteína LbNMNAT-GFP, se observó un patrón de localización primordialmente citosólico para la proteína silvestre en promastigotes y amastigotes del parásito. Al evaluar la secuencia del mutante con el predictor SignalP 4.1 [110], no se encuentra un péptido señal, por lo que es de esperar que no se altere su localización sub-celular. Situación opuesta a lo encontrado en la NMNAT1 humana [38], que presenta una región específica (ISTID) y su eliminación cambia drásticamente su localización nuclear. Por esta razón, es necesario llevar al plano experimental la determinación de la localización del mutante.

CAPITULO 2

Exploración de posibles interacciones de la NMNAT de *Leishmania braziliensis* con otras proteínas implementando herramientas experimentales y análisis de redes.

- Aproximación experimental

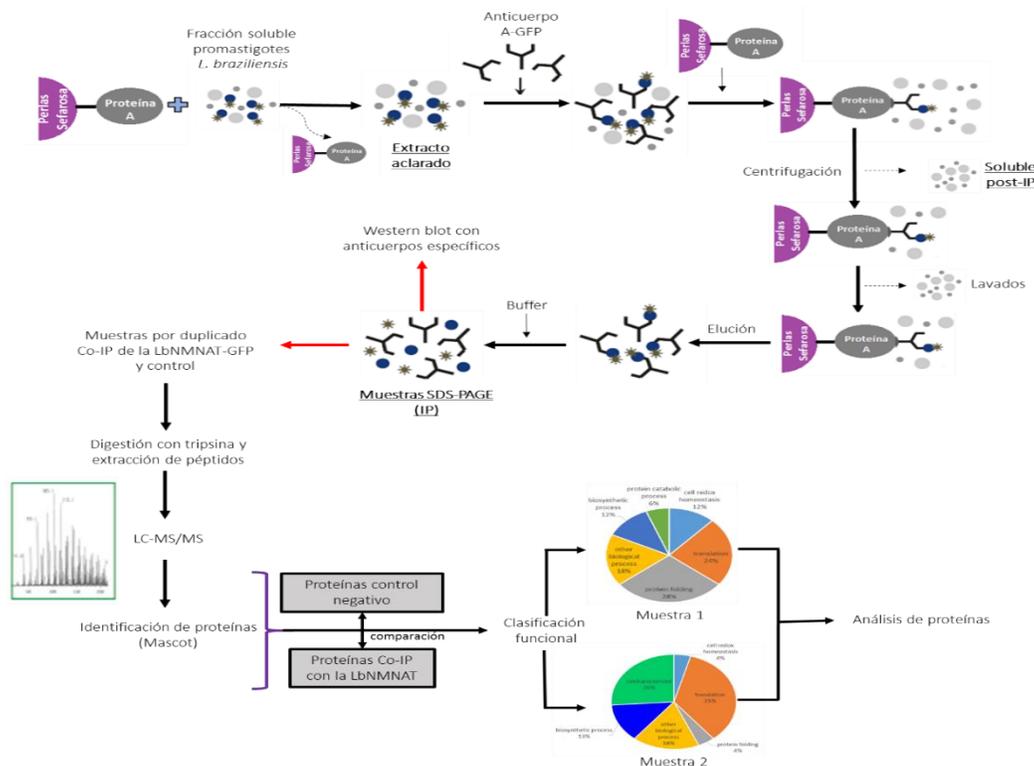
Además de la caracterización bioquímica y funcional de la LbNMNAT como miembro clave en el metabolismo del NAD⁺, es necesario incursionar en su contextualización biológica y su participación en rutas celulares partiendo de su asociación con otras proteínas. Dado que las proteínas generalmente no trabajan de manera aislada, sino que hacen parte de una red dinámica, descubrir socios de interacción de la NMNAT de *Leishmania* puede proporcionar información importante sobre su función en el parásito y direccionar nuevas investigaciones.

Las interacciones proteína-proteína (PPI) están en la raíz de todos los procesos biológicos en condiciones fisiológicas y patológicas [111]. Regulan una variedad de funciones celulares, incluida la progresión del ciclo celular, la transducción de señales, rutas metabólicas, regulación de la expresión génica, transporte vesicular, importe y exporte al núcleo, y la migración celular. Además, son potenciales dianas terapéuticas, que las ubica como objetivos para el desarrollo de fármacos [112]. Se han desarrollado diversas técnicas para identificar PPI que han sido clasificadas categóricamente en tres tipos: *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. En las técnicas *in vitro* un procedimiento dado se realiza en

un entorno controlado fuera de un organismo vivo, aquí encontramos: purificación por afinidad en tándem (TAP), cromatografía de afinidad, co-inmunoprecipitación (Co-IP), complementación de fragmentos de proteínas, cristalografía de rayos X y espectroscopía de RMN. En las técnicas *in vivo*, se realiza el procedimiento en el organismo vivo, por ejemplo, el doble híbridos de levadura (Y2H, Y3H), y en cuanto a las técnicas *in silico* se realizan simulaciones bioinformáticas [41].

Para explorar interacciones de la LbNMNAT se empleó la co-inmunoprecipitación en combinación con la espectrometría de masas; una estrategia ampliamente empleada para la identificación de interacciones proteína-proteína [113]. El acople de estas técnicas permite la identificación rápida, sensible y confiable de miembros discretos en un complejo de proteínas, convirtiéndose en una alternativa atractiva para el descubrimiento de nuevos socios de interacción. Es importante destacar que con esta metodología se han identificado proteínas que interactúan con la proteína de interés, y que también han sido demostradas por otras tecnologías, lo que refuerza la eficacia del uso de MS para identificar interactores de proteínas aisladas [114]. Un esquema general del procedimiento usado en este estudio se muestra en la figura 7.29.

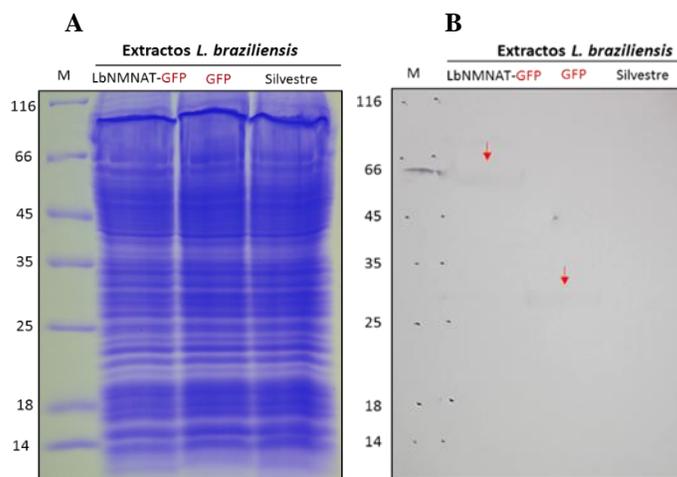
Figura 7.29. Diagrama co-inmunoprecipitación-espectrometría de masas para identificar las proteínas que interactúan con la LbNMNAT. A partir de fracción soluble de promastigotes de *L. braziliensis* transfectados con el vector pSP72 α neoaLbNMNAT-GFP se precipita la LbNMNAT-GFP junto con las proteínas que interactúa con ella mediante el uso del anticuerpo α -GFP acoplado a perlas de sefarosa. Los precipitados son posteriormente analizados por espectrometría de masas, para identificar las proteínas co-precipitadas que potencialmente tienen interacción con la NMNAT.



7.7 Co-inmunoprecipitación de proteínas que interactúan con la enzima LbNMNAT bajo condiciones de sobre-expresión en promastigotes de *L. braziliensis*

Se cultivaron tres líneas celulares de promastigotes de *Leishmania braziliensis*: una silvestre y otras dos transfectadas con el vector pSP72 α neo α LbNMNAT-GFP y el vector vacío (pSP72 α neo α GFP), respectivamente. Se obtuvieron los extractos y se analizaron mediante western blot empleando el anticuerpo anti-GFP, confirmando la expresión de la proteína en el parásito. El vector vacío sobre-expresa la proteína GFP de 27kDa, mientras que el constructo de interés sobre-expresa la LbNMNAT fusionada a GFP (60 kDa) (figura 7.30).

Figura 7.30. Expresión de las proteínas LbNMNAT-GFP (60 kDa) y GFP (27 kDa) en promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Fracciones solubles de promastigotes no transfectados (silvestre), transfectados con el vector pSP72 α neo α LbNMNAT-GFP (LbNMNAT-GFP) y con el vector vacío (GFP) (A). SDS-PAGE 12%, tinción con azul de coomassie. M, marcador de peso molecular. (B). western blot (1° anti GFP 1:500; 2° α -Conejo-HRP (1:1000)).



Una vez establecidas las líneas celulares, se realizaron de manera independiente dos experimentos de co-inmunoprecipitación con extractos de promastigotes que sobre-expresaban la proteína fusionada a GFP. En paralelo, células silvestres transformadas con el vector vacío se sometieron a la misma metodología; este resultado fue usado como control y empleado como referencia en el análisis de datos, con el fin de evitar falsos-positivos consecuencia de la precipitación de proteínas inespecíficas.

Mediante SDS-PAGE y western blot se hizo seguimiento de la co-inmunoprecipitación para cada muestra tratada (figura 7.31), en cada caso se logró detectar la proteína de interés, mostrando que la LbNMNAT puede inmunoprecipitarse de manera adecuada y específica a partir de extractos celulares. Para la detección de una de las muestras co-inmunoprecipitadas de la LbNMNAT-GFP, se empleó tanto el anticuerpo comercial anti-GFP como con el anticuerpo anti-LbNMNAT obtenido en nuestro laboratorio, ratificando el "pull down" de la proteína (figura 7.31 C-1 y C-2). Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron por SDS-PAGE, se tiñeron con azul de Coomassie coloidal G-250

(figuras 7.31) y fueron enviadas a análisis por nano LC-MS/MS. Esas muestras fueron reducidas, alquiladas y posteriormente digeridas con tripsina. Los péptidos resultantes se concentraron mediante liofilización y se re disolvieron para ser inyectados en un instrumento Bruker Maxis Impact QTOF. Para los péptidos se permitió máximo una ruptura fallida de tripsina con una tolerancia de masa de 10 ppm y una tolerancia de masa de fragmentación de 0.05 Da. Los espectros MS/MS se emplearon para la búsqueda en la base de datos Mascot, empleando el algoritmo de puntuación por probabilidad (www.matrixscience.com).

Las proteínas con la mejor coincidencia significativa son los datos registrados en las tablas 7.6 y 7.7. Es de remarcar que se realizó una comparación entre las proteínas identificadas en el control y aquellas presentes en las muestras problema. Los miembros de las tablas son el producto de este análisis y los interactores co-inmunoprecipitados exclusivamente en presencia de LbNMNAT y no por interacción con GFP (los resultados del control se muestran en el anexo 6).

Teniendo en cuenta los datos de las dos muestras biológicas analizadas, se identificaron un total de 38 proteínas, entre las cuales 18 son putativas y 4 conservadas. Las proteínas putativas son proteínas predichas expresadas a partir de ORFs para los que no hay evidencia experimental de traducción, sin embargo, comparte similitud de secuencia con proteínas caracterizadas. Las proteínas conservadas se definen como una fracción de los productos genéticos que se encuentran en organismos de varios linajes filogenéticos que no han sido funcionalmente caracterizados o descritos a nivel de proteína [115]. Todas las proteínas identificadas fueron agrupadas según su función biológica (figura 6.31). Las funciones putativas se obtuvieron en las bases de datos UniProt (www.uniprot.org), GeneDB (www.genedb.org) y TriTrypDB (www.tritrypdb.org); sin embargo, a seis de las secuencias estudiadas no se les encontró función putativa.

Las proteínas de cada experimento se clasificaron en siete grupos: aquellas involucradas en el proceso de traducción, en plegamiento de proteínas, homeostasis redox, procesos biosintéticos, procesamiento del ARN, otros procesos biológicos y proteínas con función no caracterizada. Contrastando los dos ensayos, se encontraron proteínas relacionadas con las mismas funcionales celulares, pese a que hubo variación en el número y los miembros de cada grupo (figura 7.32).

Como se mencionó anteriormente, las muestras 1 y 2 son producto de dos experimentos independientes, distanciados temporalmente y provenientes de diferentes cultivos celulares; aspectos que pueden interferir en los resultados obtenidos. En el caso de muestras provenientes de distintos cultivos celulares “asincrónicos” en donde los promastigotes sufren procesos de replicación y diferenciación de varios estadios morfológicamente distinguibles, se puede encontrar cambios bioquímicos relevantes. Se ha establecido que en cultivos *in vitro*, los promastigotes de *Leishmania* presentan variaciones morfológicas correlacionadas con el desarrollo del parásito y asociadas con cambios genéticos y bioquímicos, que en algunos casos pueden modular funciones biológicas [116]. Varios informes reportan que los promastigotes en diferentes etapas del cultivo *in vitro* difieren significativamente entre sí en términos de la composición de su metaboloma, en cambios en metabolitos individuales, grupos de metabolitos y reacciones enzimáticas involucradas en la producción de metabolitos [117].

Figura 7.31. Identificación de proteínas que co-inmunoprecipitan con la NMNAT de *L. braziliensis*. (A). Control negativo. Muestras obtenidas durante protocolo de Co-IP de extracto de promastigotes que expresan el vector vacío (extracto aclarado, solubles post IP e IP, pasos señalados en figura 6.28). (A-1). SDS-PAGE 12%, tinción con azul de Coomassie. (A-2). SDS-PAGE 12% del inmunoprecipitado (IP), teñido con Coomassie coloidal (G-250), cortado y analizado por Nano-LC-MS/MS. (A-3). Western blot, 1° anti-GFP (1:500), 2° anti conejo-biotina (1:5000). (B y C). Muestras obtenidas durante protocolo Co-IP de extractos de promastigotes transfectados con el vector pSP72ane α LbNMNAT-GFP. (B-1). SDS-PAGE 12%, tinción con azul de Coomassie. (B-2). SDS-PAGE 12% del IP, teñido con Coomassie coloidal (G-250), cortado y analizado por Nano-LC-MS/MS. (B-3). Western blot, 1° anti-GFP (1:500), 2° anti conejo-biotina (1:5000), los asteriscos * indican posibles productos de procesamiento o degradación de la recombinante LbNMNAT-GFP (C). Duplicado Co-IP de extractos con sobre-expresión de la LbNMNAT-GFP, a las mismas muestras se les realizó inmunodetección con: (C-1). Western blot, 1° anti-GFP (1:5000), 2° anti conejo-biotina (1:10000). La estrella señala la cadena pesada del anticuerpo 1° (C-2). Western blot, 1° anti-LbNMNAT (1:5000), 2° anti mouse-biotina (1:10000). El IP de esta muestra también fue corrido en SDS-PAGE 12%, teñido con Coomassie coloidal (G-250), cortado y analizado por Nano-LC-MS/MS.

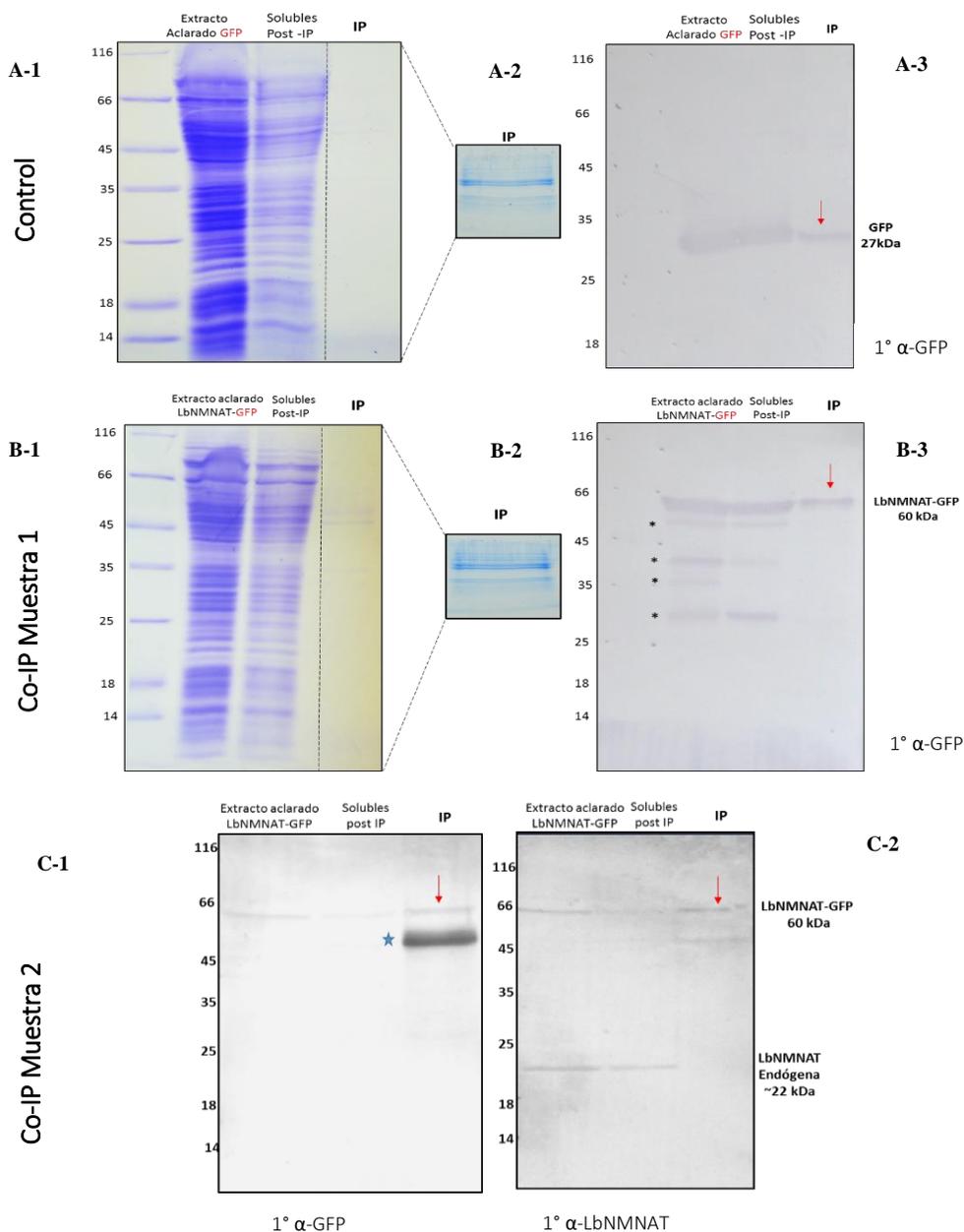


Tabla 7.6. Proteínas identificadas en co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas para la LbNMNAT-GFP. (Muestra 1)

Access: número de acceso en UniProt. MW (kDa), peso molecular en kilo Daltons; pI, punto isoelectrico teórico; MS score, score de identificación dado por Mascot; % Seq, porcentaje de cubrimiento de secuencia. Los términos GO relevantes para función molecular y procesos biológicos fueron obtenidos de la base de datos UniProt.

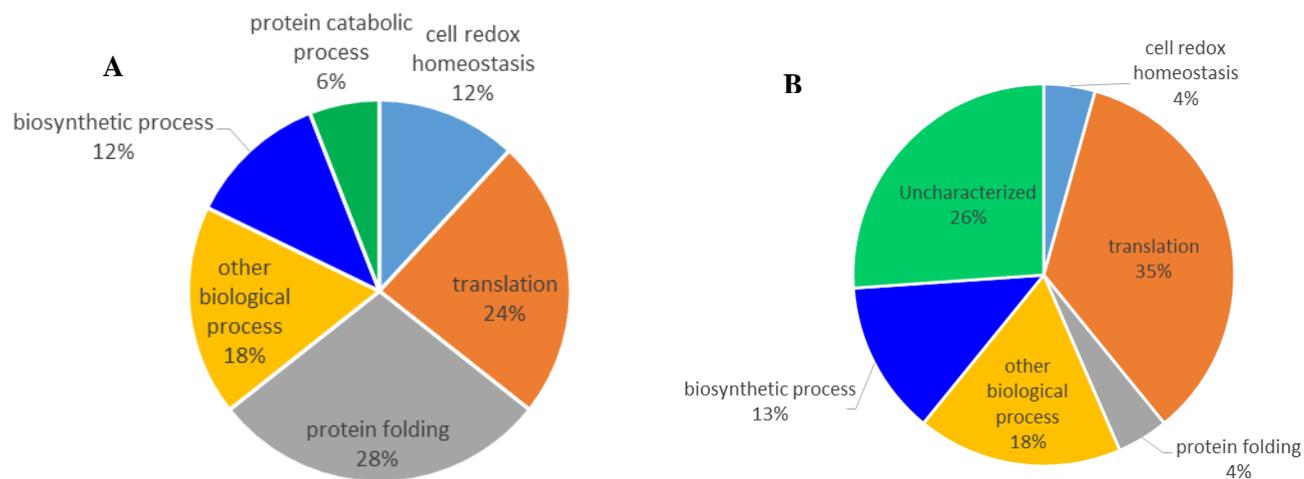
<i>Access</i>	<i>Gene name</i>	<i>Protein name</i>	<i>MW (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>MS score</i>	<i>% Seq</i>	<i>Molecular function</i>	<i>Biological process</i>
A4HP69	LBRM_35_2240	Chaperonin HSP60, mitochondrial	60,2	5,13	247	9,9	ATP binding	protein refolding
A4H879	LBRM_15_1100	Tryparedoxin peroxidase	22,6	6,32	238	21,1	peroxidase activity	cell redox homeostasis
A4HCZ3	LBRM_23_1320	T-complex protein 1 subunit gamma	60,9	5,77	221	12,2	ATP binding/unfolded protein binding	protein folding
A4HC91	LBRM_22_0400	Putative 40S ribosomal protein S15	17,4	10,2	201	14,5	RNA binding/structural constituent of ribosome	translation
A4H6T6	LBRM_12_0230	Putative proteasome regulatory ATPase subunit tcc1l8.3	46	8,18	178	11,9	ATP binding/proteasome-activating ATPase activity	protein catabolic process
A4HEE8	LbrM_25_2050	GTP-binding nuclear protein	24,5	6,11	178	37,5	GTPase activity/GTP binding	nucleocytoplasmic transport
A4HE26	LBRM_25_0790	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	19	7,68	178	18,1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	protein folding
E9AIQ3	LBRM_21_1320	T-complex protein 1 subunit delta	60,2	6,69	159	9,6	ATP binding	protein folding
A4HN57	LBRM_34_3840	Putative T-complex protein 1, eta subunit	62,4	6,96	124	5,1	ATP binding	protein folding
A4HQL6	LBRM_35_7320	Protein disulfide-isomerase	52,8	5,43	113	4,8	protein disulfide isomerase activity	cell redox homeostasis
C6KJE0	N/A	Actin	42,4	5,5	104	10,6	ATP binding	
A4HKT8	LBRM_32_3210	Nucleoside diphosphate kinase	17	8,65	104	13,7	ATP binding	C/G/UTP biosynthetic process
A4HCR9	LBRM_23_0580	Acetyl-coenzyme A synthetase	78,8	5,9	92	3,4	ATP binding/ acetate-CoA ligase activity	acetyl-CoA biosynthetic process from acetate
A4H7P0	LBRM_14_0830	Putative calpain-like cysteine peptidase	13	4,7	88	9,6		
A4HDT2	LBRM_24_2290	Putative 60S ribosomal protein L12	17,7	9,82	83	9,1	structural constituent of ribosome	translation
A4HPF3	S24E-1	40S ribosomal protein S24	15,8	10,9	79	11,7	structural constituent of ribosome	translation
A4HF78	LBRM_26_2260	Putative 60S ribosomal protein L35	15,1	11,3	78	8,7	structural constituent of ribosome	translation

Tabla 7.7. Proteínas identificadas en co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas para la LbNMNAT-GFP. (Muestra 2)

Access	Gene name	Protein name	MW (kDa)	pI	MS score	% Seq	Molecular function	Biological process
A4HK56	LBRM_32_0840	putative RNA binding protein	25,3	10,48	552	40,9	RNA binding	
A4HE61	LBRM_25_1150	ATP synthase subunit beta	55,9	5,27	268	9,8	ATP binding	ATP synthesis coupled proton transport
A4H9U8	LBRM_19_0220	Putative seryl-tRNA synthetase	53,6	5,29	226	9,9	ATP binding / serine-tRNA ligase activity	seryl-tRNA aminoacylation
A4HAD7	LBRM_20_0200	conserved hypothetical protein	56,5	4,87	193	7,3	Uncharacterized protein	Uncharacterized protein
A4HLE6	LBRM_33_1110	Putative 40S ribosomal protein S3	24,7	9,82	175	16	RNA binding/ structural constituent of ribosome	translation
A4H877	LBRM_15_1080	Tryparedoxin peroxidase	22,5	6,31	130	11,1	peroxiredoxin activity	cell redox homeostasis
A4HEU3	LBRM_26_0890	Putative 40S ribosomal protein S16	16,7	10,17	126	15,4	structural constituent of ribosome	translation
A4H9H6	LBRM_18_0740	conserved hypothetical protein	77,6	4,53	126	4,6		RNA processing and modification
A4HKU6	LBRM_32_3300	conserved hypothetical protein	97,9	4,84	124	3,9	Uncharacterized protein	Uncharacterized protein
A4HER7	LBRM_26_0630	Putative 10 kDa heat shock protein	10,7	9	121	21	Chaperone	protein folding/ Stress response
A4HACO	LBRM_20_0030	Malate dehydrogenase	33,9	8,72	119	7,6	L-malate dehydrogenase activity	malate metabolic process/tricarboxylic acid cycle
A4HNV2	LBRM_35_1050	Putative 40S ribosomal protein S18	17,5	10,54	108	13,7	RNA binding/structural constituent of ribosome	translation
A4H3H6	LBRM_03_0050	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase-like protein	44,1	6,61	107	9,3	NAD binding/ phosphoglycerate dehydrogenase activity	L-serine biosynthetic process
A4H4D9	LBRM_05_0940	Dipeptidyl peptidase 3	76	5,47	91	3,7	dipeptidyl-peptidase activity/metallopeptidase activity	
A4H9Z7	LBRM_19_0710	Putative 40S ribosomal protein S13	17,5	11,03	86	11,9	structural constituent of ribosome/Ribonucleoprotein	translation
A4HIW5	LBRM_31_0010	Putative 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocystein e S-methyltransferase	86,6	5,97	83	4	Methyltransferase	methionine biosynthetic process

<i>A4HC91</i>	LBRM_22_0400	Putative 40S ribosomal protein S15	17,5	10,27	81	10,5	RNA binding/structural constituent of ribosome	translation
<i>A4HML2</i>	LBRM_34_1820	Putative 60S Ribosomal protein L36	12,02	11,26	68	13,3	structural constituent of ribosome	translation
<i>A4HBW6</i>	LBRM_21_1290	Putative 40S ribosomal protein S23	16	10,58	62	7,7	structural constituent of ribosome	translation
<i>A4HCN4</i>	LBRM_23_0220	Putative endoribonuclease L-PSP (Pb5)	17,3	5,87	56	6,7		
<i>A4HE62</i>	LBRM_25_1160	Ribosomal protein S25	13,1	10,13	55	10	Ribonucleoprotein	
<i>A4HD42</i>	LBRM_23_1820	conserved hypothetical protein	17	4,81	54	8,4	deoxyribonucleoside 5'-monophosphate N-glycosidase activity	deoxyribonucleoside monophosphate catabolic process
<i>A4H746</i>	LBRM_13_0390	40S ribosomal protein S12	15,8	4,77	51	7,2	structural constituent of ribosome	translation

Figura 7. 32. Proteínas co-inmunoprecipitadas agrupadas con base en la función y proceso biológico en el que participan. (A). Muestra 1-Tabla 1. (B). muestra 2-Tabla 2.



7.7.1 Análisis de interacción de proteínas de unión al ARN y constituyentes del ribosoma con la LbNMNAT

En la clasificación funcional de cada complejo de proteínas inmunoprecipitadas se encontró mayoritariamente proteínas relacionadas con el proceso de traducción; un total de 12 secuencias se relacionan con este proceso. Varias de ellas son proteínas de unión al ARN o constituyentes estructurales del ribosoma. Para establecer su potencial vinculación con la LbNMNAT, inicialmente se buscaron interacciones ya caracterizadas de NMNATs homologas de organismos ampliamente estudiados.

En *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo, la NMA1 la enzima homóloga de la NMNAT, presenta interacción física con las proteínas MPT5 y HEK2, ambas proteínas de unión al ARN [118], [119]. La primera de ellas de la familia PUF, implicada en la regulación postranscripcional, se une predominantemente a los ARNm que codifican los modificadores de la cromatina y los componentes del polo del huso; La segunda, HEK2 está relacionada en la localización correcta de transcritos en la célula, es requerida para la localización asimétrica del transcrito ASH1 en el núcleo de la célula hija que codifica un represor específico de la transcripción, además participa en la organización estructural y funcional de los telómeros.

En el humano, se ha identificado experimentalmente que la NMNAT-1 presenta interacción física con RBM4B [120], de unión al ARN y relacionada con la regulación circadiana; con RPL30 (proteína ribosomal L30) constituyente estructural del ribosoma, anclada a varios procesos biológicos incluidos la traducción citoplásmica, respuesta de defensa a bacterias Gram-negativas, procesamiento de ARNr, entre otras. Igualmente, la NMNAT1 interactúa con STAU1 que se une al ARN bicatenario (independientemente de la secuencia) y puede desempeñar un papel en el posicionamiento específico de los ARNm en sitios determinados de la célula al entrecruzar los componentes del citoesqueleto y ARN, y al estimular su traducción en el sitio [120]. Adicionalmente, mediante la técnica "Affinity Capture-MS" se estableció interacción de la HsNMNAT-1 con las proteínas ribosomales L11 (RPL11) y L22 (RPL22) [121], la primera componente esencial de la subunidad grande del ribosoma, necesaria para su formación y la maduración de ARNr y la segunda relacionada con procesamiento de ARNr.

Las proteínas co-inmunoprecipitadas con la LbNMNAT-GFP relacionadas con la traducción, en su mayoría son moléculas que contribuyen a la integridad estructural del ribosoma (proteínas ribosomales S3, S12, S13, S15, S16, S18, S24 y S32 de la subunidad 40S y las proteínas L12, L35 y L36 de la subunidad 60S). Pese a que en otros organismos algunas proteínas ribosomales han sido caracterizadas en otros procesos celulares, la asignación de funciones específicas de las proteínas putativas individuales o la asociación potencial con la LbNMNAT es difícil debido a la enorme cooperatividad del ribosoma y a la compleja arquitectura que se deriva de la red de interacciones que conecta las proteínas entre sí y con los ARNr [122]. También es importante destacar que es factible que no todas las proteínas de este complejo interactúen directamente con la LbNMNAT, porque las interacciones pueden ser coordinadas por otras moléculas en la mezcla, como es el caso

del ARN. Aunque en el momento, analizar la potencial relación de la NMNAT con la maquinaria ribosomal presenta una topología desconocida, sería de gran interés investigar sobre la estabilidad del complejo y las interacciones entre sus diversos componentes, pues el ensamble de ribosomas y la traducción de proteínas están finamente coordinadas con el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación y el desarrollo celular. Además, la NMNAT podría tener una relación indirecta con la biogénesis de los ribosomas, pues dicho proceso consume un 60% de la energía celular y, por tanto, está estrechamente relacionada con el estado energético de una célula [123].

7.7.2 La LbNMNAT puede estar participando en el plegamiento de otras proteínas a través de su interacción con un complejo de chaperonas.

Con relación a otros miembros co-inmunoprecipitados identificados, seis están relacionados funcionalmente con el plegamiento de proteínas, pues tienen actividad chaperona. Las chaperonas moleculares son proteínas esenciales para la homeóstasis del proteoma cuando la célula es sometida a situaciones de estrés, algunas de ellas son necesarias para el plegamiento de *ново* de proteínas y para el mantenimiento de la estructura en condiciones fisiológicas; son capaces de reconocer y unir proteínas no nativas, prevenir la agregación inespecífica de proteínas y ayudar en la adquisición de sus estructuras nativas [124].

En el caso de las proteínas de choque térmico (HSP) no solo ayudan al plegamiento de otras proteínas en condiciones de estrés, sino que también actúan en condiciones normales. En *Leishmania* dado el ciclo dimórfico, el parásito está expuesto a situaciones de estrés debido a cambios de temperatura y de pH (en el vector los promastigotes se encuentran a una temperatura entre 22° y 28°C, pH: 5.0-7.4; mientras que en el hospedero se enfrenta a temperaturas entre 31° y 37°C, pH: 4.0). Estos dos factores influyen en el proceso de diferenciación de promastigote–amastigote trayendo consigo numerosos cambios en la expresión génica. Cambios ambientales tan variables, han favorecido que el parásito adquiera mecanismos de termotolerancia [125]. Entre las HSPs de *Leishmania* destaca la HSP83, una de las proteínas más abundantes del parásito pues representa un 2,8% de la proteína total celular [126], razón que explica su identificación en todos los ensayos de Co-IP realizados, incluido el control; situación similar ocurrió con la HSP70, una de las principales proteínas sintetizadas ante exposiciones a elevadas temperaturas. En el parásito las proteínas de choque térmico y co-chaperonas no solamente tienen funciones protectoras contra la temperatura y el entorno adverso sino que también son efectores y reguladores de vías de transducción de señales y evasión inmune, posiblemente como un mecanismo ante la falta de expresión regulada de genes y factores reguladores en *Leishmania spp* [127].

En nuestros resultados, fueron identificadas dos proteínas de choque térmico: una putativa de 10 kDa y la chaperonina Hsp60 mitocondrial. Las chaperoninas se clasifican en dos grupos: las del grupo I (o HSP60) que se encuentran principalmente en procariotas y en los orgánulos eucariotas derivados de la endosimbiosis (mitocondrias y plastos), y las chaperoninas del grupo II (TRiC/CCT) que están en arqueas y el citosol eucariótico [128]. En el genoma de *Leishmania* existen cuatro genes que codifican chaperoninas mitocondriales (CPN60): CPN60.1 se transcribe, pero su producto no ha sido detectado

por western blot. CPN60.2 está codificado por dos copias de genes, se localiza en la mitocondria e interactúa con CPN10. La tercera chaperonina, CPN60.3, no ha sido analizada hasta el momento. En el caso de CPN10 está codificado por dos copias de genes idénticos y al igual que CPN60.2, está ubicado en la mitocondria y los dos forman complejos estables que co-precipitan [127]. Hsp60 (CPN60.2) junto a la Hsp10 (CPN10) son ortólogos al sistema GroEL/GroES en bacterias [127].

Como fue co-inmunoprecipitada la chaperonina Hsp60 se realizó una búsqueda de interacciones experimentalmente confirmadas de NMNATs de otros organismos, se encontró que mediante *pull down* la homóloga NadD de *E. coli* presenta interacción con GroL (Hsp60) [129][IntAct]. Sin embargo, para entender si existe una posible red de interacción con este tipo de proteínas, se analizó las otras chaperonas identificadas (complejo-T proteína 1 subunidades gamma, delta y eta) [130].

Dado que estamos hablando de un gran complejo de chaperonas, se hizo una red de interacción teórica de este grupo de proteínas empleando el software STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins), una base de datos biológicos que contiene información de numerosas fuentes, incluyendo datos experimentales, métodos de predicción computacional y diversos artículos de libre acceso, que permite predecir interacciones proteína- proteína [131]. Se obtuvo una red de alta confianza, en términos de correlación de los datos de interacción (p-value: 5.67e-05), con un total de 10 nodos y 25 interacciones. Como se observa en la figura 7.33, hay interacción entre las chaperonas identificadas, siendo la proteína putativa Hsp10 el canal entre Hsp60 y las diferentes subunidades de TCP1. En la tabla 7.8 se registran las proteínas involucradas en la red.

Figura 7.33. Las chaperoninas identificadas en la Co-IP interactúan entre sí en una red de interacción teórica. Red generada con STRING V.10.5. Vista tipo confianza. Las asociaciones más fuertes se muestran con líneas más gruesas. Parámetros: Score de confianza: el más alto (0.900). Sin nodos adicionales. Fuentes de interacción empleadas: experimental, bases de datos y co-expresión. Los nodos con una estrella son las proteínas identificadas en la Co-IP.

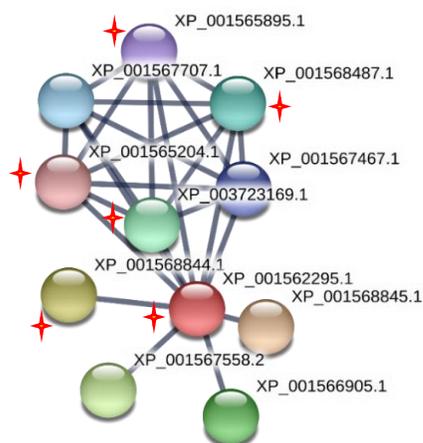


Tabla 7.8. Listado de proteínas que interactúan con la Hsp10 (XP_001562295.1) bajo la predicción en STRING. Se describe su ID, proteínas de interacción predichas y su respectivo score.

Identifier	Predicted functional partners	Score
 XP_001562295.1	Putative 10 kDa heat shock protein (100 aa)	
 XP_001568845.1	Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor (562 aa)	0,998
 XP_001568844.1	Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor (564 aa)	0,998
 XP_001567558.2	Putative chaperonin HSP60, mitochondrial precursor (594 aa)	0,998
 XP_001566905.1	Putative chaperonin HSP60/CNP60 (539 aa)	0,998
 XP_003723169.1	Putative T-complex protein 1, delta subunit	0,994
 XP_001568487.1	Putative T-complex protein 1, eta subunit	0,994
 XP_001567707.1	Putative chaperonin alpha subunit	0,994
 XP_001567467.1	Putative chaperonin containing t-complex protein	0,994
 XP_001565895.1	Putative T-complex protein 1, beta subunit	0,994
 XP_001565204.1	Putative T-complex protein 1, gamma subunit	0,994

A partir de esta red de interacción se establece que es altamente probable interacciones coordinadas entre las diferentes chaperoninas de *L. braziliensis*. Además, una potencial interacción de la LbNMNAT podría estar relacionada con el plegamiento de proteínas y relacionada a una posible función chaperona, estando anclada a una respuesta frente a condiciones de estrés. Este no sería un papel redundante pues es de suma importancia para la supervivencia del parásito.

Interacción NMNAT-chaperona ya se ha registrado, en *Homo sapiens* por ejemplo, la HsNMNAT2 puede actuar como chaperona para reducir los agregados de proteínas, y ésta función es independiente de su actividad conocida en la síntesis enzimática de NAD⁺; adicional interactúa con la proteína de choque térmico 90 (HSP90) para replegar los agregados de proteínas. La eliminación de HsNMNAT2 en neuronas corticales las hace vulnerables al estrés proteico o la excitotoxicidad [106]. Estudios en *Drosophila* han demostrado que la NMNAT es también una proteína de respuesta al estrés, necesaria para la termotolerancia y la mitigación de la vida útil acortada inducida por el estrés oxidativo. La enzima se regula transcripcionalmente durante diversas condiciones de estrés, incluyendo el choque térmico y la hipoxia a través del factor de choque térmico (HSF) y el factor 1 inducible por la hipoxia. La DmNMNAT presenta regulación transcripcional bajo estrés y desempeña un neuroprotector en respuesta a estrés celular [132].

Al comparar la regulación de DmNMNAT y Hsp70 en condiciones de estrés se encontraron notorias diferencias en la regulación transcripcional, sugiriendo que la NMNAT como enzima metabólica y de expresión constitutiva, puede representar una clase diferente de proteínas de respuesta al estrés. Al ser una proteína *housekeeping* está fácilmente disponible en condiciones normales y puede dar una respuesta primaria a una condición de estrés y de ese modo reducir la proteotoxicidad resultante [132].

7.7.3 Proteínas co-inmunoprecipitadas con la NMNAT son importantes en homeóstasis redox.

En relación a las proteínas identificadas vinculadas con la homeóstasis redox, se encontraron las enzimas disulfuro isomerasa (PDI) y triparedoxin peroxidasa (TXNPx), esta última presentando un mayor potencial de interacción con la LbNMNAT al ser identificada en los dos ensayos de co-inmunoprecipitación. La TXNPx participa en la defensa contra el estrés oxidativo como un antioxidante al metabolizar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en moléculas de agua [133].

El parásito es capaz de sobrevivir en el hospedero gracias al metabolismo redox que contrarresta las células producidas por los macrófagos del huésped. Para evitar el daño celular debido a especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ROS o RNI), los tripanosomátidos tienen peroxidases que muestran una característica única en el uso de equivalentes reductores derivados de tripanotión, un ditiol que se encuentra exclusivamente en estos protozoos, en contraste con otros eucariotas que utilizan glutatión y catalasa. La acción combinada de las enzimas antioxidantes tripanotión reductasa (TR), tryparedoxin (TXN) y triparedoxin peroxidasa ((TXNPx) es central para el mantenimiento de una baja concentración de H_2O_2 , regulando el estrés oxidativo y nitrosativo mediante el desplazamiento de equivalentes reductores de NADPH a hidroperóxidos y peroxinitritos [134]. Algunos resultados de análisis funcional han revelado que TXNPx está involucrada en el fenotipo de resistencia al antimonio en *L. braziliensis*, sugiriendo que el aumento de la expresión de esta enzima puede jugar un papel importante en la resistencia clínica a compuestos derivados de este elemento [133].

En cuanto a la proteína disulfuro isomerasa, es miembro de la superfamilia de la tioredoxina, y presenta tres actividades enzimáticas y funcionales específicas: isomerasa, reductasa y chaperona. Actúa dependiendo del entorno redox, pues ayuda a la formación, ruptura o reorganización de enlaces disulfuro en todas las proteínas no nativas a través de sus dos sitios CXXC activos. Esta función permite su actividad como chaperona molecular desempeñando un papel clave en el plegamiento de proteínas [135].

Tanto la triparedoxin peroxidasa como la disulfuro isomerasa ya han sido estudiadas en *Leishmania* [133]–[137], y es necesario establecer si entre ellas existe asociación física, pues sus homólogos en *Homo sapiens* en ensayos de co-inmunoprecipitación presentan interacción [138]. Sin embargo, no se cuenta con información clara para entender y relacionar de manera directa estas enzimas con la NMNAT. A la fecha no se ha encontrado interacción en homólogos de otras especies, ni una conexión evidente entre las dos vías celulares en las que actúan. Por tanto, es necesaria una validación de la asociación mediante otras estrategias experimentales. Por ejemplo, determinar si hay interacción NMNAT-TXNPx con una identificación cruzada, al realizar una co-inmunoprecipitación de la TXNPx endógena de *L. braziliensis* y realizar un western blot con anticuerpos anti-NMNAT. Confirmar este tipo de asociaciones permitiría generar información novedosa en relación a vías metabólicas y de regulación redox en situaciones de estrés, tanto en el parásito como en otros tripanosomátidos.

- **Análisis global de los resultados de interacción de proteínas mediante Co-IP/MS-MS**

La diversidad de proteínas y variedad de funciones celulares obtenidas mediante esta metodología experimental, se puede relacionar con la complejidad celular, pues las interacciones se regulan dependiendo de una señal particular, estímulo o un estado celular específico. Además, dependen de muchos factores, como el tipo celular, el estadio de desarrollo de la célula, la fase del ciclo celular, las condiciones externas y obviamente la presencia de otras proteínas [139].

Las proteínas identificadas están involucradas en una amplia gama de actividades celulares tales como plegamiento de proteínas, traducción, homeóstasis redox, síntesis y muchas otras funciones, limitándose en este caso el análisis a las tres funciones mencionadas inicialmente.

Es importante decir que todas las asociaciones analizadas son candidatas promisorias y es necesario realizar validaciones directas para confirmar su validez. Para cada caso particular se tendrá que explorar cuál o cuáles de las técnicas existentes actualmente puede ser usada para su estudio (cromatografía de afinidad, TAP-MS, doble híbrido, etc). Con ello, se podrá comprender si las asociaciones son mayoritariamente transitorias, con tasas de disociación rápida como respuestas a estímulos o el estadio del parásito o si son estables.

7.8 Análisis bioinformático y generación de una red de interacción de la NMNAT de *L. braziliensis*

Una variedad de métodos *in silico* se han desarrollado para apoyar las interacciones que se han detectado experimentalmente. Los métodos computacionales para la predicción PPI incluyen enfoques basados en secuencias, en estructuras, en proximidad cromosómica, fusión génica, doble híbrido *in silico*, árboles filogenéticos, ontología génica y expresión génica. Hay una gran variedad de servidores web que permiten desarrollar estos tipos de análisis [46].

En este caso, para la creación de la red de interacción de la LbNMNAT se utilizó un enfoque integrador, con el fin de obtener asociaciones físicas y funcionales entre las proteínas que conformen un proceso biológico común. Por ello, se empleó STRING, que maneja diversos fuentes de información facilitando un análisis comparativo, dado que presenta un alto rendimiento de datos experimentales, curación manual, predicciones funcionales y un elevado número de interacciones proteína-proteína; además, a diferencia de otras bases de datos, registra el organismo de interés (*Leishmania braziliensis*). En la tabla 7.9 se contrastan diferentes bases de datos que también recopilan información de PPI [140].

En STRING, las interacciones se derivan de múltiples fuentes: **(i)** interacciones experimentales conocidas importadas de bases de datos primarias, **(ii)** conocimiento de las rutas celulares analizadas a partir de bases de datos curadas manualmente, **(iii)** minería de textos automatizada para descubrir enlaces estadísticos y/o semánticos entre proteínas, basado en resúmenes de Medline y una gran colección de artículos de texto completo, **(iv)** interacciones predichas *de novo* por una serie de algoritmos que utilizan información genómica, así como por análisis de coexpresión e **(v)** interacciones que se observan en un organismo y se transfieren sistemáticamente a otros organismos a través de relaciones de ortología pre-calculadas [131].

Tabla 7.9. Algunas bases de datos de interacción proteína-proteína (estadísticas de mayo de 2017) [140].

Base de datos	Característica	Proteínas	Interacciones	Especies
HPRD ^A	Interacciones físicas entre proteínas humanas	30047	41 327	1
INTACT ^B	Base de datos de evidencias experimentales de interacciones entre proteínas	98289	720 711	7
HINT ^C	Base de datos de alta confianza para interacciones físicas entre proteínas	NA	387 615	12
MIPS ^D	Base de datos curada manualmente de alta precisión	982	1859	3
BIOGRID ^E	Base de datos de evidencia experimental de asociaciones físicas y funcionales entre proteínas	65958	1 137 230	62
STRING ^F	Entradas a BIOGRID e IntAct junto con predicciones computacionales y transferencia ortóloga de otros organismos. Los puntajes de confianza se basan en una red bayesiana.	9643763	1 380 838 440	2031

^aHPRD: <http://www.hprd.org/>

^bIntAct: <http://www.ebi.ac.uk/intact/>

^cHINT: <http://hint.yulab.org>

^dMIPS: <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/ppi/>

^eBIOGRID: <https://thebiogrid.org/>

^fSTRING: <https://string-db.org/>

Con STRING, se generó una red de interacción de proteínas para la LbNMNAT (figura 7.34). Esta red se trata de un grafo interconectado, donde los nodos son las proteínas y las aristas las interacciones. El nodo **XP_001563913.1** representa la proteína de interés (color rojo) y los nodos restantes las proteínas con las que interactúa, registradas en la tabla 7.10. La puntuación para cada nodo (score) representa la confianza para cada asociación y se derivan de la evaluación al comparar las predicciones y un conjunto de referencia (asociaciones validadas en KEGG) [73]. En la creación de la red se estableció arbitrariamente que la puntuación de interacción mínima requerida fuera de 0.400 (confianza media) empleando todas las fuentes de información a excepción de *textmining*. Entre los parámetros que describen la topología de la red se encontraron 11 nodos con un total de 16 conexiones, un grado por nodo de 2.91, es decir, cuántas interacciones tiene una proteína en promedio en la red y un *clustering coefficient* de 0.885.

Figura 7.34 Red de interacción de la NMNAT en *L. braziliensis*. Red generada con STRING V.10.5. Vista tipo confianza. Las asociaciones más fuertes se muestran con líneas más gruesas. Parámetros: Score de confianza medio (0.400). Sin nodos adicionales. Fuentes de interacción empleadas: experimental, bases de datos, co-expresión, co-ocurrencia, *gene-fusion* y *neighborhood*. La NMNAT es el nodo de color rojo identificada como XP_001563913.1.

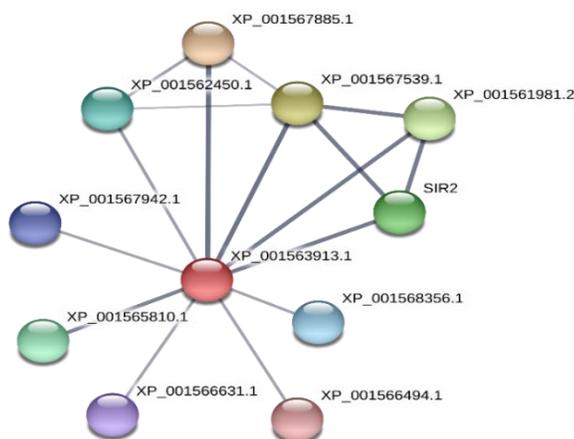


Tabla 7.10. Listado de proteínas que interactúan con LbNMNAT (XP_001563913.1) bajo la predicción de STRING. Se describe su ID, proteínas de interacción predichas y su respectivo score.

Identifier	Predicted functional partners	Score
XP_001563913.1	LbNMNAT	
XP_001567885.1	Putative nicotinate phosphoribosyltransferase (413 aa)	0.964
XP_001567539.1	Putative NAD ⁺ synthase (293 aa)	0.964
XP_001561981.2	ATP-NAD kinase-like protein (1257 aa)	0.911
SIR2	Putative NAD-dependent SIR2 (284 aa)	0.909
XP_001565810.1	Putative ribokinase (329 aa)	0.856
XP_001562450.1	Putative nitrilase (279 aa)	0.658
XP_001568356.1	Putative RNA binding protein (458 aa)	0.629
XP_001567942.1	Putative RNA-binding protein (129 aa)	0.629
XP_001566631.1	Hypothetical protein (210 aa)	0.629
XP_001566494.1	Putative RNA binding protein (648 aa)	0.629

En la red obtenida la totalidad de las proteínas son predichas computacionalmente a partir de sus secuencias de ácidos nucleicos y no han sido demostradas mediante evidencia experimental. No es de extrañar pues los genomas de tripanosomátidos son conocidos por tener una gran cantidad de proteínas hipotéticas (~60%) [3]. Como parte del análisis, se realizó un enriquecimiento funcional de la red teniendo en cuenta información de las bases de datos KEGG, PFAM e INTERPRO, de donde se extrajo información de las rutas biológicas y los dominios predominantes en las proteínas presentes. Cinco de las proteínas, incluida la NMNAT, están relacionadas con la ruta metabólica del nicotinato y la nicotinamida, anclados de manera especial al módulo de síntesis de NAD⁺. En la búsqueda con PFAM e INTERPRO, se encontraron cuatro miembros con motivos de unión a ARN (figura 7.35).

Figura 7.35. Enriquecimiento funcional de la red de interacción de la LbNMNAT. Red generada con STRING V.10.5. Vista tipo confianza. En rojo, nodos presentes en el metabolismo de la nicotinamida y el nicotinato. En azul, nodos con motivo de unión al ARN identificados tanto por PFAM e INTERPRO. En gris proteínas no asociadas a alguno de los dos grupos.

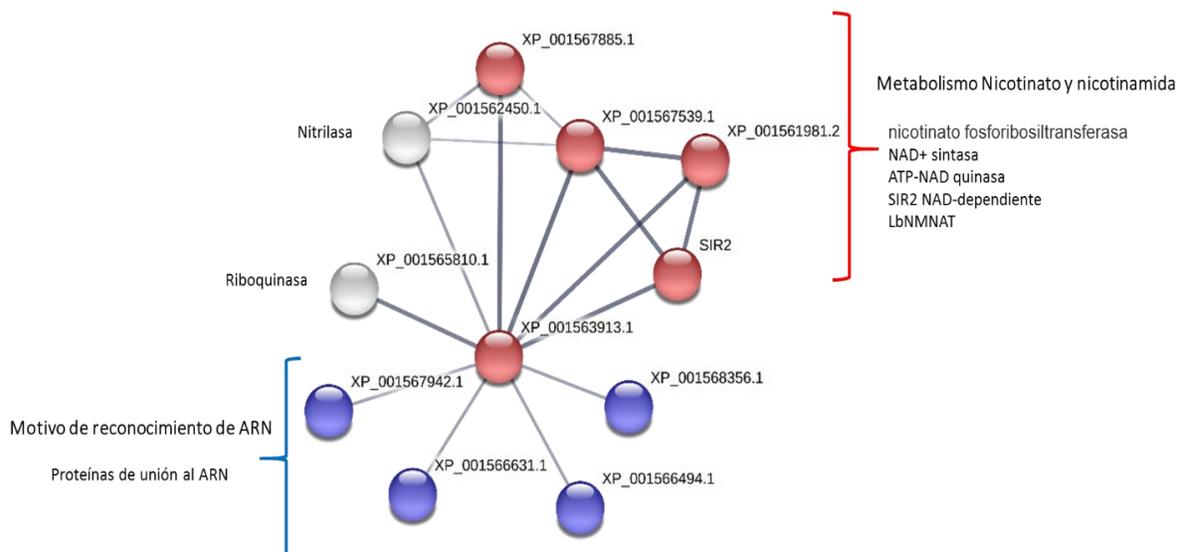


Tabla 7.11. Características funcionales de las proteínas involucradas en la ruta metabólica de la nicotinamida/nicotinato.

Proceso	Proteína	Dominio	Proceso biológico	Función molecular
Síntesis	NaPRT	Nicotinato fosforibosiltransferasa	Biosíntesis del nucleótido de nicotinato	Actividad nicotinato fosforibosiltransferasa
Síntesis	NAD sintasa	NAD sintasa	Biosíntesis de NAD	Actividad NAD sintasa (hidroliza glutamina), unión a ATP
Modificación	NADK	Dominio catalítico diacilglicerol quinasa	Biosíntesis del NADP	Actividad NAD quinasa
Consumo	SIR2	Sirtuina	Actividad mono-ADP-ribosiltransferasa, deacetilasa.	Unión al NAD ⁺

De este grupo de proteínas las sirtuinas han sido investigadas experimentalmente en *Leishmania*. Se conoce que el parásito expresa tres sirtuinas: SIR2RP1, SIR2RP2, y SIR2RP3. De las tres, ya se ha caracterizado la SIR2RP1 en *L. major* y *L. infantum* [32] [36]. Esta enzima está ubicada en el citoplasma y es indispensable para la supervivencia del parásito; además, sus actividades de acetilasa dependiente de NAD⁺ y ADP-ribosiltransferasa no están relacionadas con el silenciamiento epigenético. SIR2RP2 es una ADP-ribosiltransferasa dependiente de NAD⁺, se localiza en la mitocondria de los promastigotes y se estudió en *L. donovani*. La otra sirtuina, SIR2RP3, aún no se ha caracterizado [141].

Al buscar homólogos que interactúan en otras especies usando las bases de datos BioGRID e IntAct, se encontró que la NMNAT1 humana presenta interacción física con SIRT1 [142], al igual que NMA2 con SIR4 en *Saccharomyces cerevisiae* [143]. Algunos autores han hipotetizado que la cercanía de las enzimas NMNAT1-SIRT1 puede facilitar el uso más eficiente de NAD⁺, probablemente por un mecanismo de canalización de sustrato. Algunos mencionan que las enzimas involucradas en la biosíntesis de NAD⁺ pueden formar un complejo entre ésta molécula y SIRT1, creando un microdominio de alta concentración de NAD⁺ que permite la regulación de la actividad de la sirtuina [142]. Mediante una validación directa sería interesante estudiar si de las enzimas relacionadas en la ruta metabólica del NAD⁺, puede existir interacción física NMNAT-SIR2 en el parásito.

En relación a las cuatro proteínas de unión al ARN presentes en la red, su vinculación fue producto de relacionar genes homólogos vecinos en otros genomas (*neighborhood*), y por interacción de homólogos putativos en otra especie (*Campylobacter curvus*). La característica común de las proteínas es que todas presentan el motivo RRM, encontrado en un amplio grupo de proteínas de unión al ARN, por ejemplo, ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP), proteínas implicadas en la regulación del *splicing* alternativo (SR, U2AF, Sxl), componentes proteicos de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs, U1 y U2) y proteínas que regulan la estabilidad y traducción del ARN (PABP, La, Hu) (InterPro: IPR000504). Aunque las fuentes de información no son contundentes para relacionar estas proteínas con la NMNAT, es necesario asociar los ensayos experimentales obtenidos en este trabajo (sección 7.6.1), en donde cuatro proteínas co-inmunoprecipitadas e identificadas por espectrometría de masas son proteínas de unión al ARN, una de ellas con el motivo RRM; además como ya se mencionó, existen interacciones identificadas de

NMNATs homologas con este tipo de proteínas, lo que impulsa su estudio para una mejor comprensión de los procesos biológicos en los que están involucradas.

Es de resaltar que la baja cobertura de proteínas interactuantes en la red puede ser motivo a que no es posible realizar asignaciones de dominio a varias proteínas en *Leishmania* pues solo el 18.0% del proteoma de este parásito se conserva en todas las especies [47], lo que limita el uso de algunos métodos para la predicción de redes de proteínas, por ejemplo, aquellos basados en ortología. Sin embargo, algunos autores han realizado predicciones computacionales de interacciones proteína-proteína en proteomas predichos de *Leishmania* [3]. Rezende et al. emplearon el método *Interolog Mapping* que supone que si dos proteínas tienen una gran similitud de secuencia frente a dos proteínas de una base de datos pública, y estas últimas interactúan, entonces las primeras también interactúan; para ello hicieron uso de las bases de datos públicas: Domine, PSI-Base, IntAct y String; y desarrollaron un sistema combinado de puntuación para abordar la robustez de las predicciones. Las interacciones proteína-proteína predichas se extendió a los organismos *L. braziliensis*, *L. major* y *L. infantum* [3].

Para el interactoma de *L. braziliensis*, la red presentó 1.818 nodos con 39.420 interacciones. Al examinar la información suministrada por los investigadores y ver la descripción de todas las interacciones proteicas predichas y los puntajes de confianza suministrados, se encontró la LbNMNAT como parte de la red. Fue asociada con nueve proteínas, como se muestra en la tabla 7.12, entre las cuales se encuentran las enzimas NADK, NAD⁺ Sintasa y NaPRT, presentando los puntajes más significativos y siendo resultados comunes a nuestra red. La diferencia con las otras proteínas es de esperar pues la cobertura y la precisión de las predicciones pueden variar según los parámetros y herramientas empleadas.

Tabla 7.12 Interacciones proteicas predichas para la NMNAT de *L. braziliensis* por el método *Interolog Mapping* implementado por Rezende et. al. [3] Source: LbrM17_V2.1470 es la enzima NMNAT, (Score) puntaje de confianza.

<i>Gene name</i>		<i>Protein</i>	<i>Score</i>
<i>Source</i>	<i>Target</i>		
<i>LbrM17_V2.1470</i>	LbrM20_V2.0060	possible fusion of chromosomes 20 and 34	0.0808878
<i>LbrM17_V2.1470</i>	LbrM21_V2.1450	Putative adenylate kinase	0.0855324
<i>LbrM17_V2.1470</i>	LbrM22_V2.1430	Putative dephospho-CoA kinase	0.0565392
<i>LbrM17_V2.1470</i>	LbrM30_V2.1840	Adenylate kinase isoenzyme	0.0967497
<i>LbrM17_V2.1470</i>	LbrM32_V2.1840	Putative NAD⁺ synthase	0.821101
<i>LbrM17_V2.1470</i>	LbrM33_V2.1160	Putative nicotinate phosphoribosyltransferase	0.814374
<i>LbrM17_V2.1470</i>	LbrM33_V2.1290	Putative guanylate kinase	0.0984216
<i>LbrM17_V2.1470</i>	LbrM34_V2.3070	Riboflavin kinase/fmn adenyltransferase-like protein	0.0730211
<i>LbrM17_V2.1471</i>	LbrM06_V2.0470	ATP-NAD kinase-like protein	0.782374

La creación de una red de interacción de proteínas de la LbNMNAT abre un campo interesante de investigación, pues ratifica el elevado número de proteínas hipotéticas cuya caracterización bioquímica y asociaciones fisiológicas no han sido descritas; dando la oportunidad de expandir el conocimiento, en especial en el metabolismo del NAD^+ en el parásito. En el caso particular de la NMNAT, se puede postular que funcionalmente no trabaja de manera aislada, sino que es altamente probable su interacción con otras proteínas, incluso con otras moléculas como el ARN. Es de resaltar que las interacciones analizadas pueden ser transitorias o estables, y de esta manera ser físicas o funcionales.

El modelo de interacción creado en este trabajo es la primera aproximación para la enzima y se puede convertir en un medio práctico para obtener información básica, para plantear otras estrategias de investigación y por supuesto para ser objeto de mejoras y nuevas herramientas computacionales que permitan ampliar su robustez y aplicaciones. Es necesario mencionar que las redes de interacción de proteínas son incompletas y propensas a errores [144], sin embargo, estudios sistemáticos de ellas y retroalimentación continua de información confirmada experimentalmente las convierten en herramientas valiosas de investigación.

Al realizar un paralelo entre los resultados obtenidos con la metodología experimental y la computacional, se encontraron proteínas cuya característica común fue su capacidad de unión al ARN. Aunque no hay una proteína específica presente en las dos aproximaciones y no es clara su relación con la NMNAT, sí comparten esta función celular, convirtiéndola en una ruta interesante de estudio. Es de resaltar, que los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, constituyen un aporte importante, dado la limitada información experimental disponible en las bases de datos para la NMNAT este parásito e incluso de organismos más estudiados.

Los dos métodos empleados para determinar interacciones proteína-proteína, al igual que todos los métodos y técnicas en investigación tienen ventajas y desventajas, por lo que abordar el análisis de interacciones con más de un enfoque (teórica/experimental), puede dar información común y/o complementaria, útiles para la confirmación y validación de información, y proporcionan mejores resultados con el fin de comprender la complejidad del interactoma celular y contribuir a la identificación de nuevas dianas farmacológicas.

8 Conclusiones y perspectivas

- Por comparación a nivel de estructura primaria y modelos predictivos de estructura terciaria entre la NMNAT de *L. braziliensis* y los homólogos humanos HsNMNAT1-3, se encontraron cuatro inserciones presentes exclusivamente en la secuencia del parásito (aminoácidos de las regiones 8-43, 205-212, 241-249 y 264-276). El rol estructural y papel en la actividad catalítica se estudió a través de predicciones estructurales. Adicionalmente, mediante el diseño y creación de mutantes delecionales de las inserciones 8-43 y 241-249.
- El uso de una cepa de expresión de *E. coli* modificada en su ambiente redox citoplasmático permitió la solubilización de la recombinante 6xHis $\Delta_{241-249}$ LbNMNAT. El análisis del modelo estructural de esta proteína arrojó que los residuos 241-249 involucran un elemento estructural que conecta los dominios α/β y C-terminal de la enzima y su remoción afectan de manera drástica la actividad adenililtransferasa.
- Se diseñó, expresó y determinó la actividad de una versión truncada de la enzima que prescinde de los primeros 104 residuos, con el fin de estudiar un sitio alternativo del inicio de la transcripción en la secuencia codificante de la LbNMNAT. La recombinante 6xHis Δ_{1-104} LbNMNAT pierde la capacidad de sintetizar NAD⁺ debido a la pérdida de uno de los motivos de reconocimiento de ATP y a modificación en la arquitectura del plegamiento Rossmann.
- Se exploraron interacciones de la LbNMNAT con otras proteínas utilizando co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas. Se identificaron un total de 38 proteínas, entre las cuales se analizaron miembros relacionadas con homeostasis redox, traducción y plegamiento de proteínas. Estas interacciones deben ser validadas y se proponen para futuras investigaciones.
- Agrupando los resultados de esta tesis, se postula que la LbNMNAT presenta elementos estructurales que se asemejan a proteínas chaperonas conocidas y puede estar participando en el plegamiento de otras proteínas a través de una potencial interacción con un complejo de chaperonas. Se abre la posibilidad que esta importante enzima metabólica sea parte integral de la red de respuesta al estrés por parte del parásito.
- Con la plataforma STRING V. 10.5, se realizó una primera exploración teórica de redes de interacción proteína-proteína para la LbNMNAT integrando asociaciones físicas y funcionales. Se encontraron proteínas relacionadas con la ruta metabólica del nicotinato y la nicotinamida (asociaciones funcionales), y otras cuya característica general fue la presencia del motivo RRM de unión a ARN (interacción física). La red de interacción predicha se considera como punto de partida para futuras aproximaciones computacionales y experimentales.

Perspectivas

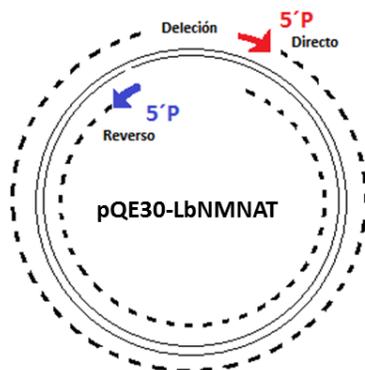
- Hacer ensayos *in vitro* para determinar la actividad chaperona de la LbNMNAT, pues entender esto permitirá ampliar la información que permita entender la termotolerancia desarrollada por el parásito.
- Validar experimentalmente las interacciones proteína-proteína en las que se relaciona la LbNMNAT con los candidatos más promisorios encontrados en este trabajo.
- Determinar la localización subcelular del mutante Δ_{1-43} LbNMNAT mediante inmunofluorescencia y western blot.

9 Anexos

Anexo 1. Construcción del vector pQE30 Δ_{8-42} LbNMNAT mediante mutagénesis dirigida mediante PCR

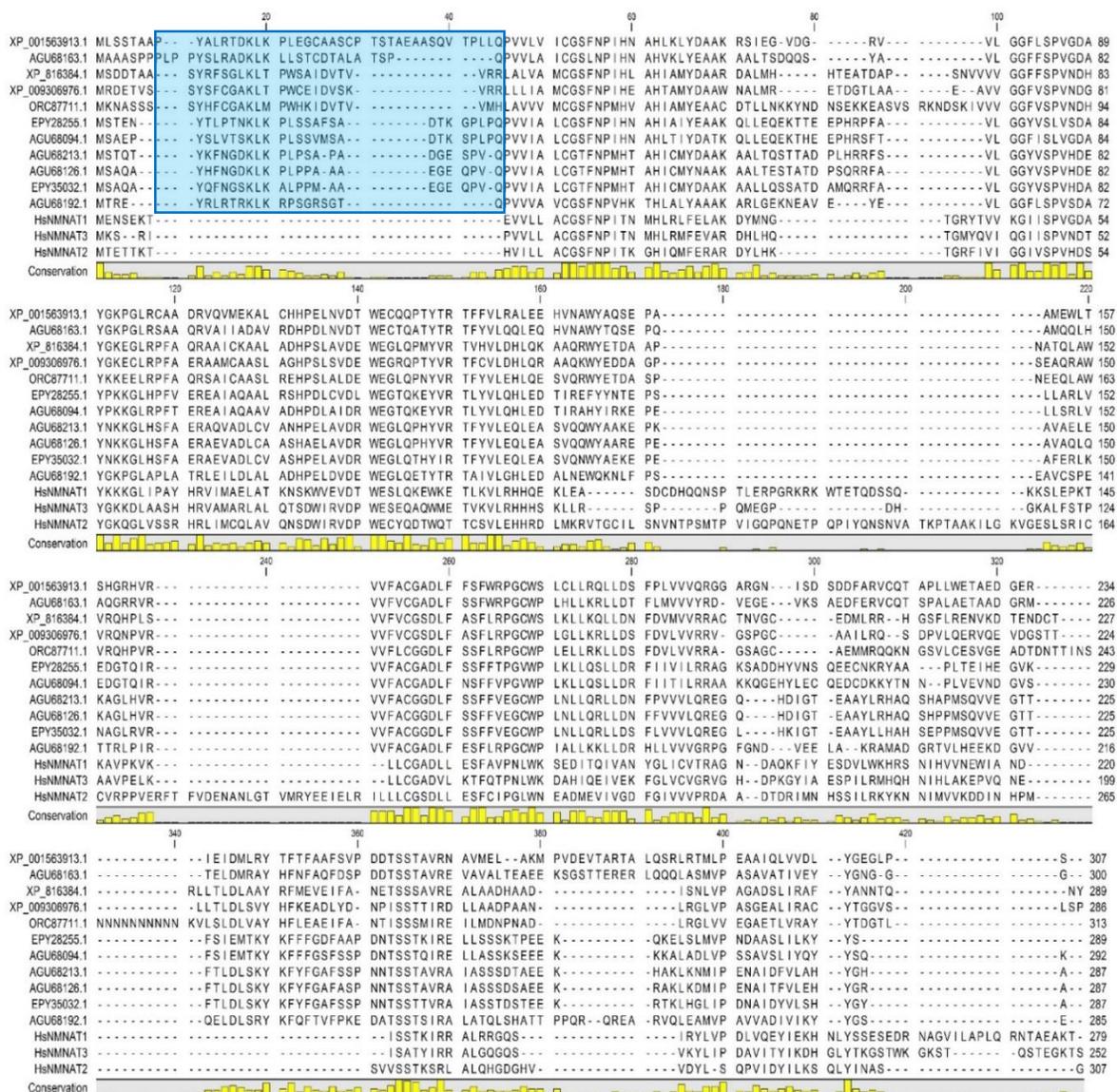
A continuación, se muestra la secuencia de la proteína LbNMNAT con la ubicación de los cebadores diseñados para generar la deleción 8-42.

- **Amarillo:** Secuencia delecionada
- **Azul:** cebador directo 5' CCG GTC GTT CTC GTC ATC TGC GGC AGT 3'
- **Verde:** cebador reverso 5'- GGC AGC AGT AGA GGA TAA CAT GCA TGC -3'

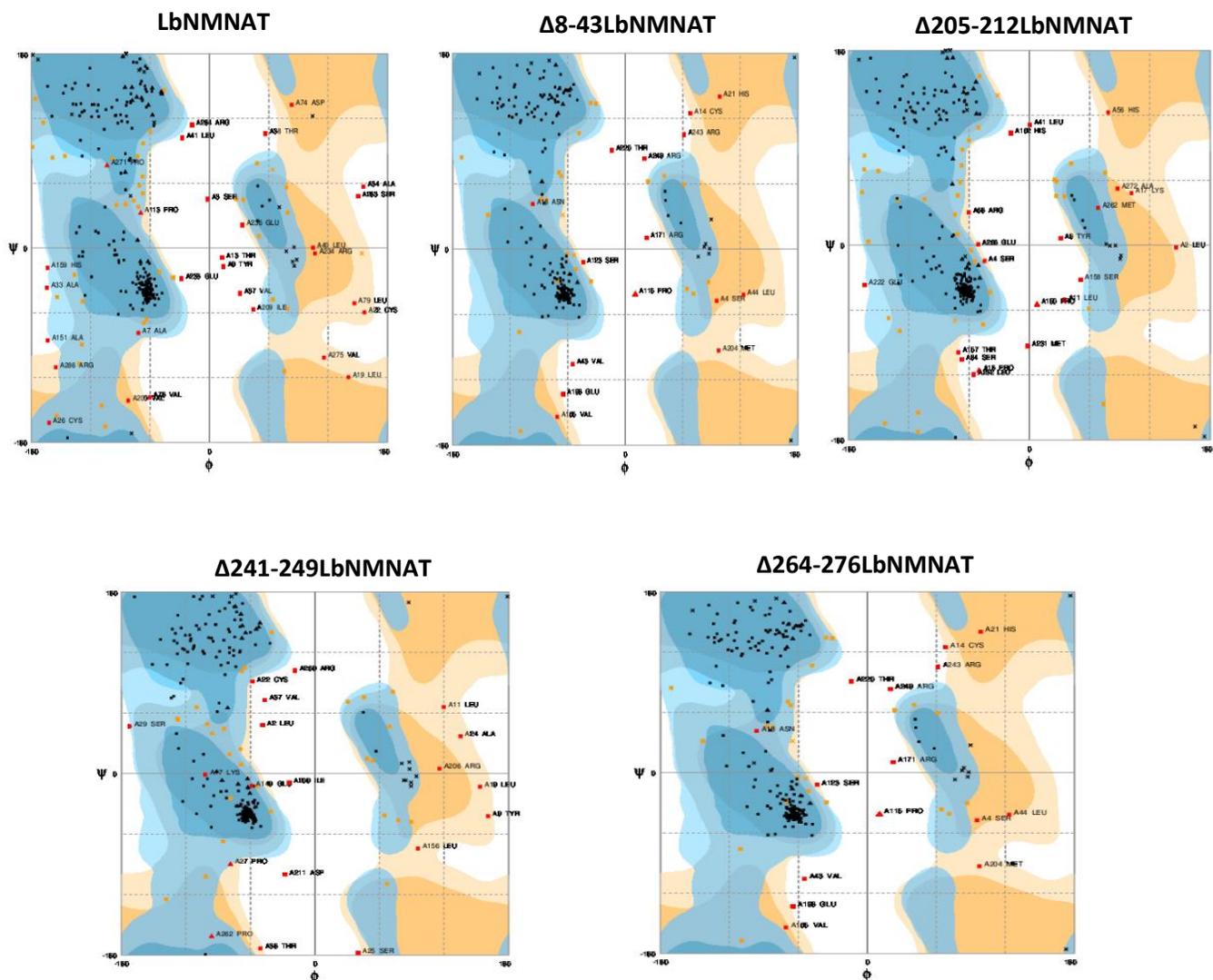


GCATGCATGTTATCCTCTACTGCTGCCCCCTATGCATTGAGGACGGACAAGCT
AAAGCCACTTGAGGGCTGCGCAGCTAGTTGCCCCACCTCAACTGCAGAAGCG
GCATCACAAGTTACACCCTTACTGCGCCGGTCGTTCTCGTCATCTGCGGC
AGTTTTAACCCCATCCACAACGCGCATCTAAAGCTTACGACGCCGGAAC
GATCCATAGAGGGCGTTGATGGCCGTGTGTTCTTGGCGGCTTCCTTTCAC
CTGTCGGTGACGCCTACGGCAAACCGGGATTGCGCTGTGCGGCTGATCGT
GTGCAGGTCATGGAGAAGGCACTTTGTCACCACCCTGAACTCAATGTCGAC
ACGTGGGAGTGCCAGCAGCCACGTACACGCGCACCTTCTTTGTGCTGCGC
GCGCTGGAGGAGCACGTCAACGCTTGGTATGCTCAATCGGAGCCAGCGGC
CATGGAGTGGCTTACCTCGCATGGACGCCACGTGCGCGTTGTTTTCGCATG
TGGCGCCGATCTCTTCTCCTTTTGGCGCCAGGCTGCTGGTCTGCTGTGC
CTGCTGCGACAACCTCTGACTCCTTCCCGCTGGTTGTTGTCCAACGCGGCG
GTGCTCGAGGCAACATCAGCGACTCCGATGACTTCGCGCGTGTGTGCCAGA
CGGCTCCGCTTCTGTGGGAGACGGCGGAGGATGGAGAGAGAATTGAGATC
GACATGTTGCGATATACCTTTACTTTTCGCGGCCTTTTCCGTGCCGACGACA
CATCCTCGACAGCAGTGCGGAATGCGGTGATGGAAGTTCGAAAGATGCCG
GTAGACGAAGTGACGGCGCGCACAGCGCTGCAGTCGCGTCTCCGCACCAT
GCTCCCGAGGCGGCAATCCAGCTGGTGGTGGATCTCTACGGAGAGGGGC
TTCCGTCCTGAGGTACC

Anexo 2. Existe una inserción amino terminal en NMNATs de organismos pertenecientes al orden Trypanosomatida en comparación con sus ortólogas humanas. Alineamiento múltiple de proteínas NMNATs de diferentes Trypanosomatidos y las iso-enzimas humanas HsNMNAT1-3 (XP_001563913.1: *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904, AGU68163.1: *Crithidia acanthocephal*. XP_816384.1: *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener, XP_009306976.1: *Trypanosoma grayi*, ORC87711.1: *Trypanosoma theileri*, EPY28255.1: *Angomonas deanei*, AGU68094.1: *Angomonas desouzai*, AGU68213.1: *Strigomonas galati*, AGU68126.1: *Strigomonas oncopelti*, EPY35032.1: *Strigomonas culicis*, AGU68192.1: *Herpetomonas muscarum*. El porcentaje de identidad entre las secuencias es proporcional a la altura de las barras amarillas. El alineamiento se generó con el programa CLC Sequence Viewer 7.8.1 (QIAGEN).

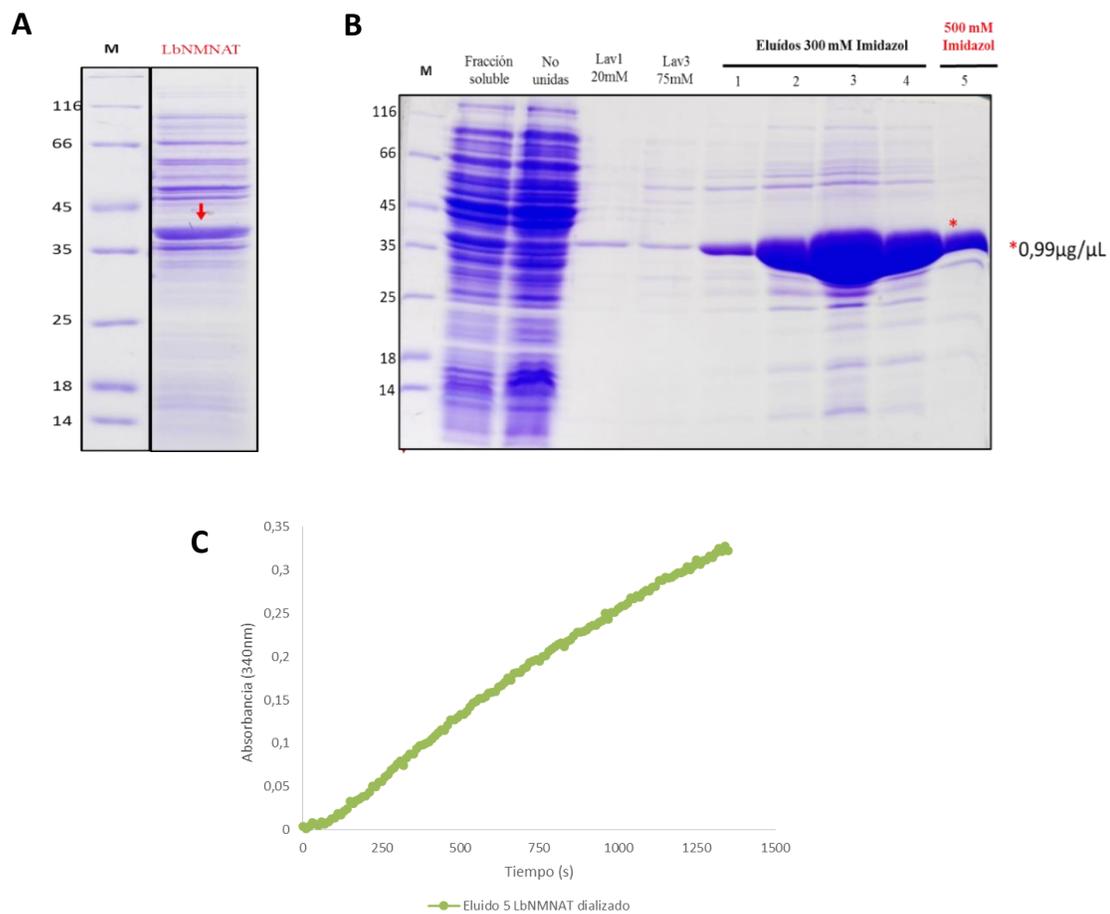


Anexo 3. Predicción del Plot de Ramachandran de los modelos 3D de la proteína LbNMNAT y las versiones delecionadas.

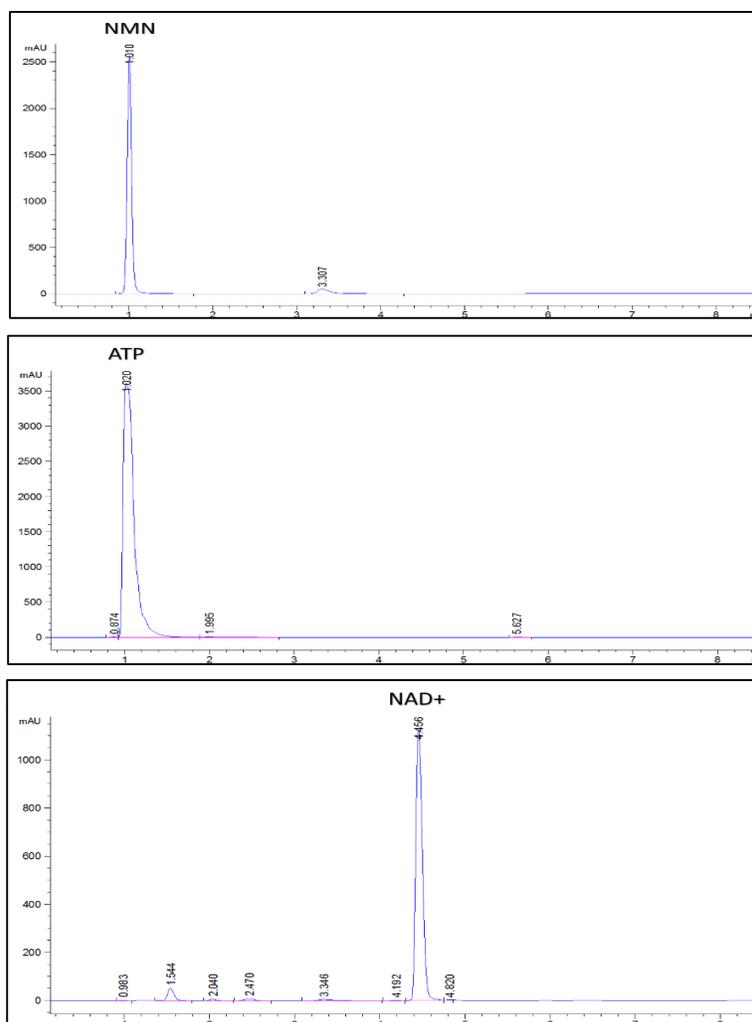


% Residuos en regiones	LbNMNAT				
	LbNMNAT	$\Delta 8-43$ LbNMNAT	$\Delta 205-212$ LbNMNAT	$\Delta 241-249$ LbNMNAT	$\Delta 264-276$ LbNMNAT
favorecida	77.4	85.9	81.5	84.1	85.9
permitida	13.1	8.5	11.8	9.5	8.5
atípica	9.5	5.6	6.7	6.4	5.6

Anexo 4. Expresión, purificación y determinación de la actividad enzimática de la proteína recombinante 6xHisLbNMNAT. (A) Expresión de la proteína 6xHisLbNMNAT en el sistema heterólogo *E. coli* cepa SHuffle. (B) Purificación parcial de la recombinante mediante afinidad Ni-NTA. (C) Actividad enzimática de la 6xHisLbNMNAT mediante ensayo enzimático acoplado, con lectura de absorbancia a 340nm.



Anexo 5. Cromatogramas para la determinación de los tiempos de retención de los compuestos NMN, ATP y NAD⁺.



Compuesto	Tiempo de retención (min)	Concentración (mM)
NMN	1,010	2,0
ATP	1,020	2,0
NAD ⁺	4,456	1,0

Anexo 6. Proteínas identificadas en co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas para la LbNMNAT-GFP. (Control)

Access	Gene name	Protein name	MW (kDa)	pI	MS score	% Seq	Molecular function	Biological process
<i>A4HGY1</i>	LBRM_28_2990	Putative heat-shock protein hsp70	71.2	5.46	849	22.3	ATP binding	protein folding
<i>A4H5S5</i>	LBRM_09_1020	Elongation factor-1 gamma	46.4	5.39	769	33.2	translation elongation factor activity	Protein biosynthesis
<i>A4HII0</i>	LBRM_30_2440	Putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial	71.4	5.8	576	16.5	unfolded protein binding	protein folding
<i>A4HL70</i>	LBRM_33_0340	Heat shock protein 83-1	80.6	5.1	517	11.9	unfolded protein binding	protein folding
<i>A4HP03</i>	LBRM_35_1570	Putative translation elongation factor 1-beta	22.9	4.61	458	39.3	Elongation factor	Protein biosynthesis
<i>A4HCU5</i>	LBRM_23_0840	Putative 3-ketoacyl-CoA thiolase	47.5	7.6	375	18.8	acetyl-CoA C-acyltransferase activity	metabolic process
<i>A4HPQ9</i>	LBRM_35_4150	Adenosylhomocysteinase	47.8	5.75	282	13.3	NAD binding	one-carbon metabolic process
<i>A4H7T6</i>	N.A	ENOL protein	46.7	5.41	275	10.5	magnesium ion binding	glycolytic process
<i>A4H8V4</i>	LBRM_17_0090	Elongation factor 1-alpha	49.0	9.03	263	14.5	GTPase activity	
<i>A4HLC9</i>	LBRM_33_0930	Tubulin beta chain	49.7	4.76	149	10.8	GTPase activity	microtubule-based process
<i>A4HNM7</i>	LBRM_35_0270	Elongation factor 2	94.2	5.91	147	6.9	GTPase activity	
<i>A4H727</i>	LBRM_13_0190	Tubulin alpha chain	49.6	4.89	119	6.4	GTPase activity	microtubule-based process
<i>A4HMZ0</i>	LBRM_34_3140	Putative cystathione gamma lyase	44.6	6.31	105	6.1	lyase activity	

10 Bibliografía

- [1] Organización Panamericana de la Salud, "Leishmaniasis: Informe Epidemiológico en las Américas." Organización Panamericana de la Salud, Washington, 2017.
- [2] J. D. Ramírez, C. Hernández, C. M. León, M. S. Ayala, C. Flórez, and C. González, "Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia : A retrospective study," *Nat. Publ. Gr.*, no. March, pp. 1–10, 2016.
- [3] A. M. Rezende, E. L. Folador, D. de M. Resende, and J. C. Ruiz, "Computational Prediction of Protein-Protein Interactions in Leishmania Predicted Proteomes," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, 2012.
- [4] R. Kumar and C. Engwerda, "Vaccines to prevent leishmaniasis," *Clin. Transl. Immunol.*, vol. 3, no. 3, p. e13, 2014.
- [5] R. Rojas, L. Valderrama, M. Valderrama, M. X. Varona, M. Ouellette, and N. G. Saravia, "Resistance to Antimony and Treatment Failure in Human Leishmania (Viannia) Infection," *J. Infect. Dis.*, vol. 193, no. 3, pp. 1375–1383, 2006.
- [6] A. Stauch, H. Duerr, J. Dujardin, M. Vanaerschot, S. Sundar, and M. Eichner, "Treatment of Visceral Leishmaniasis : Model-Based Analyses on the Spread of Antimony-Resistant L . donovani in Bihar , India," vol. 6, no. 12, 2015.
- [7] S. L. Croft, S. Sundar, and A. H. Fairlamb, "Drug Resistance in Leishmaniasis Drug Resistance in Leishmaniasis," *Society*, vol. 19, no. 1, pp. 111–126, 2006.
- [8] P. M. Gillespie, C. M. Beaumier, U. Strych, T. Hayward, P. J. Hotez, and M. Elena, "Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis," *Vaccine*, vol. 34, no. 26, pp. 2992–2995, 2016.
- [9] R. Petrelli, K. Felczak, and L. Cappellacci, "NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) and NAD kinase (NADK) inhibitors: chemistry and potential therapeutic applications.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 18, no. 13, pp. 1973–1992, 2011.
- [10] P. Belenky, K. L. Bogan, and C. Brenner, "NAD+ metabolism in health and disease," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 32, no. 1, pp. 12–19, 2007.
- [11] I. A. Rodionova, H. J. Zuccola, L. Sorci, A. E. Aleshin, M. D. Kazanov, C. Ma, E. Sergienko, E. J. Rubin, C. P. Locher, and A. L. Osterman, "Mycobacterial Nicotinate Mononucleotide Adenylyltransferase," vol. 290, no. 12, pp. 7693–7706, 2015.
- [12] I. D'Angelo, N. Raffaelli, V. Dabusti, T. Lorenzi, G. Magni, and M. Rizzi, "Structure of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase: A key enzyme in NAD+ biosynthesis," *Structure*, vol. 8, no. 9, pp. 993–1004, 2000.
- [13] L. E. Conteras, "Obtención y caracterización bioquímica y funcional de la enzima recombinante nicotinamida / nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de Leishmania braziliensis (LbNMNAT) Obtención y caracterización bioquímica y funcional de la enzima recombinante," Universidad Nacional de Colombia, 2016.
- [14] P. (Equipo E. Zambrano, "Protocolo de Vigilancia en Salud Pública (Instituto Nacional de Salud)," 2014.
- [15] G. Schönian, K. Kuhls, and I. L. Mauricio, "Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania.," *Parasitology*, vol. 138, no. 4, pp. 405–425, 2011.
- [16] I. a Oliveira, L. Freire-de-lima, L. L. Penha, W. B. Dias, and A. R. Todeschini, *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma*, vol. 74, no. Chapter 1. 2014.

-
- [17] M. Akhoundi, K. Kuhls, A. Cannet, J. Votýpka, P. Marty, P. Delaunay, and D. Sereno, "A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 10, no. 3, pp. 1–40, 2016.
- [18] S. Magni, G.; Amici, A.; Emanuelli, M.; Orsomando, G.; Raffaelli, N.; Ruggieri, "Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenyltransferase," *Curr. Med. Chem.*, vol. 11, no. 7, pp. 873–885, 2004.
- [19] G. Magni, A. Amici, M. Emanuelli, G. Orsomando, N. Raffaelli, and S. Ruggieri, "Enzymology of NAD⁺ homeostasis in man," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 61, no. 1, pp. 19–34, 2004.
- [20] C. Lau, M. Niere, and M. Ziegler, "The NMN/NaMN adenyltransferase (NMNAT) protein family.," *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, vol. 14, pp. 410–31, 2009.
- [21] C. Lau, "Functional Characterisation of Three Human Nicotinamide Mononucleotide Adenyltransferases," 2008.
- [22] H. J. Yoon, L. K. Hye, B. Mikami, and W. S. Se, "Crystal structure of nicotinic acid mononucleotide adenyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa* in its apo and substrate-complexed forms reveals a fully open conformation," *J. Mol. Biol.*, vol. 351, no. 2, pp. 258–265, 2005.
- [23] F. Berger, C. Lau, M. Dahlmann, and M. Ziegler, "Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenyltransferase isoforms," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 43, pp. 36334–36341, 2005.
- [24] N. Pollak, C. Dölle, and M. Ziegler, "The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions," *Biochem. J.*, vol. 402, no. 2, pp. 205–218, 2007.
- [25] S.-I. Oka, C.-P. Hsu, and J. Sadoshima, "Regulation of cell survival and death by pyridine nucleotides.," *Circ. Res.*, vol. 111, no. 5, pp. 611–27, 2012.
- [26] F. Shi, Y. Li, Y. Li, and X. Wang, "Molecular properties, functions, and potential applications of NAD kinases," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 41, no. 5, pp. 352–361, 2009.
- [27] A. Bürkle and V. László, "Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes," *Mol. Aspects Med.*, vol. 34, no. 6, pp. 1046–1065, 2013.
- [28] K. L. H. Feijs, P. Verheugd, and B. Lüscher, "Expanding functions of intracellular resident mono-ADP-ribosylation in cell physiology," *FEBS J.*, vol. 280, no. 15, pp. 3519–3529, 2013.
- [29] W. Wei, R. Graeff, and J. Yue, "Roles and mechanisms of the CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose/Ca(2+) signaling pathway.," *World J. Biol. Chem.*, vol. 5, no. 1, pp. 58–67, 2014.
- [30] M. D. Angelica and Y. Fong, "SIRT1 and other sirtuins in Metabolism," *October*, vol. 141, no. 4, pp. 520–529, 2008.
- [31] S. Ruggieri, G. Orsomando, L. Sorci, and N. Raffaelli, "Regulation of NAD biosynthetic enzymes modulates NAD-sensing processes to shape mammalian cell physiology under varying biological cues," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1854, no. 9, pp. 1138–1149, 2015.
- [32] B. Vergnes, D. Sereno, J. Tavares, A. Cordeiro-Da-Silva, L. Vanhille, N. Madjidian-Sereno, D. Depoix, A. Monte-Alegre, and A. Ouaiissi, "Targeted disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in *Leishmania* survival and proliferation," *Gene*, vol. 363, no. 1–2, pp. 85–96, 2005.
- [33] B. Vergnes, L. Vanhille, A. Ouaiissi, and D. Sereno, "Stage-specific antileishmanial activity of an inhibitor of SIR2 histone deacetylase," *Acta Trop.*, vol. 94, no. 2, pp. 107–115, 2005.
- [34] P. R. T. Romão, J. Tovar, S. G. Fonseca, R. H. Moraes, A. K. Cruz, J. S. Hothersall, A. A. Noronha-Dutra, S. H. Ferreira, and F. Q. Cunha, "Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 39, no. 3, pp. 355–

- 363, 2006.
- [35] B. Yahiaoui, A. Taibi, and A. Ouaiissi, "A Leishmania major protein with extensive homology to silent information regulator 2 of *Saccharomyces cerevisiae*," *Gene*, vol. 169, no. 1, pp. 115–118, 1996.
- [36] B. Vergnes, D. Sereno, N. Madjidian-Sereno, J. L. Lemesre, and A. Ouaiissi, "Cytoplasmic SIR2 homologue overexpression promotes survival of Leishmania parasites by preventing programmed cell death," *Gene*, vol. 296, no. 1–2, pp. 139–150, 2002.
- [37] L. Brunetti, M. Di Stefano, S. Ruggieri, F. Cimadamore, and G. Magni, "Homology modeling and deletion mutants of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isozyme 2: new insights on structure and function relationship," *Protein Sci.*, vol. 19, no. 12, pp. 2440–50, 2010.
- [38] C. Lau, C. Dölle, T. I. Gossmann, L. Agledal, M. Niere, and M. Ziegler, "Isoform-specific targeting and interaction domains in human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferases," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 24, pp. 18868–18876, 2010.
- [39] F. Berger, C. Lau, and M. Ziegler, "Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity by the phosphorylation state of the nuclear NAD biosynthetic enzyme NMN adenylyl transferase 1," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 10, pp. 3765–3770, 2007.
- [40] R. . G. Victor. Torre Russis, Alfredo. Valles and P. T. China. Glay, "Interacciones proteína-proteína: bases de datos y métodos teóricos de predicción," *Biotecnol. Apl.*, vol. 20, no. 3, pp. 201–208, 2003.
- [41] V. S. Rao, K. Srinivas, G. N. Sujini, and G. N. S. Kumar, "Protein-Protein Interaction Detection : Methods and Analysis," vol. 2014, no. ii, 2014.
- [42] G. H. D. And and H. Dihazi, "Protein–protein interaction networks improve the proteomics data interpretation in induced apoptosis," *Proteomics*, vol. 7, no. 2, pp. 177–180, 2010.
- [43] R. F. Deighton, L. E. Kerr, D. M. Short, M. Allerhand, I. R. Whittle, and J. McCulloch, "Network generation enhances interpretation of proteomic data from induced apoptosis," *Proteomics*, vol. 10, no. 6, pp. 1307–1315, 2010.
- [44] P. Minguéz, S. G??tz, D. Montaner, F. Al-Shahrour, and J. Dopazo, "SNOW, a web-based tool for the statistical analysis of protein-protein interaction networks," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. SUPPL. 2, pp. 109–114, 2009.
- [45] A. V. Antonov, S. Dietmann, I. Rodchenkov, and H. W. Mewes, "PPI spider: A tool for the interpretation of proteomics data in the context of protein-protein interaction networks," *Proteomics*, vol. 9, no. 10, pp. 2740–2749, 2009.
- [46] C. A. G.-P. Aldo Segura-Cabrera, X. G. Mario A. Rodríguez-Pérez, and G. R. and V. Bocanegra García, "Analysis of Protein Interaction Networks to Prioritize Drug Targets of," in *Medicinal Chemistry and Drug Design*, D. Ekinici, Ed. 2012, pp. 27–58.
- [47] A. F. Flórez, D. Park, J. Bhak, B. Kim, A. Kuchinsky, J. H. Morris, J. Espinosa, and C. Muskus, "Protein network prediction and topological analysis in Leishmania major as a tool for drug target selection," 2010.
- [48] L. E. Contreras and M. H. Ramirez-Hernandez, "Aproximación al metabolismo del Dinucleótido de de Nicotinamida y Adenina (NAD+) en leishmania.," *Rev. la Asoc. Colomb. Ciencias Biológicas*, vol. 22, pp. 97–108, 2010.
- [49] L. E. Contreras, R. Neme, and M. H. Ramírez, "Identification and functional evaluation of Leishmania braziliensis Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase," *Protein Expr. Purif.*, vol. 115, pp. 26–33, 2015.
- [50] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch, "Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server," *Methods Mol Biol.*, pp. 571–608, 1999.

-
- [51] P. Artimo, M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. De Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier, E. Gasteiger, A. Grosdidier, C. Hernandez, V. Ioannidis, D. Kuznetsov, R. Liechti, S. Moretti, K. Mostaguir, N. Redaschi, G. Rossier, I. Xenarios, and H. Stockinger, "ExpASY: SIB bioinformatics resource portal," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. W1, pp. 1–7, 2012.
- [52] S. Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, "Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites.," *J. Mol. Biol.*, vol. 294(5), pp. 1351–1362, 1999.
- [53] J. Gaetner, U. D. P. Sud, D. J. Osguthorpe, and B. Robson, "Analysis of the Accuracy and Implications of Simple Methods for Predicting the Secondary Structure of Globular Proteins," pp. 97–120, 1978.
- [54] B. Rost and C. Sander, "Combining Evolutionary Information and Neural Networks to Predict Protein Secondary Structure," vol. 72, pp. 55–72, 1994.
- [55] P. Frishman, D. & Argos, "Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino-acid sequence.," *Protein Eng.* 9, pp. 133–142, 1996.
- [56] G. C. and D. G. Combet C., Blanchet C., "NPS @: Network Protein Sequence Analysis," *TIBS*, vol. 4, no. March, pp. 147–150, 2000.
- [57] J. Cheng, A. Z. Randall, M. J. Sweredoski, and P. Baldi, "SCRATCH : a protein structure and structural feature prediction server," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, pp. 72–76, 2005.
- [58] Y. Zhang, "I-TASSER server for protein 3D structure prediction.," *BMC Bioinformatics*, vol. 9, p. 40, 2008.
- [59] D. E. Kim, D. Chivian, and D. Baker, "Protein structure prediction and analysis using the Robetta server," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, pp. 526–531, 2004.
- [60] J. C. Debswapna Bhattacharya, "3Drefine: Consistent Protein Structure Refinement by Optimizing Hydrogen Bonding Network and Atomic-Level Energy Minimization," vol. 81, no. 1, pp. 119–131, 2014.
- [61] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. A. Iii, P. I. W. De Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson, and D. C. Richardson, "Structure Validation by C α Geometry : ϕ, ψ and C β Deviation," vol. 450, no. June 2002, pp. 437–450, 2003.
- [62] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, "UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis," *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004.
- [63] J. Sambrook and D. Russel, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [64] K. M. Engebrecht J, Brent R, *Minipreps of plasmid DNA*. Mol, Curr Protoc, 2001.
- [65] M. Savari, S. Hamid, Z. Esfahani, M. Edalati, and D. Biria, "Optimizing conditions for production of high levels of soluble recombinant human growth hormone using Taguchi method," *Protein Expr. Purif.*, vol. 114, pp. 128–135, 2015.
- [66] M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding," *Anal. Biochem.*, vol. 254, pp. 248–254, 1976.
- [67] E. Balducci, M. Emanuelli, N. Raffaelli, S. Ruggieri, a Amici, G. Magni, G. Orsomando, V. Polzonetti, and P. Natalini, "Assay methods for nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of wide applicability.," *Analytical biochemistry*, vol. 228, no. 1. pp. 64–68, 1995.
- [68] V. D. Atayde, E. Ullu, and N. G. Kolev, "A single-cloning-step procedure for the generation of RNAi plasmids producing long stem-loop RNA," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 184, no. 1, pp. 55–58, 2012.
- [69] V. D. Atayde, E. Ullu, and N. G. Kolev, "A single-cloning-step procedure for the generation of RNAi plasmids producing long stem – loop RNA," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 184, pp. 55–

- 58, 2012.
- [70] A. Niño and M. Camacho, "Leishmania (Viannia) braziliensis growth in vitro culture relies more on folic acid availability than Leishmania (Leishmania) amazonensis," *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 100, no. May, pp. 309–310, 2005.
- [71] B. A. Shoemaker and A. R. Panchenko, "Deciphering protein-protein interactions. Part I. Experimental techniques and databases," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 0337–0344, 2007.
- [72] "Fast & Professional Protein Identification Service – by Alphalyse," 2016. .
- [73] C. von Mering, L. J. Jensen, B. Snel, S. D. Hooper, M. Krupp, M. Foglierini, N. Jouffre, M. A. Huynen, and P. Bork, "STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. DATABASE ISS., pp. 433–437, 2005.
- [74] J. A. Carles Cantó, Keir Menzies, "NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis - a balancing act between mitochondria and the nucleus," *Cell Metab*, vol. 25, no. 4, pp. 368–379, 2015.
- [75] P. Di Tommaso, S. Moretti, I. Xenarios, M. Orobitg, A. Montanyola, J. M. Chang, J. F. Taly, and C. Notredame, "T-Coffee: A web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. SUPPL. 2, pp. 13–17, 2011.
- [76] R. C. Edgar, "MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 5, pp. 1792–1797, 2004.
- [77] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson, and D. G. Higgins, "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 539–539, 2014.
- [78] C. H. Niño Riveros, "Identificación y caracterización de la Nicotinamida Mononucleótido Adenilil Transferasa (NMNAT) en Trypanosoma cruzi: enzima clave en el metabolismo del NAD⁺," Universidad Nacional de Colombia, 2014.
- [79] M. Stancek, R. Schnell, and M. Rydén-Aulin, "Analysis of Escherichia coli nicotinate mononucleotide adenyltransferase mutants in vivo and in vitro," *BMC Biochem.*, vol. 6, pp. 1–9, 2005.
- [80] R. Grace Zhai, M. Rizzi, and S. Garavaglia, "Nicotinamide / nicotinic acid mononucleotide adenyltransferase , new insights into an ancient enzyme," *Cell. Mol. Life Sci.*, pp. 2805–2818, 2009.
- [81] D. Rosenzweig, D. Smith, P. J. Myler, R. W. Olafson, and D. Zilberstein, "Post-translational modification of cellular proteins during Leishmania donovani differentiation," *Proteomics*, pp. 1843–1850, 2008.
- [82] M. Parsons, E. A. Worthey, P. N. Ward, and J. C. Mottram, "Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids : Leishmania major , Trypanosoma brucei and," *BMC Genomics*, vol. 19, pp. 1–19, 2005.
- [83] M. Wiese, D. Kuhn, C. G. Gru, and D.- Tu, "Protein Kinase Involved in Flagellar-Length Control," *Eukaryot. Cell*, vol. 2, no. 4, pp. 769–777, 2003.
- [84] L. Leon and M. Genestra, "Protein kinase A activity is associated with metacyclogenesis in Leishmania amazonensis," *cell Biochem. Funct.*, no. November 2003, pp. 315–320, 2004.
- [85] N. Alvarez-Rueda, M. Biron, and P. Le Pape, "Infectivity of Leishmania mexicana is associated with differential expression of protein kinase C-like triggered during a cell-cell contact," *PLoS One*, vol. 4, no. 10, 2009.
- [86] D. M. Sánchez-Lancheros, L. F. Ospina-Giraldo, and María Helena Ramírez-Hernández,

- “Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of *Trypanosoma cruzi* (TcNMNAT): A cytosol protein target for serine kinases,” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 111, no. 11, pp. 670–675, 2016.
- [87] P. M. Hwang, J. S. Pan, and B. D. Sykes, “Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in *Escherichia coli*,” in *Recombinant Gene Expression*, vol. 588, no. 2, Federation of European Biochemical Societies, 2014, pp. 247–252.
- [88] A. Mitraki, B. Fane, C. Haase-petjingell, J. Sturtevant, and J. King, “Global Suppression of Protein Folding Defects and Inclusion Body Formation,” *Res. Artic.*, vol. 253, 1991.
- [89] P. T. Wingfield, “Production of Recombinant Proteins,” vol. 267, 2010.
- [90] A. Singh, V. Upadhyay, A. K. Upadhyay, S. M. Singh, and A. K. Panda, “Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process,” *Microb. Cell Fact.*, pp. 1–10, 2015.
- [91] J. Lobstein, C. A. Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs, and M. Berkmen, “SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 1, p. 124, 2012.
- [92] J. C. Bardwell, K. McGovern, and J. Beckwith, “Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo,” *Cell*, vol. 67, no. 3, pp. 581–589, 1991.
- [93] J. S. Weissman and P. S. Kimt, “Efficient catalysis of disulphide bond rearrangements by protein disulphide isomerase,” *Nature*, vol. 365, no. 6442, pp. 185–188, 1993.
- [94] C. Q. Luz Ana, “Optimización del cultivo de *Escherichia coli* para la producción de cutinasas recombinantes,” Universidad de Chile, 2010.
- [95] B. Goutam, *Biotechnology of microbial enzymes*. Elsevier Inc., 2017.
- [96] B. Kazemi, “Genomic Organization of *Leishmania* Species,” *Iran. J Parasitol*, vol. 6, no. 3, pp. 1–18, 2011.
- [97] B. Papadopoulou, M. Müller, A. Rochette, F. McNicoll, C. Dumas, and C. Chow, *Leishmania: After The Genome*, no. March. 2008.
- [98] R. Dhalia, C. R. S. Reis, E. R. Freire, P. O. Rocha, R. Katz, J. R. C. Muniz, N. Standart, and O. P. De Melo Neto, “Translation initiation in *Leishmania major*: Characterisation of multiple eIF4F subunit homologues,” *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 140, no. 1, pp. 23–41, 2005.
- [99] A. A. de Mayolo, M. Lisby, N. Erdeniz, T. Thybo, U. H. Mortensen, and R. Rothstein, “Multiple start codons and phosphorylation result in discrete Rad52 protein species,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 9, pp. 2587–2597, 2006.
- [100] J. Lukeš, S. Regmi, R. Breitling, S. Mureev, S. Kushnir, K. Pyatkov, M. Jirk, and K. A. Alexandrov, “Translational initiation in *Leishmania tarentolae* and *Phytomonas serpens* (Kinetoplastida) is strongly influenced by pre-ATG triplet and its 5' sequence context,” vol. 148, pp. 125–132, 2006.
- [101] D. Gagnon, A. Foucher, I. Girard, and M. Ouellette, “Stage specific gene expression and cellular localization of two isoforms of the serine hydroxymethyltransferase in the protozoan parasite *Leishmania*,” *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 150, pp. 63–71, 2006.
- [102] K. Ruan, Y. Zhu, C. Li, J. M. Brazill, and R. G. Zhai, “Alternative splicing of *Drosophila* Nmnat functions as a switch to enhance neuroprotection under stress,” *Nat. Commun.*, vol. 6, pp. 1–14, 2015.
- [103] V. M. Bolanos-Garcia and O. R. Davies, “Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1760, no. 9, pp. 1304–1313, 2006.
- [104] R. G. Zhai, Y. Cao, P. R. Hiesinger, Y. Zhou, S. Q. Mehta, K. L. Schulze, P. Verstreken, and H. J. Bellen, “*Drosophila* NMNAT maintains neural integrity independent of its NAD synthesis activity,” *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 12, pp. 2336–2348, 2006.

-
- [105] A. R. Grace Zhai, Fan Zhang, P. Robin Hiesinger, Yu Cao, Claire M. Haueter and H. J. Bellen, "NAD synthase NMNAT acts as a chaperone to protect against neurodegeneration," *Nature*, vol. 452, no. 7189, pp. 887–891, 2011.
- [106] Y. O. Ali, H. M. Allen, L. Yu, D. Li-Kroeger, D. Bakhshizadehmahmoudi, A. Hatcher, C. McCabe, J. Xu, N. Bjorklund, G. Taglialatela, D. A. Bennett, P. L. De Jager, J. M. Shulman, H. J. Bellen, and H. C. Lu, "NMNAT2:HSP90 Complex Mediates Proteostasis in Proteinopathies," *PLoS Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 1–36, 2016.
- [107] L. Holm and P. Rosenström, "Dali server: Conservation mapping in 3D," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. SUPPL. 2, pp. 545–549, 2010.
- [108] K. L. Tkaczuk, I. A. Shumilin, M. Chruszcz, E. Evdokimova, A. Savchenko, and W. Minor, "Structural and functional insight into the universal stress protein family," *Evol. Appl.*, vol. 6, no. 3, pp. 434–449, 2013.
- [109] Y. J. Jung, S. M. B. Melencion, E. S. Lee, J. H. Park, C. V. Alinapon, H. T. Oh, D.-J. Yun, Y. H. Chi, and S. Y. Lee, "Universal Stress Protein Exhibits a Redox-Dependent Chaperone Function in Arabidopsis and Enhances Plant Tolerance to Heat Shock and Oxidative Stress," *Front. Plant Sci.*, vol. 6, no. December, pp. 1–11, 2015.
- [110] T. N. Petersen, S. Brunak, G. Von Heijne, and H. Nielsen, "SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions," *Nat. Methods*, vol. 8, no. 10, pp. 785–786, 2011.
- [111] F. Herrera, S. Gonçalves, and J. B. dos Santos, "Studying the Molecular Determinants of Protein Oligomerization in Neurodegenerative Disorders by Bimolecular Fluorescence Complementation," in *Bio-nanoimaging Protein Misfolding & Aggregatio*, Elsevier's Science & Technology, 2014, p. 133.
- [112] P. van der Geer, "Analysis of Protein–Protein Interactions by Coimmunoprecipitation," in *Methods In Enzymology*, E. Inc, Ed. 2009, pp. 35–50.
- [113] B. X. Huang and H. Y. Kim, "Effective Identification of Akt Interacting Proteins by Two-Step Chemical Crosslinking, Co-Immunoprecipitation and Mass Spectrometry," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013.
- [114] R. Benjamin, L. A. Hazelwood¹, and D. R. Sibley, "Identifying Novel Protein-Protein Intreactions Using Co-Immunoprecipitation and Mass Spectroscopy," *Curr Protoc Neurosci*, pp. 1–19, 2009.
- [115] S. Enany, "Structural and functional analysis of hypothetical and conserved proteins of Clostridium tetani," *J. Infect. Public Health*, vol. 7, no. 4, pp. 296–307, 2014.
- [116] C. E. Muskus, M. Marín Villa, and M. M. Villa, "Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de Leishmania," *Biomédica*, vol. 22, no. 2, p. 167, 2002.
- [117] A. M. Silva, A. Cordeiro-da-Silva, and G. H. Coombs, "Metabolic variation during development in culture of leishmania donovani promastigotes," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 12, 2011.
- [118] Y. Hasegawa, K. Irie, and A. P. Gerber, "Distinct roles for Khd1p in the localization and expression of bud-localized mRNAs in yeast," *Rna*, vol. 14, no. 11, pp. 2333–2347, 2008.
- [119] J. E. Miller, L. Zhang, H. Jiang, Y. Li, B. F. Pugh, and J. C. Reese, "Genome-Wide Mapping of Decay Factor-mRNA Interactions in Yeast Identifies Nutrient Responsive Transcripts as Targets of the Deadenylase Ccr4," *Genes/Genomes/Genetics*, vol. 8, no. January, p. g3.300415.2017, 2017.
- [120] H. Parzen, J. Szpyt, S. Tam, G. Zarraga, L. Pontano-vaites, S. Swarup, A. E. White, D. K. Schweppe, R. Rad, B. K. Erickson, R. A. Obar, K. G. Guruharsha, K. Li, J. W. Harper, S. Artavanis-tsakonas, and P. Steven, "Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks," *Nat. Lett.*, vol. 545, no. 2, pp. 505–509, 2017.
- [121] E. L. Huttlin, L. Ting, R. J. Bruckner, F. Gebreab, M. P. Gygi, J. Szpyt, S. Tam, G. Zarraga, G. Colby, K. Baltier, R. Dong, V. Guarani, L. P. Vaites, A. Ordureau, R. Rad, K. Brian, M. Wühr, J. Chick, B.

- Zhai, D. Kolippakkam, J. Mintseris, R. A. Obar, T. Harris, S. Artavanis-tsakonas, M. E. Sowa, J. A. Paulo, J. W. Harper, and S. P. Gygi, "The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome," *Cell*, vol. 162, no. 2, pp. 425–440, 2016.
- [122] U. Stelzl, S. Connell, K. H. Nierhaus, and B. Wittmann-Liebold, "Ribosomal Proteins: Role in Ribosomal Functions," *Encycl. Life Sci.*, no. June, 2001.
- [123] X. Zhou, W. J. Liao, J. M. Liao, P. Liao, and H. Lu, "Ribosomal proteins: Functions beyond the ribosome," *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 2, pp. 92–104, 2015.
- [124] M. Haslbeck and J. Buchner, "Assays to Characterize Molecular Chaperone Function In Vitro," in *Stress Responses: Methods and Protocols*, C. M. Osowski, Ed. 2015, pp. 39–51.
- [125] C. Folgueira Fernández, "Los genes HSP70 de Leishmania: importancia de la regulación traduccional y relevancia biológica del gen HSP70-II," Universidad Autónoma de Madrid, 2006.
- [126] M. Wiesgigl and J. Clos, "Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*," *Mol. Biol. Cell*, vol. 12, no. November, pp. 3307–3316, 2001.
- [127] J. Clos and H. Antje, "Heat Shock Proteins of *Leishmania*: Chaperones in the Driver's Seat," in *Leishmania current biology and control*, S. Adak, Ed. 2015, pp. 17–36.
- [128] T. Lopez, K. Dalton, and J. Frydman, "The mechanism and function of group II chaperonins," *J Mol Biol.*, vol. 427, no. 18, pp. 2919–2930, 2016.
- [129] M. Arifuzzaman, M. Maeda, a Itoh, K. Nishikata, C. Takita, R. Saito, T. Ara, K. Nakahigashi, H. C. Huang, a Hirai, K. Tsuzuki, S. Nakamura, M. Altaf-Ul-Amin, T. Oshima, T. Baba, N. Yamamoto, T. Kawamura, T. Ioka-Nakamichi, M. Kitagawa, M. Tomita, S. Kanaya, C. Wada, and H. Mori, "Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12," *Genome Res*, vol. 16, no. 5, pp. 686–691, 2006.
- [130] Bhaskar, N. Kumari, and N. Goyal, "Cloning, characterization and sub-cellular localization of gamma subunit of T-complex protein-1 (chaperonin) from *Leishmania donovani*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 429, no. 1–2, pp. 70–74, 2012.
- [131] D. Szklarczyk, J. H. Morris, H. Cook, M. Kuhn, S. Wyder, M. Simonovic, A. Santos, N. T. Doncheva, A. Roth, P. Bork, L. J. Jensen, and C. Von Mering, "The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D362–D368, 2017.
- [132] Y. O. Ali, R. McCormack, A. Darr, and R. G. Zhai, "Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase Is a Stress Response Protein Regulated by the Heat Shock Factor /," *Biol. Chem.*, vol. 286, no. 21, pp. 19089–19099, 2011.
- [133] J. M. Andrade and S. M. F. Murta, "Functional analysis of cytosolic tryparedoxin peroxidase in antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines," *Parasites and Vectors*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2014.
- [134] S. S. Suman, A. Equbal, A. Zaidi, M. Y. Ansari, K. P. Singh, K. Singh, B. Purkait, G. C. Sahoo, S. Bimal, P. Das, and V. Ali, "Up-regulation of cytosolic tryparedoxin in Amp B resistant isolates of *Leishmania donovani* and its interaction with cytosolic tryparedoxin peroxidase," *Biochimie*, vol. 121, pp. 312–325, 2016.
- [135] N. Ben Khalaf, G. De Muylder, H. Louzir, J. McKerrow, and M. Chenik, "Leishmania major protein disulfide isomerase as a drug target: Enzymatic and functional characterization," *Parasitol. Res.*, vol. 110, no. 5, pp. 1911–1917, 2012.
- [136] A. Fiorillo, G. Colotti, A. Boffi, P. Baiocco, and A. Ilari, "The Crystal Structures of the Tryparedoxin-Tryparedoxin Peroxidase Couple Unveil the Structural Determinants of *Leishmania* Detoxification Pathway," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 8, 2012.
- [137] H. Castro and A. M. Tomás, "Thiol Peroxidases of Trypanosomatids," *Trypanos. Dis. Mol. Routes to Drug Discov.*, vol. 10, no. 9, pp. 201–213, 2013.
- [138] and J. W. H. Christian Behrends, Mathew E. Sowa, Steven P. Gygi, "Network organization of

-
- the human autophagy system," *Nature*, vol. 466, no. 7302, pp. 68–76, 2010.
- [139] A. G. Ngounou Wetie, I. Sokolowska, A. G. Woods, U. Roy, K. Deinhardt, and C. C. Darie, "Protein-protein interactions: Switch from classical methods to proteomics and bioinformatics-based approaches," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 71, no. 2, pp. 205–228, 2014.
- [140] J. R. Brender and Y. Zhang, "Protein-Protein Interactions and Genetic Disease," *eLS*, no. October, pp. 1–11, 2017.
- [141] N. Mittal, R. Muthuswami, and R. Madhubala, "The mitochondrial SIR2 related protein 2 (SIR2RP2) impacts *Leishmania donovani* growth and infectivity," *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 2, 2017.
- [142] T. Zhang, J. G. Berrocal, K. M. Frizzell, M. J. Gamble, M. E. DuMond, R. Krishnakumar, T. Yang, A. A. Sauve, and W. Lee Kraus, "Enzymes in the NAD⁺ salvage pathway regulate SIRT1 activity at target gene promoters," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 30, pp. 20408–20417, 2009.
- [143] T. L. Brady, P. G. Fuerst, R. A. Dick, C. Schmidt, and D. F. Voytas, "Retrotransposon Target Site Selection by Imitation of a Cellular Protein," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 4, pp. 1230–1239, 2008.
- [144] N. Safari-Alighiarloo, M. Taghizadeh, M. Rezaei-Tavirani, B. Goliaei, and A. A. Peyvandi, "Protein-protein interaction networks (PPI) and complex diseases," *Gastroenterol. Hepatol. from Bed to Bench*, vol. 7, no. 1, pp. 17–31, 2014.