



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Estudio del transporte de nucleótidos en
parásitos intracelulares: caracterización de un
posible transportador de NAD⁺ en
*Leishmania braziliensis***

David Santiago Morales Herrera

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2019

**Estudio del transporte de nucleótidos en
parásitos intracelulares: caracterización de un
posible transportador de NAD⁺ en
*Leishmania braziliensis***

David Santiago Morales Herrera

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

Directora

Der. rer. Nat María Helena Ramírez Hernández

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

2019

Agradecimientos

En primer lugar a Dios, por permitirme desarrollar este proyecto y cuidar de mí y mis seres amados.

A la profesora María Helena Ramírez por su apoyo y dedicación para el desarrollo de este trabajo y al grupo de investigación Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ) por ser mi segundo hogar. A la Universidad Nacional de Colombia, el departamento de Química, a su cuerpo docente y a todos los que hacen parte de él. Así como a la Facultad de Ciencias por su apoyo durante la realización de la maestría mediante beca Auxiliar docente. A la Dirección de Investigación y Extensión (DIEB) - Sede Bogotá por el desarrollo del proyecto número: 37593 “Estudio del metabolismo del NAD en protozoos: transportadores de NAD y regulación del metabolismo”. A la Dirección de Investigación y Extensión (DIEB) - Sede Bogotá y a Colciencias por su apoyo mediante la convocatoria 775 de jóvenes investigadores por la paz 2017.

A mis compañeros de trabajo (Laura Guasca, Camila González, Gustavo Garzón, Sharon Villamil, Aravy Suarez, Diana Diaz, Luis Contreras, Esteban Chacón, Diana Sanchez, Nicolas Forero, Ricardo Ramirez, Magda Alvarado, Rosalba Guzmán y Andrés García) con los cuales viví múltiples experiencias y aprendizajes tanto académicos como para la vida. Agradecimiento especial a Melissa Ostos y Lesly Ortiz, quienes fueron mi apoyo moral y mis confidentes a lo largo de este proceso y a quienes siempre tendré presentes durante mi vida.

A Vivian Boyacá (Juana), a quien este proceso me permitió conocer desde el día de la entrevista de admisión a la maestría y con quien he compartido momentos inigualables. Así como a Jean Villamil por su compañía y malos chistes en todo momento. En especial por siempre ser mi as bajo la manga cuando todo parecía no tener salida.

A mis dos mamás Clara Inés y Esperanza Herrera, quienes a pesar de las noches en vela y las largas ausencias en casa siempre han sido mi bastón para renovarme y llenarme de energía. A mi Negro, con quien siempre he tenido la fortuna de apreciar las pequeñas cosas de la vida de una manera única y diferente, con esa inocencia de niños, como cuando teníamos 5 años. A mi amado hermano menor, Blacky quien estuvo siempre a mi lado y que sin poder decir una sola palabra me llenó de alegría y amor siempre.

Por último pero no menos importante, a Alexander Pinzón, por su compañía y por hacer de mi vida algo más ameno y maravilloso.

Resumen

Leishmania braziliensis es un parásito protozoario intracelular, agente causal de la Leishmaniasis, una enfermedad de alta incidencia cuyo tratamiento ocasiona graves efectos secundarios en el hospedero. En *L. braziliensis* se ha identificado únicamente una NMNAT (enzima central en la biosíntesis del NAD) al igual que en otros parásitos intracelulares como *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*, en comparación con varias isoenzimas reportadas para organismos extracelulares como *Giardia intestinalis* (GiNMNAT1-2) y *Saccharomyces cerevisiae* (ScNMNAT1-3), así como en eucariotas superiores donde se presentan múltiples formas. Esto indica una posible simplificación evolutiva de las rutas de biosíntesis frente a las de transporte en estos organismos, lo que se ha demostrado en parásitos intracelulares procariotas como la bacteria *Protochlamydia amoebophila* que posee 5 proteínas (PamNTT1-5) con capacidad de transportar diversos nucleótidos incluido el NAD⁺ y *Chlamydia trachomatis* para la cual se han identificado 2 transportadores (CtNpt1-2). Esto sugiere, que en parásitos intracelulares eucariotas posiblemente existen procesos de transporte de nucleótidos.

De acuerdo con lo anterior, se propuso el estudio de un candidato a transportador de NAD⁺ en *Leishmania braziliensis* (LbTNTA) mediante la obtención de una herramienta inmunológica desarrollada en el modelo aviar (IgY's), con la cual se detectó a LbTNTA en amastigotes axénicos y promastigotes del parásito con localización sub-celular diferencial para cada estadio, presentando una co-localización parcial en mitocondria en amastigotes axénicos. Adicionalmente, se comprobó que LbTNTA se encuentra modificado por N-glicosilaciones en ambos estadios. Por último, se desarrollaron dos herramientas para evaluar al candidato funcionalmente empleando la complementación en *Saccharomyces cerevisiae* y mediante la expresión de la proteína recombinante MISTIC-LbTNTA insertada en membranas de *E. coli*. Los resultados obtenidos mediante ensayos de complementación permitieron identificar la existencia del primer transportador de NAD⁺ identificado en parásitos protozoarios, el TNTA de *L. braziliensis* (LbTNTA).

Palabras clave: *Leishmania braziliensis*, transportador de nucleótidos, LbTNT, NAD⁺.

Contenido

	Pág.
1. Estado del arte	15
2. Marco teórico	18
2.1. Biosíntesis de NAD⁺	20
2.1.1. Biosíntesis de NAD ⁺ en organismos intracelulares.....	21
2.1.2. Biosíntesis de NAD ⁺ en organismos de vida libre.....	22
2.2. Transporte de nucleótidos	23
2.2.1. Transportadores de nucleótidos en organismos intracelulares.....	24
2.2.2. Transportadores de nucleótidos en organismos de vida libre.....	26
3. Preguntas de investigación	29
4. Hipótesis	30
5. Objetivos	31
5.1. General	31
5.2. Específicos	31
6. Metodología	32
6.1. Diseño de una herramienta inmunológica para el estudio del candidato <i>LbTNTA</i>	32
6.1.1. Obtención del antígeno Trx- <i>LbTNTA</i>	32
6.1.2. Purificación de la proteína Trx- <i>LbTNTA</i>	33
6.1.3. Obtención de anticuerpos aviares IgY α -Trx- <i>LbTNTA</i>	35
6.1.4. Caracterización de IgYs α -Trx- <i>LbTNTA</i>	36
6.2. Detección del candidato <i>LbTNTA</i> endógeno	36
6.2.1. Inmunodetección de <i>LbTNTA</i> endógeno en extractos de <i>Leishmania braziliensis</i>	37
6.2.2. Localización sub-celular.....	38
6.3. Evaluación de la capacidad transportadora del candidato <i>LbTNTA</i>	39
6.3.1. Construcción de plásmidos recombinantes.....	39
6.3.2. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> para ensayos funcionales.....	43
6.3.3. Ensayo de complementación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
6.3.4. Ensayo de reconstitución en liposomas mediada por detergentes.....	45
7. Resultados y discusión	48
7.1. Diseño de una herramienta inmunológica para el estudio del candidato <i>LbTNTA</i>	48
7.1.1. Expresión y purificación de la proteína recombinante Trx- <i>LbTNTA</i>	49
7.1.2. Producción de anticuerpos aviares (IgY's α -Trx- <i>LbTNTA</i>).....	57
7.1.3. Evaluación de IgY's α -Trx- <i>LbTNTA</i>	63
7.2. Determinación de la localización sub-celular del candidato <i>LbTNTA</i> endógeno	65
7.2.1. Inmunodetección sobre extractos proteicos de <i>L. braziliensis</i>	65
7.2.2. Localización sub-celular del candidato <i>LbTNTA</i> en <i>L. braziliensis</i>	72
7.3. Evaluación de la capacidad transportadora del candidato <i>LbTNTA</i>	82
7.3.1. Evaluación de la capacidad transportadora mediante complementación en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
7.3.2. Evaluación funcional empleando un sistema para la reconstitución en liposomas de <i>LbTNTA</i> mediada por detergentes.....	92

7.3.3. Evaluación funcional empleando un sistema para la obtención del candidato recombinante en membranas de <i>E. coli</i>	98
8. Conclusiones	103
9. Perspectivas	105
10. Bibliografía	106

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Reconstrucción del metabolismo del NAD ⁺ en <i>Leishmania braziliensis</i>	15
Figura 1-2: Modelos predictivos de estructura terciaria obtenidos mediante I-TASSER para los candidatos a transportadores de NAD ⁺ en <i>Leishmania braziliensis</i>	16
Figura 2-1: Estructuras del NAD(P) ⁺ y el NAD(P)H.....	18
Figura 2-2: Funciones del NAD(P) ⁺ a nivel celular.....	19
Figura 2-3: Biosíntesis de NAD ⁺ , rutas <i>de novo</i> y de salvamento	20
Figura 2-4: Rutas de reciclaje de la biosíntesis de NAD ⁺ en <i>Plasmodium falciparum</i> y en el glóbulo rojo del hospedero humano	21
Figura 2-5: Rutas de biosíntesis de NAD ⁺ en <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
Figura 2-6: Modelo de interacción entre los transportadores de nucleótidos identificados en <i>Protoclamydia amoebophila</i>	25
Figura 7-1. Evaluación de la identidad del vector pBAD202/ <i>LbTNTA</i>	49
Figura 7-2. Estandarización de las condiciones óptimas de expresión de Trx- <i>LbTNTA</i>	52
Figura 7-3. Purificación Trx- <i>LbTNTA</i> empleando cuerpos de inclusión de <i>E. coli</i> y SDS-PAGE preparativo	54
Figura 7-4. Cuantificación densitométrica de la proteína recombinante Trx- <i>LbTNTA</i>	55
Figura 7-5. Predicción de epítomos para <i>LbTNTA</i>	59
Figura 7-6. Evaluación de los modelos de estructura terciaria para <i>LbTNTA</i>	60
Figura 7-7. Disposición espacial de los epítomos predichos con BepiPred-2.0 sobre el modelo de estructura terciaria obtenido mediante ROBETTA para <i>LbTNTA</i>	61
Figura 7-8. Evaluación de sangrías α -Trx- <i>LbTNTA</i>	63
Figura 7-9. Evaluación de anticuerpos α -Trx- <i>LbTNTA</i> mediante western blot.....	64
Figura 7-10. Inmunodetección del candidato <i>LbTNTA</i> sobre extractos proteicos de amastigotes axénicos y promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	65
Figura 7-11. Predicción de la topología del candidato <i>LbTNTA</i> mediante PHYRE2 y CCTOP..	69
Figura 7-12. Localización de las O- y N-glicosilaciones predichas para <i>LbTNTA</i> mediante el servidor GlycoEP	70
Figura 7-13. Evaluación de glicosilaciones presentes en el candidato <i>LbTNTA</i> endógeno.....	71
Figura 7-14. Inmunolocalización de <i>LbTNTA</i> endógeno en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> con α -Trx- <i>LbTNTA</i> 1:100	73

Figura 7-15. Inmunolocalización de <i>LbTNTA</i> endógeno en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> con α -Trx- <i>LbTNTA</i> purificados 1:10.....	74
Figura 7-16. Ensayo de co-localización en mitocondria para <i>LbTNTA</i> endógeno en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i>	74
Figura 7-17. Ensayo de co-localización en mitocondria para <i>LbTNTA</i> endógeno en amastigotes axénicos de <i>Leishmania braziliensis</i>	75
Figura 7-18. Fraccionamiento celular de amastigotes axénicos y promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i>	77
Figura 7-19. Representación de las principales características estructurales de la MCF sobre el modelo de estructura terciara de <i>LbTNTA</i>	79
Figura 7-20. Representación de las principales características estructurales de la familia de transportadores mitocondriales sobre el modelo de estructura primaria de <i>LbTNTA</i>	80
Figura 7-21. Sub-clonación de <i>LbTNTA</i> en pGEMT-Easy.....	84
Figura 7-22. Clonación de <i>LbTNTA</i> en pYES2.....	85
Figura 7-23. Sub-clonación de <i>A\daggerNDT2</i> en pGEMT-Easy	87
Figura 7-24. Clonación de <i>A\daggerNDT2</i> en pYES2	88
Figura 7-25. Evaluación del crecimiento en medio líquido MS Ura- suplementado con galactosa 0.1 %(p/v) ensayos de complementación	90
Figura 7-26. Evaluación del crecimiento en medio sólido MS Ura- suplementado con galactosa 0.1 %(p/v) ensayos de complementación	90
Figura 7-27. Clonación de <i>A\daggerNDT2</i> en pBAD202/d-TOPO	93
Figura 7-28. Evaluación de la expresión de la proteína Trx- <i>A\daggerNDT2</i>	94
Figura 7-29. Proceso de obtención de eritrocitos fantasma mediante choque hipotónico	95
Figura 7-30. Evaluación del proceso de extracción de lípidos de membranas de eritrocitos humanos.....	97
Figura 7-31. Vectores recombinantes pET28xMISTIC/ <i>LbTNTA</i> y pET28xMISTIC/ <i>A\daggerNDT2</i>	98
Figura 7-32. Clonación de <i>LbTNTA</i> en pET28xMISTIC.....	99
Figura 7-33. Clonación de <i>A\daggerNDT2</i> en pET28xMISTIC.....	100
Figura 7-34. Evaluación de la expresión de las proteínas MISTIC- <i>LbTNTA</i> y MISTIC- <i>A\daggerNDT2</i>	101

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Transportadores de nucleótidos identificados en diversos organismos intracelulares...	26
Tabla 2-2: Transportadores de nucleótidos identificados en diversos organismos de vida libre.....	27
Tabla 6-1. Esquema de inoculación de gallinas para la obtención de IgYs.....	35
Tabla 6-2. Composición del medio mínimo sintético (MMS) Ura ^r	44
Tabla 7-1. Predicción de glicosilaciones para <i>LbTNTA</i>	68
Tabla 7-2. Cebadores diseñados para la clonación de <i>LbTNTA</i> en el vector de levadura pYES2	83
Tabla 7-3. Cebadores diseñados para la clonación de <i>AαNDT2</i> en el vector de levadura pYES2.	86
Tabla 7-4. Cebadores diseñados para la clonación de <i>AαNDT2</i> en el vector pBAD202/d-TOPO	93

Lista de abreviaturas

NMNAT	Nicotinamida
NAD ⁺	Dinucleótido de adenina y nicotinamida Oxidado
IgY's	Inmunoglobulina Y de gallina
SLC	Familia de transportadores de solutos
MCF	Familia de transportadores mitocondriales
ATP	Adenosin trifosfato
ADP	Adenosin difosfato
NADPH	NAD fosfato reducido
NADP ⁺	NAD fosfato oxidado
3(2)'OAADPr	O-acetil-ADP-ribosa
ART's	ADP-ribosiltransferasas
cADPPr	ADP-fosfato-ribosa cíclico
NaADP ⁺	Dinucleótido de ácido nicotínico y adenina fosforilado
NaMN	Mononucleótido del ácido nicotínico
NMN	Mononucleótido de nicotinamida

Introducción

Leishmania braziliensis es un parásito intracelular que genera una enfermedad conocida como Leishmaniasis la cual ocasiona lesiones que pueden variar desde úlceras y nódulos lisos hasta lesiones hiperqueratósicas. De igual manera se considera que tiene una alta incidencia a nivel mundial ya que produce entre 0.7 y 1.3 millones de nuevos casos al año, de los cuales dos terceras partes se presentan en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, República Islámica del Irán y República Árabe Siria. A pesar de que el tratamiento de esta enfermedad actualmente se lleva a cabo con medicamentos como las sales de antimonio pentavalente (Sb⁺⁵), la anfotericina B y la miltefosina, estos ocasionan graves efectos secundarios en el hospedero, por lo tanto es de vital importancia identificar nuevos fármacos y dianas terapéuticas partiendo del estudio del metabolismo del parásito y específicamente, mediante este trabajo, del metabolismo del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺). Su importancia radica en que tiene un rol principal como transportador de electrones puesto que es coenzima en reacciones de óxido-reducción y adicionalmente interviene en otros procesos como la regulación del ciclo celular.

En todos los organismos se ha identificado una estrecha relación entre las rutas biosintéticas y de transporte desde su entorno, las cuales, a su vez, se relacionan con el modo de vida de cada organismo, por ejemplo, en organismos de vida libre las rutas biosintéticas de nucleótidos son complejas, encontrándose asimismo varias isoenzimas involucradas, presentes en diferentes compartimentos subcelulares como el núcleo, la mitocondria o el citosol. Por el contrario, en organismos intracelulares de vida parasitaria obligada, las rutas biosintéticas han desaparecido completa o parcialmente y en contraste se han perfeccionado sistemas de transporte de nucleótidos, ocasionando que su principal y en algunos casos única fuente de nucleótidos sea mediante este proceso.

En cuanto a la biosíntesis de nucleótidos como el NAD⁺, esta se lleva a cabo mediante dos rutas, denominadas *de novo* y de salvamento. Ambas rutas tienen un paso en común catalizado por la enzima Nicotinamida/Nicotinato MonoNucleótido Adenilil Transferasa (NMNAT). Hasta la fecha se ha identificado esta enzima en organismos extracelulares como *Giardia intestinalis* (2 isoenzimas *GiNMNAT1-2*) y *Saccharomyces cerevisiae* (3 isoenzimas *ScNMNAT1-2*) e incluso en eucariotas más evolucionados como *Homo sapiens* (3 isoenzimas *HsNMNAT1-3*). En contraste, ha sido

identificada únicamente una isoenzima en organismos intracelulares como *Leishmania braziliensis* (*LbNMNAT*), *Trypanosoma cruzi* (*TcNMNAT*) y *Plasmodium falciparum* (*PfNMNAT*).

Por otra parte, el transporte de nucleótidos se ha relacionado con proteínas transportadoras de la familia de transportadores de solutos (SLC), también conocida como la familia de transportadores mitocondriales (MCF). Este tipo de transportadores se ha identificado en la membrana citoplasmática de parásitos intracelulares procariotas como *Protochlamydia amoebophila* (5 transportadores *PamNTT1-5*) y *Chlamydia trachomatis* (2 transportadores *CtNTT1-2*), y en parásitos intracelulares eucariotas como *Trypanosoma brucei*, se ha identificado un miembro de esta familia localizado diferencialmente en glicosoma/mitocondria a lo largo de su ciclo de vida. Por otra parte en organismos eucariotas de vida libre, también se han identificado estos transportadores localizados en la membrana de organelos internos, como por ejemplo en *Saccharomyces cerevisiae* (*ScNDT1* y *ScNDT2*, mitocondriales), *Arabidopsis thaliana* (*AtNDT1* cloroplastico y *AtNDT2* mitocondrial) y *Homo sapiens* (*HsSLC25A17* peroxisomal, *HsSLC25A33* y *HsSLC25A36* mitocondriales, entre otros). Estos estudios demuestran que en parásitos intracelulares procariotas, los transportadores de nucleótidos se encuentran localizados en la membrana citoplasmática, mientras que en organismos de vida libre están ubicados en la membrana de organelos internos.

De acuerdo con esto, es posible que debido a la disponibilidad de nutrientes tomados del hospedero, los parásitos intracelulares hayan eliminado rutas de biosíntesis de nucleótidos redundantes y en contraste perfeccionado sistemas de transporte (entre compartimentos sub-celulares y con su entrono) energéticamente más favorables. De esta manera, es posible que parásitos intracelulares como *Leishmania braziliensis* con una única NMNAT citosólica, en comparación con organismos de vida libre que poseen varias copias de esta enzima (isoenzimas), compense los requerimientos de este nucleótido mediante proteínas con capacidad de transportarlo, tanto desde su entorno como entre compartimentos sub-celulares.

En *Leishmania braziliensis* previamente se reconstruyó el metabolismo del NAD⁺, lo cual permitió proponer la existencia de transportadores de este dinucleótido y de sus precursores, a partir de los cuales el parásito mantiene su homeostasis. De esta manera, en un trabajo anterior de nuestro grupo de investigación LIBBIQ (Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica) se seleccionaron 3 candidatos a transportadores de NAD⁺, para los cuales, mediante análisis bioinformáticos, se predijeron propiedades y estructuras comunes de proteínas transportadoras y una alta identidad de los modelos predichos con un transportador de nucleótidos de adenina caracterizado experimentalmente. Adicionalmente se construyeron vectores recombinantes para cada uno de ellos

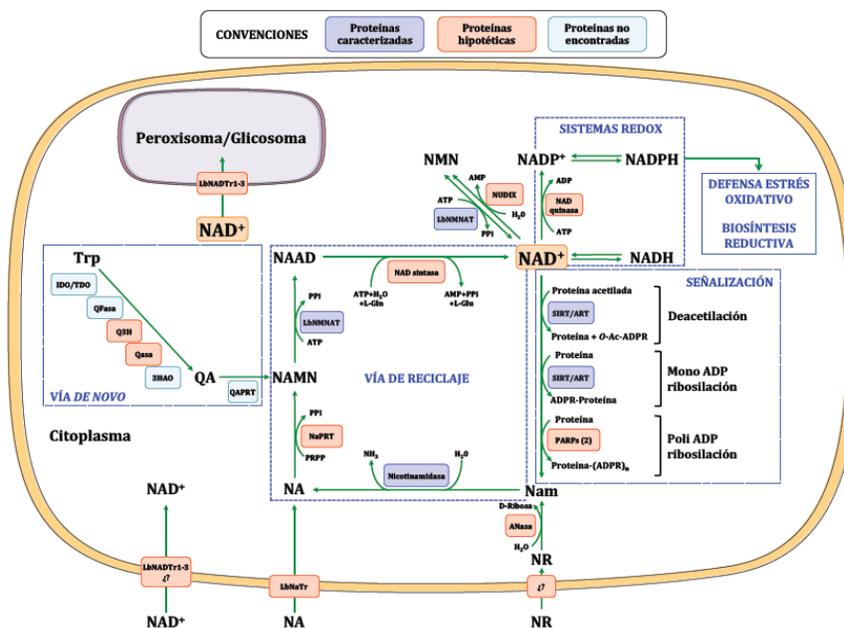
como una primera aproximación experimental y a partir de estos resultados se propone este trabajo como continuación para la caracterización de uno de ellos.

En este trabajo se identificó el candidato *LbTNTA* en ambos estadios de *Leishmania braziliensis* y su localización sub-celular, a partir de una herramienta inmunológica diseñada y obtenida en el modelo aviar. Adicionalmente, se produjeron herramientas para la evaluación funcional del candidato. De esta manera, este estudio complementa la reconstrucción del metabolismo energético del NAD⁺ en el parásito intracelular *Leishmania braziliensis*.

1. Estado del arte

En *Leishmania braziliensis* se ha estudiado el metabolismo del NAD⁺ identificándose que este juega un papel importante para el parásito, ya que no solo participa como coenzima en el metabolismo energético y en la defensa ante el estrés oxidativo, sino que también, como sustrato para la regulación de la expresión génica y el ciclo celular, reacciones en las que se consume, por lo tanto, es necesario su constante abastecimiento. A pesar de esto y a diferencia de otros organismos que poseen varias isoenzimas localizadas en diversos compartimentos sub-celulares, en *L. braziliensis* se ha identificado una única NMNAT citosólica, enzima crucial en la biosíntesis del dinucleótido¹. Lo anterior permite plantear la hipótesis de que existen otros mecanismos, diferentes a la biosíntesis, mediante los cuales el parásito mantiene la homeostasis de este dinucleótido. De acuerdo con esto y con la reconstrucción del metabolismo del NAD⁺ en el parásito (**Figura 1-1**) se planteó la existencia de posibles transportadores de NAD⁺ tanto en la membrana de organelos internos como en la citoplasmática, mediante los cuales se suplen los requerimientos intracelulares².

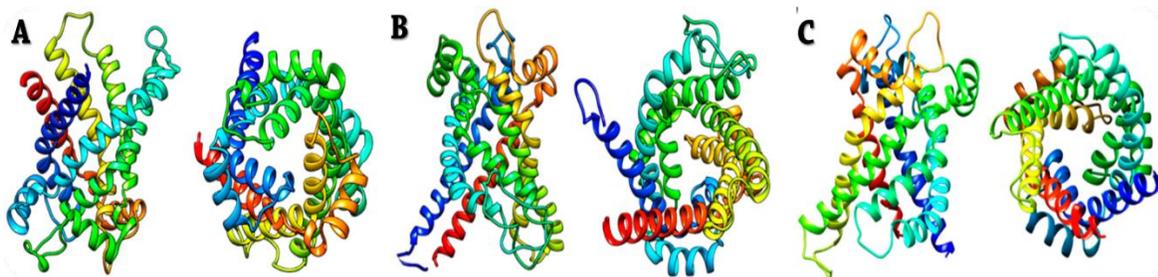
Figura 1-1: Reconstrucción del metabolismo del NAD⁺ en *Leishmania braziliensis*. A partir de diversos estudios relacionados con el NAD⁺ en *L. braziliensis*, nuestro laboratorio propuso previamente un modelo de su metabolismo², en el cual se muestran los diferentes procesos en los que participa, tanto como coenzima (metabolismo energético y defensa ante el estrés oxidativo) como sustrato (regulación de la expresión génica y el ciclo celular), así como las rutas de su biosíntesis y posible transporte.



A partir de la reconstrucción del metabolismo del NAD⁺ en *L. braziliensis*, nuestro grupo de investigación LIBBIQ realizó la búsqueda de candidatos a transportadores de NAD⁺ en el genoma del parásito, utilizando como plantilla el consenso de la secuencia de transportadores de este dinucleótido caracterizados experimentalmente, como pro ejemplo, el transportador de *Arabidopsis thaliana* AtNDT1 (Gene ID: 839124) y el de *Saccharomyces cerevisiae* ScNDT2 (Gene ID: 856712). A partir de esta búsqueda se seleccionaron 3 candidatos con 362, 337 y 318 aminoácidos, los cuales fueron denominados *LbTNTA* (Gene ID: 5419384), *LbTNTB* (Gene ID: 5418403) y *LbTNTC* (Gene ID: 5413978) respectivamente³.

De acuerdo con un primer acercamiento bioinformático, se determinó para los tres candidatos un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos característico de proteínas de membrana. Adicionalmente se identificó el dominio estructural de la familia de transportadores mitocondriales (IPR023395 en InterPro) y 3 motivos repetitivos relacionados con este dominio (PF00153 en Pfam), el cual está compuesto por 6 hélices alfa transmembranales compactas que, de igual manera, fueron predichas por diversos servidores en cada uno de los casos y concuerdan con los modelos predictivos de topología. Por último se construyeron modelos de estructura terciaria, en los cuales se evidencia una conformación tipo *canal* (**Figura 1-2**), característica de proteínas transportadoras de membrana. A partir de estos modelos se identificó una alta identidad con la translocasa de ATP/ADP de *Bos Taurus* (1okc en PDB) lo que indica una posible interacción con nucleótidos de adenina.

Figura 1-2: Modelos predictivos de estructura terciaria obtenidos mediante I-TASSER para los candidatos a transportadores de NAD⁺ en *Leishmania braziliensis*. Para cada modelo se muestran las vistas frontal (izquierda) y superior (derecha) de los candidatos **A.** *LbTNTA*, **B.** *LbTNTB* y **C.** *LbTNTC*³.



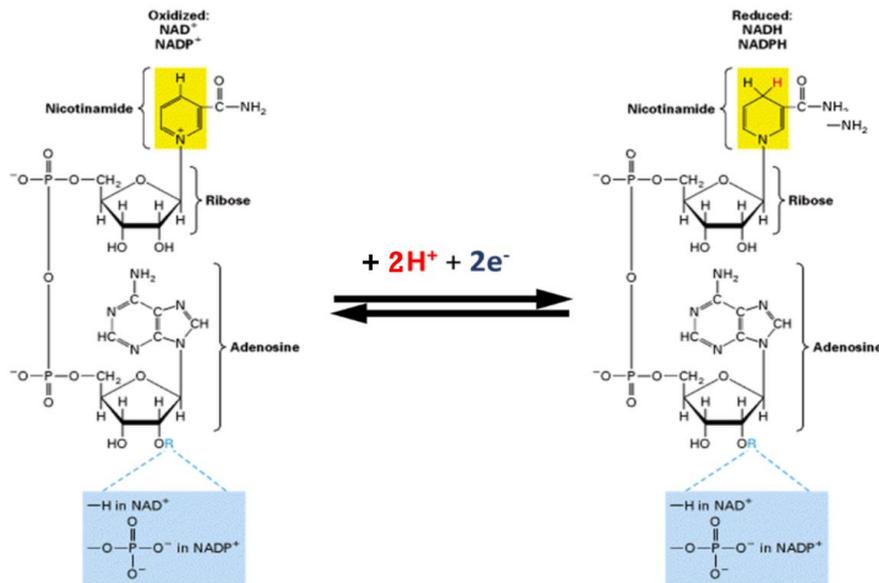
Basados en los resultados anteriores se llevó a cabo una aproximación experimental mediante la cual se construyeron vectores recombinantes para cada uno de los candidatos, con los cuales se comprobó un carácter hidrofóbico de las proteínas recombinantes producidas y su acumulación en la fracción insoluble al ser expresados en el sistema heterólogo *Escherichia coli*. A partir de estos constructos

se planteó este proyecto con el objetivo de identificar y caracterizar uno de los candidatos a transportador de NAD+ (*LbTNTA*).

2. Marco teórico

El dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD⁺) es una coenzima conformada por dos nucleótidos unidos a través de un enlace fosfoanhidro, de los cuales uno contiene un anillo de nicotinamida y el otro uno de adenina. Este dinucleótido se puede encontrar en dos formas en la célula, como NAD⁺, correspondiente con su forma oxidada, siendo capaz de aceptar un par de electrones en forma de ion hidruro (H⁻) pasando así a su forma reducida NADH, lo que lo convierte en un donador de electrones. A su vez, cada una de estas especies puede sufrir una fosforilación en la posición 2' de la ribosa de la adenosina para dar lugar al NADPH y al NADP⁺ (**Figura 2-1**)⁴.

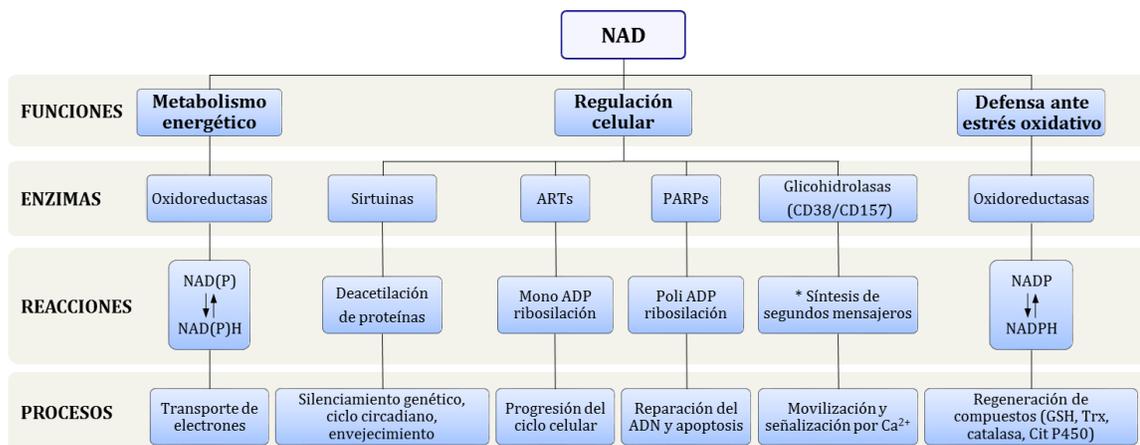
Figura 2-1: Estructuras del NAD(P)⁺ y el NAD(P)H.⁵



El NAD⁺ tiene un amplio espectro de funciones a nivel celular (**Figura 2-2**)². En primer lugar hace parte del metabolismo energético en donde transporta electrones desde diversas especies químicas para la producción de ATP en la mitocondria. Este proceso es mediado por deshidrogenasas que se encargan de catalizar el transporte de electrones hacia el NAD⁺ o NADP⁺. Asimismo su distribución en la célula es diversa ya que algunas se encuentran únicamente en el citosol, otras únicamente en la mitocondria y algunas de ellas poseen isoenzimas en ambos compartimentos subcelulares. El complejo NAD-Deshidrogenasa remueve 2 átomos de hidrógeno de los sustratos, uno de ellos se transfiere como un hidruro (:H⁻) al NAD⁺ y el otro es liberado al medio como H⁺.

Vías importantes como el ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs), la β -oxidación (oxidación de ácidos grasos), la oxidación de aminoácidos, la descarboxilación oxidativa del piruvato (catalizada por la piruvato deshidrogenasa) y la glicólisis son algunos procesos en los que interviene el NAD^+ como coenzima⁴.

Figura 2-2: Funciones del NAD(P)^+ a nivel celular.²



Por otra parte, este dinucleótido es consumido en procesos que regulan el ciclo celular como la deacetilación de histonas por las sirtuinas, las cuales actúan mediante la transferencia de un grupo acetilo de los residuos de lisina de las histonas al grupo ADP-ribosa del NAD^+ , liberando nicotinamida y O-acetil-ADP-ribosa (3(2)'OAADPr). Este proceso está relacionado con la regulación de la transcripción y la modificación de la estructura del nucleosoma⁶.

Otro proceso en el cual el NAD^+ es utilizado como co-sustrato es la ADP-Ribosilación, reacción catalizada por las ADP-ribosiltransferasas (ART's). Esta reacción consiste en la transferencia de uno o más grupos ADP-ribosa sobre residuos de arginina, ácido glutámico o aspártico de diversas proteínas. La mono-ADP-ribosilación está relacionada con la progresión del ciclo celular, mientras que la poli-ADP-ribosilación lo está con la regulación de procesos como la reparación del ADN y la apoptosis⁷.

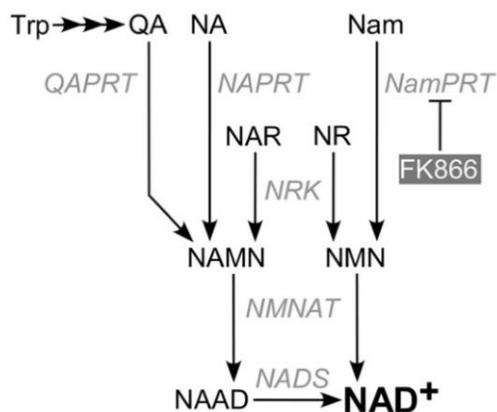
La forma fosforilada del dinucleótido, el NADP^+ , es sustrato de las ADP-ribosil ciclasas, generando como producto la ADP-fosfato-ribosa cíclico (cADPPr) que tiene papel como segundo mensajero para la movilización de calcio (Ca^{+2}). Asimismo estas ciclasas tienen la capacidad de intercambiar la nicotinamida por el ácido nicotínico en el NADP^+ para formar otra de las moléculas señalizadoras, el dinucleótido de ácido nicotínico y adenina fosforilado (NaADP^+). La movilización ocurre

mediante señales internas que conducen a la apertura de canales de calcio denominados receptores de rianodina, localizados en la membrana de organelos como el retículo endoplasmático [5, 6].

2.1. Biosíntesis de NAD⁺

El NAD⁺ es sintetizado mediante dos rutas principalmente (**Figura 2-3**), la primera denominada *de novo* a partir de aminoácidos esenciales como el triptófano y la segunda denominada de salvamento mediante el reciclaje de productos de las reacciones en donde se consume el dinucleótido, como los son la nicotinamida, el ácido nicotínico o el ribósido del ácido nicotínico ¹⁰.

Figura 2-3: Biosíntesis de NAD⁺, rutas *de novo* y de salvamento. ¹¹ La biosíntesis del NAD⁺ puede ser llevada a cabo mediante dos rutas, denominadas *de novo* y de salvamento, en las cuales intervienen las siguientes especies: Trp, triptófano; Qa, ácido quinolínico; NaMN, nucleótido de ácido nicotínico; NaAD, dinucleótido de ácido nicotínico y adenina; NaR, ribósido de ácido nicotínico; Na, ácido nicotínico; NR, ribósido de nicotinamida; Nam, nicotinamida; NMN, mononucleótido de nicotinamida; NaMN, mononucleótido del ácido nicotínico; NMNAT, Nicotinamida Mononucleótido Adenililtransferasa.



- Ruta *de novo*:

Esta ruta se lleva a cabo a partir de aminoácidos como el triptófano (Trp) en animales y algunas bacterias o el ácido aspártico (Asp) en bacterias y plantas, los cuales dan lugar al ácido quinolínico (Qa) que se convierte en el mononucleótido del ácido nicotínico (NaMN) mediante la transferencia de un grupo fosforibosa catalizado por la respectiva fosforibosil transferasa (QA-, NA- y Nam-PRT). A continuación la Nicotinamida Mononucleótido Adenililtransferasa (NMNAT) cataliza la condensación de un grupo adenilato del ATP para formar el dinucleótido del ácido nicotínico y adenina (NaAD). Por último se transfiere un grupo amino al ácido nicotínico del NaAD desde la

glutamina para completar la biosíntesis del NAD⁺, una fracción de este se convierten en NADP⁺ por acción de NAD⁺ kinasas.

- Ruta de salvamento:

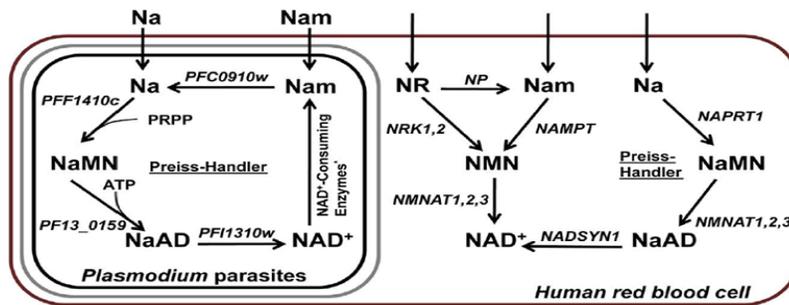
Esta ruta se caracteriza por la síntesis a partir de precursores que contienen el anillo de nicotinamida entre los que se encuentran el ribósido de ácido nicotínico (NaR), el ácido nicotínico (Na), el ribósido de nicotinamida (NR) y la misma nicotinamida (Nam), los cuales pueden ser adquiridos a partir de la dieta (vitamina B3 o niacina) y asimismo son producidos por la célula producto de las reacciones de transferencia de la ADP-ribosa. Estos precursores son convertidos en el mononucleótido de nicotinamida (NMN) o el mononucleótido del ácido nicotínico (NaMN) y posteriormente, por acción de la NMNAT se completa la biosíntesis del NAD⁺.

2.1.1. Biosíntesis de NAD⁺ en organismos intracelulares

En *Trypanosoma cruzi*, un parásito intracelular se identificó esta enzima por medio de análisis bioinformáticos y se generó un modelo predictivo de la estructura terciaria de la proteína el cual presentó una alta identidad con la NMNAT3 humana. Experimentalmente se comprobó la actividad adenililtransferasa típica de las NMNAT's tanto para el NaMN como para el NMN, se determinaron los parámetros cinéticos para los sustratos ATP y NMN así como la temperatura y pH óptimos (30 °C y 7.5 respectivamente). Por último se diseñó un mutante delecional en el extremo amino terminal mediante herramientas bioinformáticas el cual posiblemente regule la actividad de la enzima mediante modificaciones post-traduccionales ¹².

En otro estudio se caracterizaron algunas enzimas relacionadas con el metabolismo del NAD⁺ en el parásito intracelular *Plasmodium falciparum* (**Figura 2-4**), con lo que se identificó y comprobó la actividad enzimática de la NMNAT con preferencia por el NaMN que por el NMN. Adicionalmente se identificó su localización en el citoplasma del parásito. Esta enzima presenta alta divergencia con la ortóloga humana lo que la convierte en un posible blanco terapéutico. Finalmente, se comprobó la importancia del residuo conservado Asp110 para la actividad catalítica de la enzima ¹³.

Figura 2-4: Rutas de reciclaje de la biosíntesis de NAD⁺ en *Plasmodium falciparum* y en el glóbulo rojo del hospedero humano ¹³.



Finalmente, se identificó en el parásito intracelular *Leishmania braziliensis* únicamente una enzima con actividad NMNAT localizada en el citoplasma, la cual cuenta con una inserción amino terminal específica para el género *Leishmania* relacionada con su actividad enzimática, lo que convierte a esta región en un posible blanco terapéutico ¹. Adicionalmente, se construyó un modelo de estructura terciaria mediante homología a partir de la *HsNMNAT3*, en el cual se identificaron los plegamientos característicos para este tipo de proteínas y por último se establecieron los parámetros cinéticos de la NMNAT tanto para el ATP como para el NMN.

2.1.2. Biosíntesis de NAD⁺ en organismos de vida libre

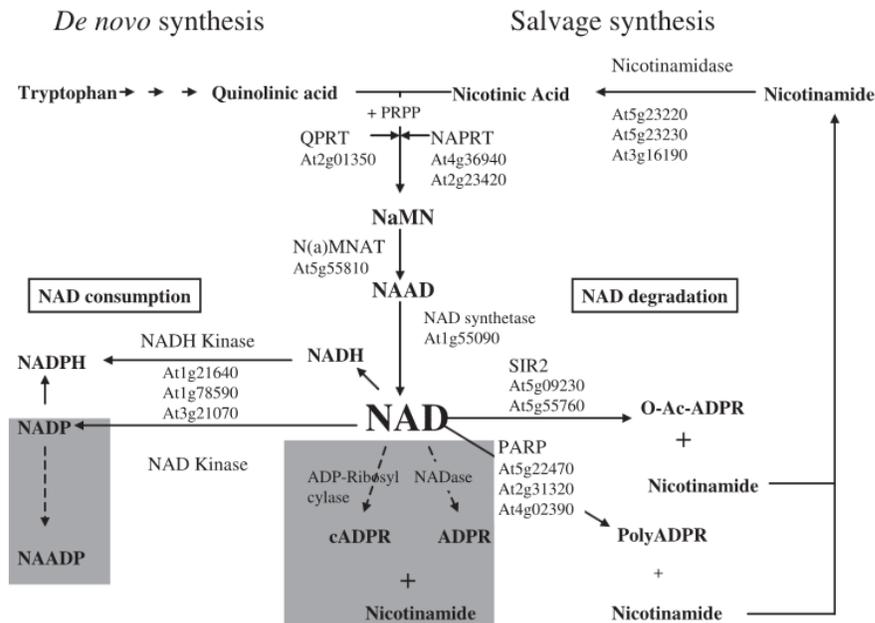
Las NMNAT se han identificado en todos los dominios de la vida desde bacterias hasta eucariotas, a continuación se muestran algunos estudios en los que se evidencia la presencia de varias isoformas para esta enzima en diversos organismos:

En parásitos extracelulares como *Giardia intestinalis* se identificaron *in-silico* dos isoformas *GiNMNATa-b*, de las cuales se comprobó la actividad adeniltransferasa para la *GiNMNATa* tanto con el NMN como con el NaMN bajo condiciones óptimas de pH y temperatura de 7.3 y 26 °C respectivamente. Adicionalmente se identificó una cinética de Michaelis-Menten para el NMN y el ATP y una baja afinidad por el NaMN ¹⁴. De manera análoga, en la bacteria gram negativa *Escherichia coli* se identificó una NMNAT con mayor afinidad hacia el NaMN con respecto al mononucleótido de nicotinamida ¹⁵.

Por otra parte, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta 3 isoenzimas de la NMNAT (*ScNMNAT1-3*), para *yNMNAT-1* se determinó preferencia por el NMN ¹⁶, mientras que para *yNMNAT-2* para NaMN, adicionalmente esta última presenta mayor afinidad por el ATP ¹⁷. Asimismo, la tercer isoenzima tiene preferencia por el NMN pero presenta menor afinidad por este en comparación con las demás y se encuentra co-localizada en el núcleo y el citoplasma, ¹⁸.

En plantas se ha identificado una NMNAT en *Arabidopsis thaliana* (*AtNMNAT*) con la capacidad de sintetizar NAD⁺ a partir del NMN o del NaMN [9, 10], ya que, como se muestra en la **Figura 2-5**, las vías *de novo* y de reciclaje convergen en la producción de NAAD a partir del NaMN (el cual puede provenir de la desaminación oxidativa de la nicotinamida), por lo tanto para este organismo no es necesario tener varias isoformas como si ocurre en levaduras y algunos mamíferos.

Figura 2-5: Rutas de biosíntesis de NAD⁺ en *Arabidopsis thaliana*.²⁰



La importancia de la biosíntesis del NAD⁺ se ha estudiado en eucariotas superiores como el *Homo sapiens* para el cual se han identificado 3 isoformas de la NMNAT ubicadas en el núcleo (NMNAT1), el aparato de Golgi (NMNAT2) y la mitocondria (NMNAT3), esta última presenta una alta tolerancia a las modificaciones que pueda presentar el sustrato. Mientras que la NMNAT1, muestra una preferencia por la síntesis de NAD⁺ (forma oxidada), las otras dos isoformas lo hacen por la del NADH (forma reducida). Adicionalmente se ha demostrado que cada una de las isoformas se encuentra relacionada con funciones específicas en cada compartimiento subcelular²¹.

2.2. Transporte de nucleótidos

El transporte de sustancias a través de una membrana puede ser clasificado teniendo en cuenta el gasto energético involucrado en el proceso, de acuerdo con esto se pueden identificar dos tipos de transporte como se muestra a continuación²²:

Transporte pasivo: no se requiere energía para llevar a cabo el transporte de la sustancia debido a que este se realiza a favor de su gradiente de concentración. A su vez se puede dividir en difusión simple (No requiere de una proteína que medie el transporte) y difusión facilitada (Requiere de una proteína que medie el transporte).

Transporte activo: se requiere energía para llevar a cabo el transporte de la sustancia debido a que este se realiza en contra de su gradiente de concentración involucrando proteínas transportadoras. La energía puede provenir de diferentes fuentes, de acuerdo con este aspecto se puede clasificar en transporte activo primario (La energía proviene de una reacción exergónica como la hidrólisis de un enlace pirofosfato, generalmente del ATP) o transporte activo secundario correspondiente con un transporte acoplado de dos sustancias, una en contra de su gradiente de concentración y la otra a favor, cuyo transporte activo primario (en otro transportador) suministra la energía.

El transporte de nucleótidos está relacionado con proteínas de membrana, las cuales han sido clasificadas en la Familia de Transportadores de Nucleótidos (NTT's) y a su vez en la de transportadores antiparalelos ATP/ADP (AAA). La capacidad transportadora de estas proteínas se ha ordenado en tres grupos ²³:

- a. Clase I: Pertenecen aquellas proteínas que llevan a cabo el proceso antiporte.
- b. Clase II: Pertenecen aquellas proteínas que realizan simporte impulsado por protones.
- c. Clase III: Pertenecen aquellas proteínas relacionadas con el antiporte de NAD⁺/ADP.

2.2.1. Transportadores de nucleótidos en organismos intracelulares

Principalmente se han estudiado proteínas transportadoras en procariotas, como es el caso de las bacterias del orden Chlamydiales cuyos miembros han perdido la capacidad de sintetizar nucleótidos por la ruta *de novo* y algunos otros también por la ruta de salvamento. Una característica de las especies de este orden es que son organismos intracelulares obligados, por consiguiente se encuentran en un medio rico en nutrientes esenciales con lo cual desarrollaron evolutivamente mecanismos de transporte selectivos de manera paralela a la eliminación de vías biosintéticas redundantes.

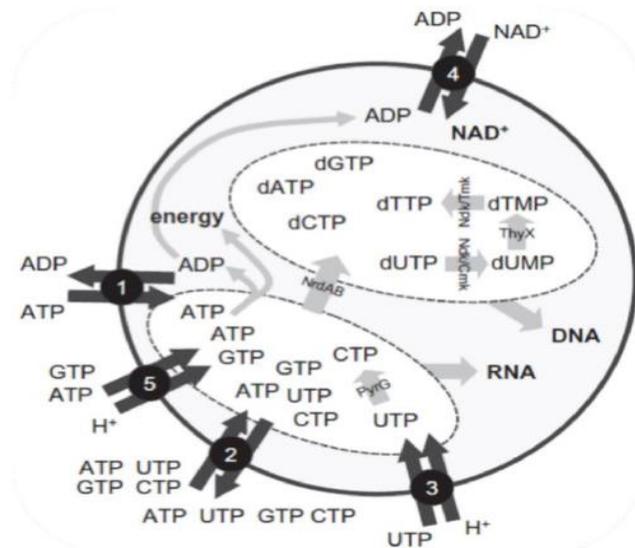
En *Chlamydia trachomatis* se han identificado dos transportadores, uno de ellos, denominado Npt1ct (*CtNTT1*) corresponde con un transportador híbrido antiporte clase I/III con la capacidad de

translocar ATP o NAD⁺ con el ADP y el segundo Npt2ct (*CtNTT2*) pertenece a la clase II un simporte con la habilidad de transportar nucleótidos como ATP, GTP, UTP y CTP impulsado por protones ²³.

Otro ejemplo es *Protochamylidia amoebophila* para la cual se han identificado cinco transportadores encargados del transporte de nucleótidos. De acuerdo con la clasificación anterior los cinco transportadores se encuentran agrupados en tres clases: clase I, *PamNTT1* el cual es una translocasa de ATP/ADP y *PamNTT2* que presenta alta homología con *CtNTT1* y tiene la capacidad de translocar los cuatro constituyentes del ARN; clase II, *PamNTT3* y *PamNTT5* con afinidad hacia el UTP para el primero y con GTP y ATP para el segundo; y por último la clase III, *PamNTT4* que muestra alta identidad con el transportador ATP/ADP de *Arabidopsis thaliana* (*AtNTT1*) y que tiene mayor preferencia con los nucleósidos difosfato. Adicionalmente para este último se determinó que la presencia de NAD⁺ y NADH disminuye significativamente la actividad del transportador, demostrando la alta afinidad por estos nucleótidos de pirimidina (velocidad de 80 nM/mg.h) y un intercambio antiparalelo de las especies NAD⁺/ADP ²⁴.

En *P. amoebophila* se ha postulado un modelo de las interacciones metabólicas entre sus cinco transportadores en el que *PamNTT1* y *PamNTT2* proveen el ATP que es convertido en ADP por los procesos celulares y que posteriormente es intercambiado por NAD⁺ del medio extracelular por *PamNTT4* (**Figura 2-6**) lo cual explica la existencia de los diversos transportadores ²⁴.

Figura 2-6: Modelo de interacción entre los transportadores de nucleótidos identificados en *Protochamylidia amoebophila*. ²⁴ En donde: 1 corresponde con *PamNTT1*, 2 con *PamNTT2*, 3 con *PamNTT3*, 4 con *PamNTT4* y 5 con *PamNTT5*.



En el mismo sentido se ha identificado que el patógeno intracelular *Rickettsia prowazekii* posee cinco transportadores de nucleótidos (*Tlc1-5*) con afinidad y especificidad diferencial a cada uno de estos ²⁵.

En el paramecio endosimbionte *Caedibacter caryophilus* también se ha identificado una translocasa en la membrana celular correspondiente a la clase I con la capacidad de transportar nucleósidos de adenina di- o tri- fosfato modificados, como el dATP y el ddATP por intercambio antiporte de ATP, lo que puede contribuir a la comprensión de la especificidad de este tipo de transportadores. Este sistema ha sido relacionado con la síntesis de ADN ya que puede estar regulando los niveles de dATP en el interior de la célula ²⁶. En la Tabla 2-1 se resume lo anteriormente expuesto.

Tabla 2-1: Transportadores de nucleótidos identificados en diversos organismos intracelulares.

Organismo	Transportador	Especies que transporta	Localización	Clasificación
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Npt1ct</i> (CtNTT1)	ATP, NAD, ADP	Membrana	Clase I-III
	<i>Npt2ct</i> (CtNTT2)	ATP, GTP, UTP y CTP	Membrana	Clase II
<i>Protochlamydia amoebophila</i>	<i>PamNTT1</i>	ATP y ADP	Membrana	Clase I
	<i>PamNTT2</i>	ATP, UTP, GTP y CTP	Membrana	Clase I
	<i>PamNTT3</i>	UTP	Membrana	Clase II
	<i>PamNTT4</i>	NAD ⁺ y ADP	Membrana	Clase III
	<i>PamNTT5</i>	GTP y ATP	Membrana	Clase II
<i>Rickettsia prowazekii</i>	<i>Tlc1</i>	ATP y ADP	-	Clase I
	<i>Tlc4</i>	CTP, UTP y GDP	-	-
<i>Caedibacter caryophilus</i>	-	ATP, dATP y ddATP nucleósidos modificados de adenina	Membrana	Clase I

2.2.2. Transportadores de nucleótidos en organismos de vida libre

A diferencia de los organismos procariotas intracelulares que se discutieron anteriormente, los organismos eucariotas de vida libre han desarrollado diversas rutas biosintéticas para una amplia gama de compuestos necesarios para su supervivencia en ambientes con nutrientes limitados complementario al sistema de transportadores.

Con relación a esto, son relevantes los estudios llevados a cabo en *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura que sintetiza NAD⁺ en el citosol y que en sus procesos metabólicos moviliza el dinucleótido hacia el interior de la mitocondria, para ello posee un transportador específico localizado en la membrana interna de este organelo (*ScNdt1p*), el cual se caracterizó funcionalmente demostrando su capacidad de transportar NAD⁺ y en menor medida (d)AMP y (d)GMP. Adicionalmente la proteína codificada por el gen *Rim2* localizada en la mitocondria de esta levadura, moviliza (deoxi)nucleótidos di- y tri- fosfato de pirimidinas por un transporte impulsado por protones (clase II) ²⁷.

Asimismo, en *Arabidopsis thaliana* se identificaron dos transportadores, *AtNDT1* (cloroplasto) y *AtNDT2* (mitocondria), los cuales presentan gran semejanza estructural con *ScNDT1* descrito anteriormente. Para ambos se comprobó la capacidad de transportar paralelamente NAD⁺ mediante intercambio siendo el ADP y el AMP los más eficientes para este proceso ²⁸.

Otros estudios han demostrado que el gen *SLC25A17* en *Homo sapiens* codifica un transportador para las especies CoA, FAD, FMN y AMP y en menor medida para NAD⁺, PAP (adenosina 3',5'-difosfato) y ADP, el cual está localizado en la membrana del peroxisoma donde realiza el antiporte de CoA, FAD⁺ y NAD⁺ hacia el interior del organelo por intercambio de PAP, FMN y AMP presentes en su interior ²⁹. Igualmente se han caracterizado dos transportadores adicionales en esta misma especie, con capacidad de transportar nucleótidos de pirimidina, los cuales se encuentran localizados en la mitocondria y son codificados por los genes *SLC25A33* y *SLC25A36*; estos antiportes son capaces de translocar los (deoxi)nucleótidos mono-, di- y tri- fosfato de uracilo y citosina, adicionalmente para *SLC25A33* los timidin nucleótidos. Por último *SLC25A36* presenta capacidad simporte para estos nucleótidos ³⁰. Lo descrito anteriormente se resume en la Tabla 2-2:

Tabla 2-2: Transportadores de nucleótidos identificados en diversos organismos de vida libre.

Organismo	Transportador	Especies que transporta	Localización	Clasificación
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ScNDT1</i>	NAD ⁺ , (d)AMP y (d)GMP	Membrana interna mitocondrial	-
	<i>Rim2p</i>	(deoxi)nucleótidos di- y tri- fosfato de pirimidinas	Membrana interna mitocondrial	Clase II

<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>At</i> NDT1	NAD ⁺ , ADP y ATP	Membrana del cloroplasto	Clase III
	<i>At</i> NDT2	NAD ⁺ , ADP y ATP	Membrana interna mitocondrial	Clase III
<i>Homo sapiens</i>	SLC25A17p	CoA, FAD, FMN, AMP, NAD ⁺ , PAP y ADP	Membrana del peroxisoma	Clase I
	SLC25A33p	(deoxi)nucleótidos mono-, di- y tri- fosfato de uracilo, citosina y timina	Membrana interna mitocondrial	Clase I
	SLC25A36p	(deoxi)nucleótidos mono-, di- y tri- fosfato de uracilo y citosina	Membrana interna mitocondrial	Clase I-III

3. Preguntas de investigación

Para el desarrollo de este proyecto, se plantearon las siguientes preguntas de investigación:

- ¿*Leishmania braziliensis* presenta un homólogo a transportador de NAD?
- De presentar un transportador de NAD ¿Cuál es su localización sub-celular para los estadios de *L. braziliensis*?
- ¿El candidato a transportador de *L. braziliensis* presenta afinidad por el NAD?

4. Hipótesis

Los parásitos intracelulares han eliminado rutas de biosíntesis de nucleótidos redundantes y en contraste perfeccionado sistemas de transporte (entre compartimentos sub-celulares y con su entrono) energéticamente más favorables. De esta manera, *Leishmania braziliensis*, un parásito intracelular, que cuenta con una única NMNAT citosólica, en comparación con organismos de vida libre que poseen varias copias de esta enzima (isoenzimas), compensa los requerimientos de este nucleótido mediante proteínas con capacidad de transportarlo, tanto desde su entorno como entre compartimentos sub-celulares.

5. Objetivos

5.1. General

Identificar y caracterizar un candidato a transportador de NAD⁺ en *Leishmania braziliensis* (*LbTNTA*).

5.2. Específicos

- Diseñar y producir una herramienta inmunológica que permita el estudio del candidato *LbTNTA*.
- Determinar la localización sub-celular del candidato *LbTNTA* endógeno.
- Evaluar la capacidad transportadora del candidato *LbTNTA*.

6. Metodología

La identificación y caracterización del candidato a transportador de NAD⁺ en *Leishmania braziliensis* (*LbTNTA*) se llevó a cabo mediante la metodología desarrollada a continuación, la cual abordó dos aspectos principales. El primero de ellos asociado con la detección y determinación de la localización sub-celular del candidato, para lo cual se diseñó y produjo una herramienta inmunológica en el modelo aviar (IgY's α -*LbTNTA*) a partir de una proteína recombinante previamente obtenida en nuestro laboratorio³. En segundo lugar, se desarrolló una herramienta para la evaluación funcional del candidato mediante complementación de cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes deficientes en el transporte de NAD. Adicionalmente el segundo aspecto fue abordado mediante la reconstitución de la proteína recombinante en liposomas mediada por detergentes y la expresión del candidato en membranas de *E. coli*. Cada uno de estos aspectos corresponde con los capítulos que se describen a continuación.

CAPÍTULO I: IDENTIFICACIÓN DE *LbTNTA* ENDÓGENO

6.1. Diseño de una herramienta inmunológica para el estudio del candidato *LbTNTA*.

A continuación se describe la metodología utilizada para el estudio del candidato *LbTNTA* mediante la producción de una herramienta inmunológica a partir de un plásmido recombinante producto de un trabajo anterior (pBAD202/*LbTNTA*)³:

6.1.1. Obtención del antígeno Trx-*LbTNTA*

6.1.1.1. Amplificación de *LbTNTA* mediante PCR

La comprobación del vector de expresión pBAD202/*LbTNTA* a partir de cual se produjo la proteína recombinante (antígeno) empleado en la obtención de los anticuerpos se llevó a cabo mediante PCR con 1 U de *Taq* polimerasa en buffer de reacción (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3 y Tritón X-100 0,1 % v/v), MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 0.2 mM, cebadores directo y reverso 0.2 μ M a un volumen final de 15 μ L. El ciclo térmico comprendió una desnaturalización

inicial a 94°C de 10 minutos, seguido por 20 ciclos de amplificación con una programación de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anillaje de cebadores a 50°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto, finalmente se realizó un ciclo de extensión a 72°C por 10 minutos (Termociclador Veriti Applied Biosystems). Los resultados fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) teñido con bromuro de etidio.

6.1.1.2. Transformación en células químicamente competentes

El vector recombinante se transformó en células *E. coli* por choque térmico, para ello se incubaron de 3 a 5 µL del vector con 50 µL de células químicamente competentes (homogenización suave) durante 30 min a 4 °C, a continuación se sometieron a choque térmico a 42 °C por 35 segundos e inmediatamente después se incubaron por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente las células se recuperaron en 250 µL de medio S.O.C (extracto de levadura 0.5%, triptona 2%, NaCl 10mM, MgCl₂ 10mM, KCl 2.5mM y glucosa 20mM) durante una hora a 37 °C con agitación constante. Finalmente se sembraron en cajas LB-Agar (LB: triptona al 1 %, extracto de levaduras 0.5 %, NaCl 1 %) adicionado por el antibiótico de selección de acuerdo con el vector transformado (concentración final de 50 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

6.1.1.3. Expresión de la proteína Trx-LbTNTA

La inducción de la expresión de la proteína Trx-LbTNTA se llevó a cabo inicialmente con una concentración de L-Arabinosa de 0.02 % (p/v) como agente inductor a 37 °C en la cepa *E. coli* BL21(DE3) durante 14 horas con agitación constante en medio LB suplementado con kanamicina 50 µg/mL. Para esta proteína se estandarizaron las condiciones óptimas de expresión, de esta manera se evaluaron las cepas de *E. coli* BL21(DE3), Lemo21(DE3) y Rosseta(DE3), concentraciones de inductor de 2×10^{-4} , 2×10^{-3} , 2×10^{-2} y 2×10^{-1} % (p/v) de L-Arabinosa, temperaturas de 25 y 37 °C y tiempos de inducción de 2, 4, 6, 8 y 14 horas, de acuerdo con esto se seleccionó la cepa BL21(DE3) con 2×10^{-2} % (p/v) de L-arabinosa durante 4 horas a una temperatura de 37 °C como se muestra en la sección de resultados y análisis (7.1.1.1), para todos los casos el número de células se estandarizó de acuerdo a su densidad óptica a 600 nm, tomando como referencia el valor obtenido para la alícuota de 0 horas (sin inducir).

6.1.2. Purificación de la proteína Trx-LbTNTA

A continuación se describe la metodología utilizada para la purificación de la proteína Trx-LbTNTA a partir de cuerpos de inclusión y geles discontinuos SDS-PAGE preparativo.

6.1.2.1. Purificación desde cuerpos de inclusión

Del cultivo inducido se recolectaron las células por centrifugación a 6.000 rpm en un rotor Microliter 30x2 sealed (75003652 ThermoFisher) de la centrifuga Heraeus Megafuge 16R (75004271 ThermoFisher) durante 10 minutos, las cuales se lisaron mediante tratamiento enzimático (lisozima 1 µg/ml) e incubación a 4 °C por 40 minutos con agitación constante. A continuación se sonicó durante 16 minutos con pulsos de 15 segundos, descanso de 45 y con una amplitud del 50%. La separación de las fracciones proteicas soluble e insoluble (la cual contiene los cuerpos de inclusión, CI) se realizó mediante centrifugación de los lisados celulares a 12.000 rpm por 30 min. Los CI se lavaron de acuerdo al protocolo reportado por Palmer y Wingfield³¹, una vez se solubilizaron los cuerpos de inclusión, se dializaron durante toda la noche a 4 °C en 500 mL buffer Tris-HCl 20 mM y NaCl 300 mM, pH 7.5, al día siguiente se realizó cambio de buffer con el mismo volumen y se dializó 2 horas adicionales. Finalmente, el producto de la diálisis se centrifugó a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C y se separaron las fracciones soluble e insoluble post-diálisis las cuales se almacenaron a -20 °C.

6.1.2.2. Purificación por SDS-PAGE preparativo

La fracción insoluble post-diálisis obtenida se resuspendió en buffer de carga 1X (Tris 0.5 M, SDS 10% (p/v), glicerol 30% (v/v), β-mercapto etanol 33% (v/v), azul de bromofenol 0.4 mg/mL), se denaturó por 10 minutos al baño María (90 °C) y se separó mediante SDS-PAGE preparativo (20x20 cm) al 12 % (p/v) a 200 V. A partir del SDS-PAGE preparativo se tiñeron tres carriles y se cortaron tres bandas en los carriles no teñidos correspondientes con Trx-*Lb*TNTA. Las bandas se maceraron por trituración y se resuspendieron en buffer Tris-Glicina 1X (Tris 125 mM, SDS 0.5% (p/v), glicina 0.8 M, pH 8.8), a continuación se eluyeron cada una de las bandas cortadas 3 veces durante 24 horas a 37 °C. El protocolo de purificación se evaluó por SDS-PAGE³² y western blot³³ revelado por fosfatasa alcalina con los sustratos cromogénicos NBCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt, S381C Promega) y NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride, S380C, Promega) en buffer de reacción (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM)

6.1.2.3. Cuantificación densitométrica de Trx-*Lb*TNTA purificada

Se llevó a cabo un gel discontinuo SDS-PAGE al 12 % (p/v) de 5 µL de la proteína recombinante purificada y una curva de 200, 400, 600, 800, 100, 1.200 y 1.400 ng de BSA. Este gel se documentó en el analizador de imágenes Imager[®] Gel DocTMXR, con el software Quantity One Basic 4.6.3 de

BIORAD™ y la imagen obtenida fue analizada con el software ImageJ versión 1.1.4 mediante el cual se determinaron el área, porcentaje y densidad relativa para cada una de las bandas analizadas y con estos valores se construyó una recta cantidad de proteína (ng) vs densidad relativa, que fue utilizada para la cuantificación de Trx-LbTNTA purificada.

6.1.3. Obtención de anticuerpos aviares IgY α -Trx-LbTNTA

6.1.3.1. Producción de anticuerpos IgY α -Trx-LbTNTA

Se utilizaron gallinas Badcock Brown de 32 semanas de edad, de las cuales se tomó una muestra previa a la inoculación (suero pre inmune, SPI) del antígeno Trx-LbTNTA vía intramuscular y como control se inoculó PBS de acuerdo con el esquema de inoculación reportado por Moreno-González *et al*³⁴ (Tabla 6-1) en el cual se utilizaron 150 μ g de antígeno en cada refuerzo. Se recolectaron cuatro sangrías de la gallina inmunizada con el antígeno (α -Trx-LbTNTA) y cuatro de la gallina control (suero no relacionado SNR) de la vena alar de acuerdo al esquema de inmunización y los huevos correspondientes a este periodo, la sangre recolectada se centrifugó a 14.000 rpm por 30 minutos y se almacenó el suero en glicerol al 10% (v/v) a -80 °C.

Tabla 6-1. Esquema de inoculación de gallinas para la obtención de IgYs. C, adyuvante completo de Freund e I, adyuvante incompleto de Freund.

Día	Trx-LbTNTA				Control			
	0	15	30	45	0	15	30	45
Adyuvante	C	IC	IC	IC	C	IC	IC	IC
Antígeno (μ g)	150	150	150	150	-	-	-	-
PBS (μ L)	-	-	-	-	150	150	150	150

6.1.3.2. Purificación de IgYs α -Trx-LbTNTA por afinidad a antígeno

Debido a que se tuvieron dos fuentes de anticuerpos (suero y huevos) a continuación se plantean los protocolos utilizados para la purificación únicamente desde suero ya que su obtención a partir de huevos se realizó en un trabajo paralelo de pregrado:

Los anticuerpos obtenidos se purificaron mediante afinidad cargando la proteína recombinante antigénica purificada en un gel discontinuo SDS-PAGE al 12% (p/v) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se tiñó con solución de Rojo Ponceau S., la banda correspondiente a

Trx-*LbTNTA* (≈ 52.8 kDa) se cortó y pre-eluyó con una solución de glicina 100 mM pH 2,5 por 10 min. A continuación se lavó la membrana con amortiguador Tris salino (TBST) (50 mM de Tris, 150 mM NaCl, 0.2% (v/v) Tween 20) durante 5 min, se bloqueó con TBST suplementando con leche descremada al 5% (p/v) durante 1 h y se lavó tres veces con TBST durante 10 minutos cada vez. La membrana se cortó en trozos y posteriormente se incubó con 750 μ L del suero inmune durante 18 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Pasado este periodo se retiró el sobrenadante y se realizaron tres lavados con TBST de 10 minutos cada uno, seguido por la elución de los anticuerpos α -Trx-*LbTNTA* con 150 μ L de una solución de glicina 100 mM pH 2,5 durante 10 minutos con agitación constante, la cual finalmente se neutralizó mediante la adición de 15 μ L de Tris HCl 2 M pH 8,5. El proceso de elución se realizó cuatro veces.

6.1.4. Caracterización de IgYs α -Trx-*LbTNTA*

La caracterización de los anticuerpos producidos se realizó mediante ensayos de western blot. La especificidad de los anticuerpos producidos se evaluó mediante el reconocimiento de la proteína recombinante Trx-*LbTNTA* por el suero pre-inmune (SPI), el no relacionado (SNR) y cada uno de los sueros α -Trx-*LbTNTA* recolectados, los cuales se utilizaron en diluciones de 1:5.000, como anticuerpo primario en ensayos de western blot. Para la evaluación de la máxima dilución capaz de detectar el antígeno se utilizaron 300 ng de proteína recombinante y como anticuerpo primario en ensayos de western blot diluciones de 1:5.000, 1:8.000 y 1:10.000 de los IgYs purificados desde el tercer suero. Por último, la determinación de la mínima cantidad de antígeno reconocido por el anticuerpo se realizó a partir de una dilución 1:5000 de los IgYs purificados desde el tercer suero, los cuales se utilizaron como anticuerpo primario en ensayos de western blot para evaluar la inmunodetección de diferentes cantidades del antígeno (300, 150, 75, 37.5, 18.7 y 9.4 ng). En todos los casos se utilizó como control 300 ng de BSA y membranas de nitrocelulosa. Como anticuerpo secundario se utilizó IgG de burro α -IgY y se reveló mediante el sistema Biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina con los sustratos cromogénicos como se describió anteriormente.

6.2. Detección del candidato *LbTNTA* endógeno

La detección de *LbTNTA* endógeno se llevó a cabo a partir de los anticuerpos IgY α -Trx-*LbTNTA* producidos y caracterizados previamente sobre extractos proteicos de amastigotes axénicos y

promastigotes de *L. braziliensis*. Paralelamente se determinó la localización sub-celular mediante inmunofluorescencia, de acuerdo con la metodología descrita a continuación.

6.2.1. Inmunodetección de *Lb*TNTA endógeno en extractos de *Leishmania braziliensis*

6.2.1.1. Cultivo de amastigotes axénicos y de promastigotes de *Leishmania braziliensis*

Los promastigotes de *Leishmania braziliensis* cepa MHOM/BR/75/M2904 se cultivaron en medio Schneider (Sigma) pH 7.2 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (v/v) a 26 °C en frascos de 25 cm² (T25) sin agitación y se realizó cambio por medio fresco cada 3 días³⁵. Por su parte los amastigotes axénicos se obtuvieron a partir de la diferenciación de promastigotes inducida por crecimiento en medio RPMI-1640 (Sigma) pH 6.4 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (v/v) a 37 °C en frascos de 25 cm² (T25) sin agitación.

6.2.1.2. Inmunodetección en extractos celulares de *Leishmania braziliensis*

Los extractos proteicos totales, fracción soluble e insoluble de amastigotes axénicos y promastigotes de *L. braziliensis* (M2904 MHOM/BR/75M2904) se obtuvieron a partir de parásitos recolectados por centrifugación a 8.000 rpm por 10 min a 4 °C previamente cultivados, los cuales se lavaron 3 veces con amortiguador fosfatos (PBS) pH 7.4 y nuevamente se centrifugaron para obtener el pellet celular el cual se resuspendió en 500 µL de buffer de lisis (0.1X PBS, Tritón X-100 y coctel de inhibidores de proteasas 1:200), se incubo a 4 °C durante 30 min con agitación constante y se centrifugó a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C, a continuación se separó el sobrenadante (fracción proteica soluble) y el pellet (fracción proteica insoluble). Adicionalmente de los parásitos recolectados inicialmente se tomó una alícuota y se lisó con buffer de carga 1X para SDS-PAGE (extracto total).

La lisis celular se monitoreó mediante geles discontinuos SDS-PAGE al 12 %(p/v) y la inmunodetección de *Lb*TNTA endógeno se realizó sobre cada uno de estos extractos mediante western blot sobre membranas de nitrocelulosa. Para este ensayo se emplearon los sueros sin purificar de la tercera sangría (en diluciones 1:500, 1:200 y 1:100) y los IgYs purificados desde esta misma sangría (1:100) como anticuerpo primario, como anticuerpo secundario se utilizó IgG de burro α -IgY (1:10.000) y se utilizó el sistema de revelado Biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina.

6.2.1.3. Desglicosilación de extractos celulares de *Leishmania braziliensis*

La desglicosilación se realizó sobre extractos proteicos de la fracción insoluble de promastigotes y amastigotes axénicos mediante dos metodologías; la primera de ellas consistió en un tratamiento químico con HCl 0.1 M y calentamiento a 92 °C durante 10 minutos. La segunda metodología consistió en un tratamiento enzimático con la enzima PGNasa F (NEB) bajo condiciones no denaturantes, para esto se adicionaron 2 µL de buffer GlycoBuffer 2 (10X) a un volumen final de 20 µL de extractos proteicos, a continuación se adicionó 1.5 µL de la glicosidasa PNGasa F, se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C durante 24 horas. En ambos casos se utilizaron 20 µg de proteínas y los resultados obtenidos fueron evaluados mediante SDS-PAGE y western blot.

6.2.2. Localización sub-celular

La localización sub-celular se determinó mediante dos metodologías, las cuales se describen a continuación:

6.2.1.4. Inmunofluorescencia

A partir de 1 mL de cultivo confluyente de amastigotes axénicos o promastigotes de *Leishmania braziliensis* se obtuvieron los parásitos mediante centrifugación a 5.000 rpm por 5 min a 4 °C, los cuales se lavaron tres veces con PBS por centrifugación. El precipitado se resuspendió en PBS y se aplicaron aproximadamente 2×10^5 células sobre láminas tratadas con poli-L-lisina. A continuación se fijaron las células con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 1 h a 4 °C, se incubaron con glicina 100 mM durante 15 min y se permeabilizaron con acetona durante 10 min a 4 °C. Cada uno de los montajes se bloqueó con BSA al 1% (p/v) durante 1 h. Como anticuerpo primario se utilizaron los IgYs α -Trx-LbTNTA producidos (1:100 o 1:10 en solución de bloqueo) y como secundario anti gallina IgY acoplado a ALEXA Fluor 488 (1:1.000 en solución de bloqueo) (Invitrogen), los cuales se incubaron durante 1h (el secundario en oscuridad). La marcación del ADN se realizó con DAPI (1 µg/ml en PBS) durante 5 min. Para los estudios de colocalización en mitocondria, se incubaron durante 30 minutos amastigotes axénicos en medio RPMI-1640 (Sigma) sin SFB a 37°C y promastigotes en medio Schneider (Sigma) sin SFB a 26 °C, con la sonda Mitotracker Red CMXRos (1 µM) (Invitrogen). Las láminas se cubrieron con medio de montaje (Fluoromont-G) (Invitrogen) y se visualizaron empleando el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1².

6.2.1.5. Fraccionamiento celular

A partir de A partir de 10 mL de cultivo confluyente de amastigotes axénicos o promastigotes de *Leishmania braziliensis* se obtuvieron los parásitos mediante centrifugación a 5.000 rpm por 5 min a 4°C los cuales se lavaron tres veces con PBS por centrifugación. A continuación se lisaron las células adicionando tierra de deatomeas en buffer de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 7.4, EDTA 2 mM, MgCl₂ 3 mM, sacarosa 250 mM y coctel inhibidor de proteasas 1:200) en un homogenizador Dounce. Posteriormente, los parásitos no lisados y la tierra de deatomeas fueron eliminados mediante centrifugación a 150 x g por 3 minutos, el pellet obtenido se lavó con buffer de lisis, se centrifugó nuevamente y los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron a 1.500 x g por 10 minutos con lo cual se obtuvo la fracción nuclear (pellet), a continuación el sobrenadante fue separado y centrifugado a 5.000 x g por 30 minutos obteniéndose la fracción mitocondrial y de membranas citoplasmáticas (pellet). Finalmente, el sobrenadante obtenido se separó y se centrifugó a 28.000 x g durante 1.5 horas con lo cual se obtuvieron la fracción glicosomal (pellet) y la fracción citoplasmática (sobrenadante). El procedimiento de fraccionamiento fue evaluado mediante SDS-PAGE.

CAPÍTULO II: EVALUACIÓN FUNCIONAL DE *LbTNTA*

6.3. Evaluación de la capacidad transportadora del candidato *LbTNTA*

A continuación se describe la estrategia llevada a cabo para la evaluación funcional del candidato *LbTNTA* mediante complementación en *S. cerevisiae*, reconstitución en liposomas mediada por detergentes y expresión en membranas de *E. coli*.

6.3.1. Construcción de plásmidos recombinantes

Para realizar los ensayos funcionales de *LbTNTA* fue necesario en primer lugar llevar a cabo la subclonación de la secuencia codificante de *LbTNTA* y del transportador *AtNDT2* de *Arabidopsis thaliana* (control positivo para todos los ensayos funcionales como se muestra más adelante) en el vector pGEMT-Easy, desde el cual se realizó la clonación de ambas secuencias en los vectores pYES2 (ensayos de complementación) y pET28xMISTIC (expresión en membranas de *E. coli*). Adicionalmente, la secuencia de *AtNDT2* se clonó en el vector pBAD202/d-TOPO para los ensayos

de reconstitución en liposomas mediada por detergentes. La metodología seguida para obtener estos vectores recombinantes se muestra a continuación.

6.3.1.1. Amplificación por PCR

La amplificación de la secuencia codificante de *LbTNTA* por PCR se realizó desde el vector pBAD/*LbTNTA* obtenido previamente en nuestro grupo de investigación y la secuencia de *AtNDT2* se amplificó desde cDNA (donado por el Doctor Camilo López, departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá), bajo las mismas condiciones del numeral 6 con *Taq* polimerasa teniendo en cuenta la temperatura de anillamiento para cada uno de los cebadores diseñados para la clonación en pGEMT-Easy (**Tabla 7-2** y **Tabla 7-3**). Para la clonación en pBAD202/d-TOPO la amplificación de *AtNDT2* se llevó a cabo con 1.25 U de *Pfu* polimerasa en buffer de reacción (Tris-HCl 20mM pH 8.8, (NH₄)₂SO₄ 10mM, KCl 10mM, Triton X-100 0.1% (v/v), BSA 0.1 mg/ml), MgSO₄ 2.5 mM, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 0.2 mM, cebadores directo y reverso 0.2 μM a un volumen final de 25 μL con el mismo ciclo térmico usado con la *Taq* polimerasa teniendo en cuenta la temperatura de anillamiento para cada uno de los cebadores diseñados (**Tabla 7-4**). Los resultados fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.

6.3.1.2. Purificación desde gel de agarosa

La purificación de los productos de PCR (clonación en pGEMT-Easy y pBAD202/d-TOPO) y de los insertos liberados desde pGEMT/*LbTNTA* y pGEMT/*AtNDT2* por digestión enzimática (clonación en pYES2 y pET28xMISTIC) se realizó con el kit wizard[®] SV Gel and PCR Clean up System de Promega a partir de geles de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio. Los productos de la purificación fueron cuantificados mediante espectrofotometría a 260 nm y 280 nm para determinar su pureza y concentración.

6.3.1.3. Reacciones de ligación

Como se mencionó anteriormente, se realizó la clonación de *LbTNTA* y *AtNDT2* en varios vectores, de esta manera, a continuación se muestran las reacciones de ligación llevadas a cabo para cada uno de ellos:

- Ligación en pGEMT-Easy:

Los productos de PCR con *Taq* polimerasa de *LbTNTA* y *AtNDT2* purificados desde gel de agarosa se ligaron en el vector TA pGEMT-Easy con una relación molar inserto:vector 1:1 para ambas clonaciones con 1 U de la enzima ligasa T4 en buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotritol 1 mM ATP, pH 7.5) en un volumen final de 10 µL. La reacción se incubó a 16 °C durante 2 h y posteriormente a 4 °C durante 12 h.

- Ligación en pYES2 y pET28xMISTIC

Los insertos *LbTNTA* y *AtNDT2* obtenidos por digestión enzimática de pGEMT/*LbTNTA* y pGEMT/*AtNDT2* purificados desde gel de agarosa se ligaron en el vector pYES2 con una relación molar inserto:vector 1:1 para *LbTNTA* y 2:1 para *AtNDT2* con 1 U de la enzima ligasa T4 en buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotritol 1 mM ATP, pH 7.5) en un volumen final de 10 µL. La reacción se incubó a 16 °C durante 2 h y posteriormente a 4 °C durante 12 h. Las clonaciones en pET28xMISTIC se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones pero con una relación molar inserto:vector 2:1 para *LbTNTA* y 1.5:1 para *AtNDT2*. La reacción se incubó a temperatura ambiente (22-23 °C) durante 30 minutos.

- Ligación en pBAD202/d-TOPO

El producto de PCR para *AtNDT2* obtenido con *Pfu* polimerasa y purificado desde gel de agarosa se ligó en el vector pBAD202/d-TOPO con una relación molar inserto:vector 2:1 con 1 µL de solución salina (NaCl 1,2 M y MgCl₂ 0.06 M) en un volumen final de 6 µL.

6.3.1.4. Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

De las colonias que presentaron un amplificado con el tamaño esperado para cada una de las clonaciones se extrajo ADN plasmídico mediante lisis alcalina a partir de inóculos de 10 mL en medio LB líquido con los antibióticos correspondientes (50 µg/mL) incubados a 37°C durante toda la noche. Las células se obtuvieron por centrifugación a 5.000 r.p.m por 10 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en 300 µL de solución de resuspensión (Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 2,5 mM pH 8,0) y se incubó 5 minutos a 4°C, a continuación, se adicionaron 300 µL de solución de lisis (NaOH 0,2 N, SDS 1% p/v), se mezcló por inversión y se incubó nuevamente a 4°C por 5 minutos, posteriormente se adicionaron 300 µL de solución de neutralización (acetato de

potasio 3M, pH 4,8), se centrifugó a 11.000 r.p.m por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, el cual se trató con RNasa (10 ng/mL) durante 30 minutos a 37 °C.

Al producto anterior se adicionó un volumen de la mezcla fenol-cloroformo (25:24), se homogenizó por inversión 10 veces y se incubó nuevamente a 4°C por 10 minutos con agitación constante, posteriormente se centrifugó a 11.000 r.p.m por 5 minutos, se recuperó la fase acuosa y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 frío, se homogenizó la mezcla y se precipitó a -80 °C durante 20 minutos. A continuación se centrifugó por 10 minutos a 12.000 r.p.m, se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados al precipitado obtenido con etanol al 70% frío, finalmente se dejó evaporar el etanol y se resuspendió el pellet en 50 µL de agua DEPC.

6.3.1.5. Evaluación de colonias y de ADN plasmídico mediante PCR

Las colonias obtenidas para cada una de las clonaciones se resuspendieron en 10 µL de agua DEPC y se lisaron a 95 °C al baño María; por su parte los plásmidos extraídos fueron diluidos 1:5 en agua DEPC. Tanto las colonias como los plásmidos fueron evaluados mediante PCR bajo las condiciones del numeral 6 con *Taq* polimerasa teniendo en cuenta la temperatura de anillamiento para cada uno de los cebadores diseñados (**Tabla 7-2, Tabla 7-3 y Tabla 7-4**). Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.

6.3.1.6. Evaluación de ADN plasmídico mediante digestión enzimática

Los plásmidos recombinantes obtenidos con pGEMT-Easy, pYES2 y pET28xMISTIC para *LbTNTA* y *AtNDT2*, así como los vectores vacíos, se evaluaron bajo las mismas condiciones, teniendo en cuenta que para su obtención se adicionaron los sitios de corte para las enzimas BamHI (cebador directo) y EcoRI (cebador reverso). De esta manera se digirieron los plásmidos con BamHI en buffer BamHI (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, MgCl₂ 5 mM, KCl 100 mM, Triton X-100 0.02 % (v/v) y BSA 0.1 mg/ml) a 37 °C durante 16 horas, a continuación, se digirió con EcoRI durante 3 h a 37 °C, suplementando la reacción con buffer BamHI. Los perfiles de digestión se predijeron mediante NEB CUTTER 2.0 y los resultados obtenidos fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.

Por su parte, los plásmidos pBAD/*AtNDT2* se evaluaron por digestión enzimática con KpnI en buffer KpnI (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, Triton X-100 0.02% y BSA 0.1 mg/mL) a 37 °C

durante 16 horas. Los perfiles de digestión se predijeron mediante NEB CUTTER 2.0 y los resultados obtenidos fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.

6.3.2. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* para ensayos funcionales

Las proteínas Trx-*Lb*TNTA, MISTIC-*Lb*TNTA, Trx-*At*NDT2 y MISTIC-*At*NDT2 se obtuvieron bajo las condiciones óptimas de expresión determinadas en el numeral 6.1.1.3, teniendo en cuenta que la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes desde el vector pET28xMISTIC se realizó con Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1.0 mM y desde el vector pBAD202/d-TOPO con L-Arabinosa a una concentración final de 0.02 % (p/v). Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante SDS-PAGE y western blot.

6.3.3. Ensayo de complementación de *Saccharomyces cerevisiae*

6.3.3.1. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* cepa BY4741 (MATa; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0, YIL006w::kanMX4, Y01398 en EUROCFARF) y cepa silvestre INVSc1 (MATa/ α ; his3 Δ 1; leu2; trp1-289; ura3-52, Invitrogen) fueron mantenidos en medio líquido YPD (extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2 % (p/v) y glucosa 2 % (p/v), Sigma) a 30 °C con agitación constante. El medio de cultivo sólido YPD, se suplemento con agar bacteriológico al 2 % (p/v).

6.3.3.2. Preparación de células electrocompetentes de *Saccharomyces cerevisiae*

Se inocularon 500 mL de medio YPD (Sigma) con la cepa BY4741 (MATa; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0, YIL006w::kanMX4, Y01398 en EUROCFARF) y se incubó a 30 °C con agitación constante durante toda la noche, a continuación se recolectaron las células por centrifugación a 4.000 g por 5 minutos a 4 °C. El pellet de células se resuspendió por vortex en 80 mL de agua estéril, sobre el cual se adicionaron 10 mL de buffer TE 10X (Tris-HCl 100 mM y EDTA 10 mM pH 7.5) y 10 mL de acetato de litio 1 M, se agito suavemente y se incubó a 30 °C durante 45 minutos con agitación suave. A continuación se adicionaron 2.5 mL de DTT 1 M, se homogenizó suavemente y nuevamente se incubo a 30 °C durante 15 minutos con agitación suave. Posteriormente se adicionó agua estéril hasta completar un volumen de 500 mL y se obtuvieron las células por centrifugación a 4.000 g por 5 minutos a 4 °C, las cuales se resuspendieron en 30 mL de sorbitol 1 M frio y se centrifugaron a

4.000 g por 5 minutos a 4 °C. Finalmente el pellet celular se resuspendió en 1.5 mL de sorbitol 1 M frío. Todas las soluciones y el procedimiento se realizaron en baño de hielo.

6.3.3.3. Transfección de *Saccharomyces cerevisiae* mediante electroporación

Para la transfección de *S. cerevisiae* cepa BY4741 (MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0, YIL006w::kanMX4, Y01398 en EUROCFARF) se utilizaron celdas de 0.4 cm del electroporador Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad). A 50 ng de los plásmidos *LbTNTA/pYES2*, *AtNDT2/pYES2* y *pYES2* vacío se adicionaron 80 μL de las células electrocompetentes obtenidas en el numeral 1, se agitó suavemente y se incubó durante 10 minutos, a continuación se aplicó un único pulso de 5 ms de 2.5 kV y las células se recuperaron con 1 mL de sorbitol 1 M estéril durante 15 min a temperatura ambiente y se sembraron en medio mínimo sintético sólido Ura⁻ (MMS-Agar) para la selección de los transfectantes y finalmente se incubaron a 30 °C durante 36 h.

Tabla 6-2. Composición del medio mínimo sintético (MMS) Ura⁻. El * indica la adición de Agar únicamente para el medio MMS Ura⁻ sólido.

COMPONENTE	COMPOSICIÓN/CONCENTRACIÓN (por litro)
MP Biomedicals™ YNB, Powdered Media: Without Ammonium Sulfate/Copper Sulfate, Ferric Chloride	Vitaminas: Biotina 0.002 mg, pantotenato de calcio 0.4 mg, ácido fólico 0.002 mg, inositol 2 mg, niacina 0.4 mg, ácido p-aminobenzoico 0.2 mg, hidrocloreuro de piridoxina 0.4 mg, riboflavina 0.2 mg, hidrocloreuro de tiamina 0.4 mg. Elementos traza: ácido bórico 0.5 mg, yoduro de potasio 0.1 mg, sulfato de manganeso 0.4 mg, molibdato de sodio 0.2 mg, sulfato de zinc 0.4 mg. Sales: sulfato de magnesio 500 mg, cloruro de sodio 100 mg, fosfato monobásico de potasio 1000 mg, cloruro de calcio 100 mg
Sulfato de amonio	5.0 g
Sulfato de cobre	0.04 mg
Cloruro férrico	0.2 mg
Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without uracil	76 mg de todos los aminoácidos estándar y 380mg de leucina. Adenina (18 mg), inositol (76 mg), ácido p-aminobenzoico (8 mg)
Glucosa	2 %(p/v)

Agar*	2 % (p/v)
-------	-----------

6.3.3.4. Ensayos de crecimiento en medio mínimo sintético Ura⁻.

El crecimiento de los transfectantes obtenidos fue evaluado en medio líquido y sólido MS Ura⁻. En ambos casos se realizaron pre-inoculos en medio MS Ura⁻ suplementado con glucosa al 2 % (p/v), los cuales se incubaron durante 14 horas a 30 °C a 180 r.p.m, a continuación se tomaron alícuotas de cada inóculo para obtener un OD₆₀₀ final de 0.2 en 15 mL de medio. Cada alícuota se centrifugó a 8.000 r.p.m durante 10 minutos a 4 °C, se removió el sobrenadante y los pellet celulares fueron resuspendidos en 15 mL de medio de inducción MS Ura⁻ suplementado con fuente de carbono fermentable (rafinosa) o no fermentable (etanol) al 2 % (p/v) y galactosa al 0.1 % (p/v). Para la evaluación del crecimiento en medio líquido se incubaron los cultivos a 30 °C a 180 r.p.m y se realizaron lecturas de OD₆₀₀ cada 24 horas durante 5 días. Para la evaluación en medio sólido se realizaron 3 diluciones seriadas 1/10 de cada cultivo (OD₆₀₀ inicial de 0.2) en medio de inducción, se sembraron 10 µL de cada una en cajas MMS Ura⁻ suplementado con etanol al 2 % (p/v) y galactosa al 0.1 % (p/v) + Agar 2 % (p/v) y se incubaron a 30 °C, el seguimiento fue documentado cada 24 horas durante 4 días con el analizador de imágenes Imager[®] Gel DocTMXR y el software Quantity One Basic 4.6.3 de BIORAD[™].

6.3.4. Ensayo de reconstitución en liposomas mediada por detergentes

Para los ensayos de reconstitución del candidato en liposomas mediada por detergente se extrajeron lípidos de membrana desde eritrocitos humanos y se utilizó la proteína Trx-LbTNTA purificada. Como control positivo para este ensayo se utilizó la proteína Trx-AtNDT2. La metodología seguida se muestra a continuación.

6.3.4.1. Purificación y evaluación de lípidos de membrana de eritrocitos humanos

La extracción de lípidos se llevó a cabo a partir de sangre humana donada por el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS), para lo cual se extrajeron glóbulos rojos fantasma y a continuación se procedió a extraer los lípidos de membrana como se describe a continuación:

- Producción de glóbulos rojos fantasma

Se recolectaron 10 mL de sangre periférica en tubos heparinizados y se centrifugaron a 3.000 g por 10 min a temperatura ambiente, se separó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con PBS 1X al precipitado. Para obtener los glóbulos rojos se centrifugó a 3.000 g por 10 min y se resuspendieron los eritrocitos en PBS 1X (Solución RBC). Por cada 50 µL de solución RBC se adicionó 1 mL de PBS 0.033X pH 8.0, se homogenizó mediante vortex a velocidad máxima por 10 s y se incubó en baño de hielo por 30 min. Pasado este tiempo se centrifugaron las muestras a 18.000 g por 30 min a 0 °C y se descartó el sobrenadante con lo cual se lisaron los glóbulos rojos. Para eliminar completamente el contenido de los eritrocitos se realizaron 5 – 6 lavados con 1.0 mL de PBS 0.033X pH 8.0, vortex por 10 s y se centrifugó a 18.000 g por 15 min a 0 °C³⁶.

- Extracción de lípidos de glóbulos rojos fantasma

Por cada mililitro de solución 50 mg/mL de glóbulos rojos fantasma se adicionaron 3.75 mL de una mezcla metanol:cloroformo (2:1), se agitó intermitentemente 1 – 2 h. Pasado este tiempo se centrifugó por 5 min a 3.000 g y se transfirió el sobrenadante a otro tubo, el pellet se resuspendió en 4.75 mL de una mezcla metanol-cloroformo-agua (2:1:0.8), se centrifugó nuevamente y se juntaron los sobrenadantes, los cuales se diluyeron con 2.5 mL de una mezcla cloroformo:agua (1:1), se agitó por inversión y se centrifugó 5 min a 6.000 g. Se retiró la fase inferior y se diluyó con un volumen igual de cloroformo, a continuación se evaporaron los solventes a 30 °C por rotavaporación.

- Identificación de lípidos

La presencia de fosfolípidos fue evaluada mediante la prueba de saponificación, para la cual se tomaron 0.5 mL de la muestra de lípidos extraída a los cuales se les adicionó 3 mL de NaOH al 15 % (p/v) y se calentó la mezcla a 70 °C durante 20 minutos, a continuación se adicionó 1 mL de éter etílico, se agitó suavemente y se filtró con papel filtro sobre el precipitado formado correspondiente con sales sódicas de ácidos grasos (jabones). Como control positivo se utilizó el fosfolípido lecitina y como control negativo cloroformo. Adicionalmente se realizó la prueba de Fiske-Subbarow para la identificación de fosfolípidos, de esta manera se tomó 1 mL del filtrado anterior al cual se adicionaron 15 gotas de ácido molíbdico, se agitó suavemente y se dejó en reposo durante 5 min. Inmediatamente después se adicionaron 10 gotas de ácido ascórbico y se mezcló suavemente hasta observar la aparición de una coloración azul. Como controles positivo y negativo se utilizaron los mismos que en la prueba de saponificación.

Por otra parte, se determinó la presencia de colesterol en la muestra mediante la prueba de Salkowski, adicionado 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado lentamente a 0.5 mL de la muestra de lípidos extraídos, se mezcló suavemente y se dejó en reposo por 5 min hasta observar la formación de una coloración amarilla/café. Como control positivo se utilizó colesterol y como control negativo cloroformo.

6.3.4.2. Reconstitución del candidato *LbTNTA* en liposomas mediada por detergentes

Las proteínas recombinantes Trx-*LbTNTA* y Trx-*AtNDT2* se reconstituyeron en liposomas mediante remoción cíclica de detergente como se ha descrito en estudios previos³⁷. A partir de los lípidos obtenidos se produjeron liposomas por adición de buffer NaCl 50 mM y HEPES 10 mM pH 7.0 para una concentración final de lípidos del 5 % (p/v) con agitación constante durante 1 hora a temperatura ambiente. La composición inicial de la mezcla de reconstitución contenía la proteína purificada (40.8 µg), 150 µL de liposomas al 5 % (p/v) y SDS 69 mM en buffer NaCl 50 mM y HEPES, pH 7.0 a un volumen final de 1 mL, esta mezcla fue pre-incubada durante 12 horas a 37 °C. A continuación se removió el SDS mediante diálisis escalonada en tubos de diálisis Spectra/Pore 1 (6 – 8 kDa) (Spectrum™) contra 250 mL del mismo buffer de reconstitución durante 150 h, con cambios de buffer a las 20, 5 y 130 horas. La obtención de los proteoliposomas se llevó a cabo mediante ultracentrifugación a 100.000 g por 1.5 horas. Finalmente, las fracciones obtenidas (sobrenadante y pellet) fueron evaluados por SDS-PAGE discontinuo al 12 % (p/v), tinción azul de Coomassie.

7. Resultados y discusión

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos en la identificación y evaluación funcional de un candidato a transportador de NAD⁺ en *Leishmania braziliensis*, el cual fue previamente caracterizado *in silico* a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria encontrando las características típicas de la familia de transportadores mitocondriales MCF (PF00153 en Pfam) y cuya secuencia codificante de 1.089 pb fue clonada en el vector pBAD202/d-TOPO.

Los resultados y su discusión fueron divididos en dos capítulos, en el primero de ellos se muestra la identificación de *LbTNTA* endógeno, para esto se diseñó y caracterizó una herramienta inmunológica en el modelo aviar con la cual se detectó y determinó la localización sub-celular del candidato; el segundo capítulo se centra en la evaluación funcional del *LbTNTA*, la cual fue abordada mediante la complementación de cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en el transporte de NAD y adicionalmente mediante estrategias de reconstitución en liposomas mediada por detergentes y expresión en membranas de *E. coli* del candidato. A continuación se muestra los resultados y análisis correspondientes con el primer capítulo.

CAPÍTULO I: IDENTIFICACIÓN DE *LbTNTA* ENDÓGENO

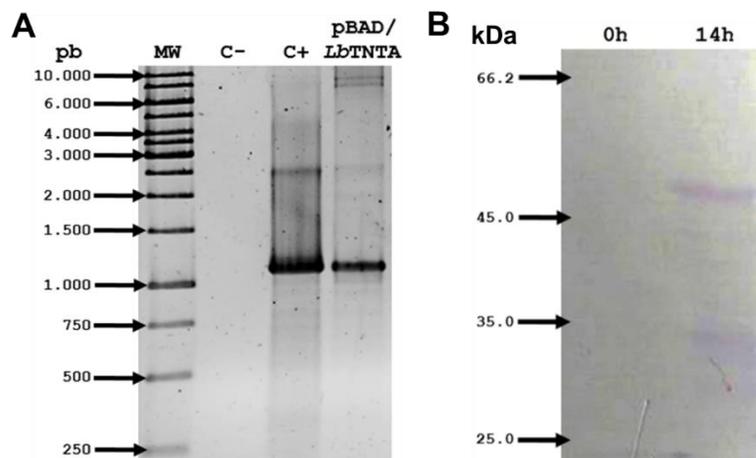
7.1. Diseño de una herramienta inmunológica para el estudio del candidato *LbTNTA*.

El estudio del candidato a transportador de NAD⁺ de *Leishmania braziliensis* *LbTNTA* se realizó partiendo de un plásmido recombinante producto de un trabajo anterior (pBAD202/*LbTNTA*) realizado en nuestro grupo de investigación LIBBIQ³, el cual otorga una etiqueta amino terminal de tiorredoxina (Trx) de 13 kDa y codifica la proteína recombinante Trx-*LbTNTA* con un tamaño de ≈ 52.8 kDa (39.8 kDa *LbTNTA* + 13 kDa Trx). A partir de este constructo se obtuvieron los resultados que se presentan a continuación:

7.1.1. Expresión y purificación de la proteína recombinante Trx-*LbTNTA*

Inicialmente, se comprobó la identidad del vector recombinante pBAD202/*LbTNTA* mediante PCR, con la cual se obtuvo un amplificado correspondiente a la secuencia codificante del candidato (1.089 pb) (**Figura 7-1A**). A continuación se transformó este constructo en cepas de expresión *E. coli* BL21(DE3) (**6.1.1.2**) y se indujo la expresión de la proteína recombinante Trx-*LbTNTA* durante 14 horas con L-arabinosa 0.02% (p/v) a 37 °C, la cual fue detectada mediante western blot con un tamaño de ≈ 48.9 kDa, 3.9 kDa por debajo del peso esperado (≈ 52.8 kDa) (**Figura 7-1B**). Sin embargo, esto era de esperarse por la alta hidrofobicidad del candidato (índice de alifático, 78.67), ya que se ha comprobado que esto ocasiona una disminución en la interacción con el SDS en geles SDS-PAGE, por lo que la movilidad electroforética de la proteína aumenta, mostrando un peso aparentemente menor que no es debido a degradación³⁸.

Figura 7-1. Evaluación de la identidad del vector pBAD202/*LbTNTA*. **A.** Confirmación de la presencia de la secuencia codificante para *Lbtnta* en el plásmido pBAD202/*LbTNTA* mediante PCR. C-, control negativo, PCR sin plantilla. C+, control positivo PCR, amplificación desde ADN genómico. pBAD/*LbTNTA*, PCR del plásmido pBAD/*LbTNTA*. Gel de agarosa al 0.8% (p/v) teñido con bromuro de etidio. **B.** Inmunodetección de la proteína recombinante Trx-*LbTNTA* en *E. coli* cepa BL21(DE3). 0h y 14h proteínas totales pre y post inducción respectivamente. Western blot revelado por el sistema Biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina, anticuerpo primario α -Trx (1:6.000). MW, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder.



Una vez se comprobó la expresión de la proteína recombinante, se llevó a cabo la estandarización de las condiciones óptimas de expresión. Debido a que este es un paso crucial en el trabajo con

proteínas recombinantes y es particular para cada una de ellas, por lo tanto, se evaluaron las siguientes variables:

- Cepa.
- Concentración de inductor.
- Temperatura de inducción.
- Tiempo de inducción.

A continuación se muestra el proceso de estandarización para estas variables:

- **Cepa**

Con el objetivo de identificar el sistema heterólogo óptimo de expresión se evaluaron 3 cepas de *E. coli* con las siguientes especificaciones cada una:

BL21(DE3): Cepa de alta expresión rutinaria para la mayoría de las proteínas, controlada mediante la ARN polimerasa T7.

Lemo21(DE3): Especializada en la producción de proteínas de membrana, tóxicas o propensas a la expresión insoluble en sistemas heterólogos. Esto es llevado a cabo mediante la regulación de los niveles de lisozima T7 (inhibidor natural de la ARN polimerasa T7) por medio de la adición de L-Ramnosa en concentraciones entre 0 y 2 mM.

Rosseta(DE3): Especializada en la producción de proteínas eucariotas que contienen codones raros para *E. coli* como AUA (ILE), AGG (ARG), AGA (ARG), CUA (LEU), CCC (PRO) y GGA (GLY).

Inicialmente se transformó el vector recombinante pBAD202/*Lb*TNTA en la cepa de expresión Lemo21(DE3) con el objetivo de estandarizar la concentración de L-Ramnosa con valores de 0, 100, 250, 500 y 750 μ M de acuerdo con las recomendaciones del distribuidor. Cada uno de los ensayos se llevó a cabo bajo las condiciones anteriormente mencionadas (14 horas de inducción, 37 °C y 0.02% (p/v) L-Arabinosa), de acuerdo con esto, se identificó una mayor expresión con 250 μ M de L-Ramnosa (**Figura 7-2A**).

Posteriormente se transformó la cepa Rosseta(DE3) con el vector recombinante y se indujo la expresión de la proteína Trx-*Lb*TNTA simultáneamente en las tres cepas bajo las condiciones anteriormente mencionadas (adicionando 250 μ M de L-Ramnosa en el caso de Lemo21(DE3)). De

esta manera se determinó que la mayor producción de proteína recombinante se obtiene con la cepa BL21(DE3) (**Figura 7-2B**).

- **Concentración de inductor**

La expresión desde el sistema pBAD202/d-TOPO se realiza mediante la adición de L-arabinosa como agente inductor, teniendo en cuenta esto, se evaluaron concentraciones de 0.0002, 0.002, 0.02 y 0.2 % (p/v), de esta manera se indujo la expresión de la proteína recombinante Trx-LbTNTA durante 14 horas a 37 °C en la cepa de expresión BL21(DE3) (**Figura 7-2C**) de acuerdo con las recomendaciones para la expresión en el vector pBAD202/d-TOPO. A continuación, se obtuvieron las proteínas totales para cada una de las condiciones evaluadas de acuerdo con su densidad óptica a 600 nm.

Posteriormente se evaluó cada condición comparándola con el tiempo 0, de esta manera se evidenció un aumento en la producción de la proteína (≈ 52.8 kDa) hasta una concentración de inductor de 0.02%(p/v), sin embargo, a mayores concentraciones se observó una disminución en la cantidad de proteína expresada (**Figura 7-2C**). De acuerdo con esto, se seleccionó el valor de 0.02% (p/v) de L-arabinosa como concentración óptima de inductor.

- **Temperatura de inducción**

Una vez se estableció la concentración óptima de inductor, se realizó la estandarización de la temperatura de inducción, considerando que algunas veces la expresión de proteínas de membrana aumenta a temperaturas inferiores a 30 °C. De esta manera, se evaluaron las temperaturas de 25 y 37 °C (**Figura 7-2D**). A continuación, se obtuvieron las proteínas totales para cada una de las condiciones evaluadas de acuerdo con su densidad óptica a 600 nm y se identificó que se obtiene una mayor cantidad de proteína a 37 °C, por lo tanto, se escogió esta temperatura como óptima.

- **Tiempo de inducción**

Se llevó a cabo la inducción de la proteína recombinante Trx-LbTNTA a 37 °C en la cepa de expresión de *E. coli* BL21(DE3) con una concentración de 0.02 % (p/v) de L-Arabinosa como agente inductor y se evaluaron tiempos de inducción de 2, 4, 6, 8 y 14 horas (**Figura 7-2E**). Para cada uno de los tiempos evaluados se obtuvieron las proteínas totales, de acuerdo con su densidad óptica a 600 nm, con lo cual se identificó que la mayor producción de la proteína es a las 4 horas, momento a partir del cual la producción se mantiene constante, por lo tanto se determinó que este es el tiempo óptimo de inducción.

Hasta este punto, se determinó que la mayor cantidad de proteína se obtiene con la cepa BL21(DE3) a pesar de haber evaluado la cepa Lemo21(DE3), especializada en la expresión de proteínas de membrana, sin embargo, es importante tener en cuenta que la expresión no solo depende del sistema utilizado sino también de propiedades intrínsecas de la proteína, tales como estabilidad, tamaño, estructura, entre otros. Con relación a la concentración de inductor se obtuvo un valor intermedio (0.02 % (p/v)) con relación a las recomendadas por el fabricante ³⁹, debido posiblemente a que bajas concentraciones conllevan a inducciones incompletas y un exceso puede resultar en efectos tóxicos para la célula⁴⁰.

La mayor expresión se consiguió a 37 °C a pesar de que se conoce que temperaturas bajas (menores a 30°C) favorecen una mayor expresión y adecuado plegamiento de las proteínas debido a un equilibrio entre la síntesis y el crecimiento del cultivo, sin embargo, mayores temperaturas favorecen el crecimiento, que en algunos casos se traduce en mayores niveles de proteína mal plegadas contribuyendo a la formación de cuerpos de inclusión. Asimismo la mayor producción de proteína recombinante se obtuvo a 4 horas ya que a mayores tiempos puede ocurrir la saturación de las rutas de biosíntesis proteica que pueden llevar en algunos casos a la muerte celular y por otra parte a la degradación ⁴⁰. Una vez se establecieron las condiciones óptimas de expresión se procedió a la obtención de grandes cantidades de Trx-LbTNTA para la producción de los anticuerpos policlonales que serán utilizados para la detección del candidato endógeno.

Con el propósito de identificar la solubilidad de la proteína recombinante, se realizó la lisis a partir del *pellet* de células inducidas de acuerdo con las recomendaciones del vector pBAD202/d-TOPO ³⁹ para obtener las fracciones proteicas soluble e insoluble, con lo que se detectó la acumulación de LbTNTA en la fracción insoluble predominantemente, en donde se encuentra en forma de cuerpos de inclusión (CI) resultado del plegamiento incorrecto de la proteína, como era de esperarse debido a la alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos del candidato (índice de alifático, 78.67), no obstante la adición de la etiqueta de tiorredoxina. Estos agregados comúnmente son un resultado no deseado debido a la disminución del rendimiento de la expresión y de la proteína soluble aprovechable para posteriores análisis; inclusive durante muchos años fueron considerados como productos de desecho. Sin embargo, los CI constituyen una fuente enriquecida de proteína recombinante que puede ser aprovechable, incluso para ensayos funcionales ⁴¹. Teniendo en cuenta esta información, la utilidad de los CI está en función del objetivo planteado, por lo tanto, en este trabajo fueron utilizados para la producción de anticuerpos policlonales en el modelo aviar, su posterior caracterización y finalmente para la evaluación de la capacidad transportadora del

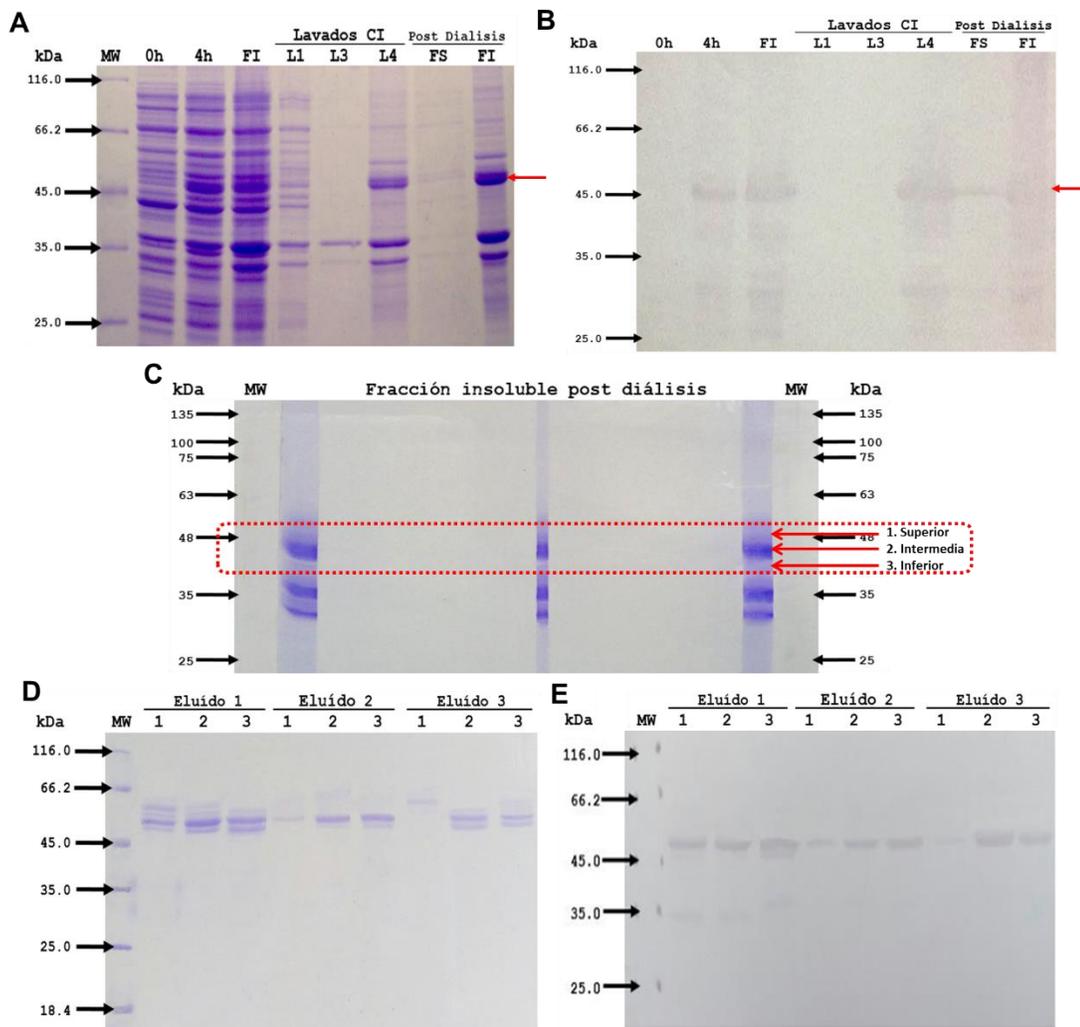
candidato mediante reconstitución (Capítulo II); de esta manera se procedió a su purificación como se muestra a continuación.

Para la purificación de Trx-*Lb*TNTA a partir de los cuerpos de inclusión se realizaron 4 lavados con agentes caotrópicos y reductores con el objetivo de enriquecerlos con la proteína recombinante y de retirar otras proteínas, tales como las sub-unidades de la ARN polimerasa (α , α , β' , β), las sub-unidades L7, L13, 12S y 23S ribosomales, el factor de elongación EF-Tu, constituyentes de la membrana citoplasmática externa como OmpC, OmpF y OmpA, algunos componentes de la pared celular de *E. coli*, la chaperonina GroEL, así como lípidos e incluso ADN plasmídico, reportados como contaminantes en los CI.⁴²⁻⁴⁴. A continuación, se removieron los agentes caotrópicos de la fracción final mediante diálisis. Este procedimiento de purificación fue evaluado mediante SDS-PAGE y western blot tomando una alícuota de cada lavado y eliminando sales mediante precipitación con etanol (**Figura 7-3A-B**) con lo cual se identificó que la proteína se encuentra mayoritariamente en la fracción insoluble obtenida posterior a la diálisis y que se eliminaron proteínas contaminantes en comparación con la fracción insoluble inicial, adicionalmente se evidenció que no hubo pérdida de la proteína durante los lavados.

Como segunda fase en el proceso de purificación y en aras de obtener la proteína con mayor pureza se llevó a cabo un SDS-PAGE preparativo en el cual se teñeron tres carriles para comprobar la migración de la proteína de interés, correspondientes a los extremos y el centro del gel (**Figura 7-3C marcados con asteriscos**); una vez se estableció el patrón de migración con base en los carriles teñidos, se cortaron tres bandas en los carriles no teñidos correspondientes con Trx-*Lb*TNTA, como se muestra en la **Figura 7-3C**, para evitar pérdidas de la proteína por anomalías en su movilidad electroforética. A continuación, se eluyeron cada una de las bandas cortadas 3 veces durante 24 horas cada una (eluidos 1, 2 y 3) y la presencia de Trx-*Lb*TNTA se comprobó mediante SDS-PAGE y western blot (**Figura 7-3D-E**). De acuerdo con estos resultados se juntaron los eluidos en los que se reconoció la proteína recombinante para cada una de las bandas y eluidos (**Figura 7-3E**).

Figura 7-3. Purificación Trx-*Lb*TNTA empleando cuerpos de inclusión de *E. coli* y SDS-PAGE preparativo. **A y B.** La fracción proteica insoluble de *E. coli* que contiene los cuerpos de inclusión se utilizó para obtener a Trx-*Lb*TNTA. L1: lavado con buffer (Tris/HCl 100mM, urea 2M, Tritón X-100 2% (p/v), EDTA 5 mM y DTT 5mM, pH 7.0), L3: lavado con buffer (Tris/HCl 100mM, EDTA 5 mM y DTT 5mM, pH 7.0) y L4, lavado con buffer de extracción (Tris/HCl 50mM, EDTA 5 mM, DTT 5mM, hidrocloreuro de guanidinio 8M, pH 7.0); F.S y F.I, fracciones proteicas soluble e insoluble post diálisis. **C y D.** Evaluación de los eluidos obtenidos para cada una de las bandas cortadas del SDS-PAGE preparativo. **1, 2 y 3,** bandas superior, intermedia e inferior respectivamente. **A,** y **D.** SDS-PAGE al 12%

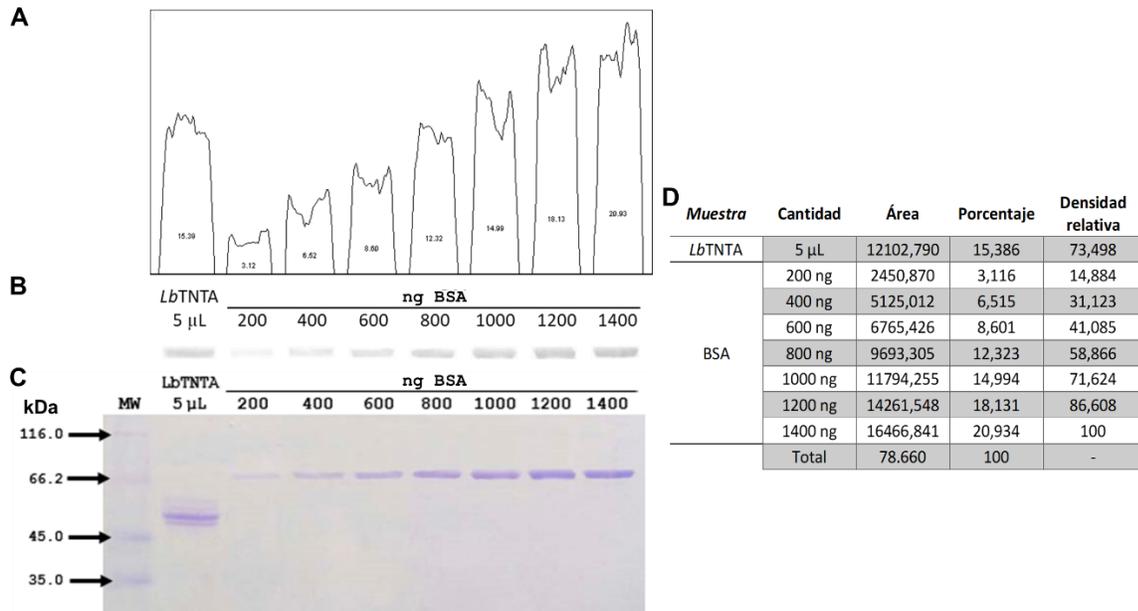
(p/v) tinción azul de Coomassie R250. **B** y **E**. Western blot revelado por el sistema Biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina, anticuerpo primario α -Trx (1:6.000). La flecha indica la expresión de Trx-*Lb*TNTA (≈ 52.8 kDa). **MW**, Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker.



A continuación se cuantificó la proteína mediante densitometría, para ello se construyó una recta cantidad de proteína (ng) vs densidad relativa a partir de la medición del área de cada una de las bandas obtenidas (**Figura 7-4A**) de un gel SDS-PAGE donde se elaboró una curva con diferentes cantidades de BSA (ng) en comparación con 5 μ L de la proteína parcialmente purificada (**Figura 7-4C**). Mediante este análisis y regresión lineal se estableció la ecuación de la recta ($y = 0.0709x + 1.0475$ $r^2 = 0.9981$) con la que se obtuvo una concentración de ≈ 204.374 ng/ μ L para Trx-*Lb*TNTA, la cual se utilizó posteriormente para la producción de los anticuerpos policlonales IgY.

Figura 7-4. Cuantificación densitométrica de la proteína recombinante Trx-*Lb*TNTA. Se utilizó el software ImageJ para la cuantificación de la proteína obtenida, con el cual **A.** y **D.** Se obtuvieron los valores de área,

porcentaje y densidad relativa para cada una de las bandas analizadas, obteniéndose mediante regresión lineal, la ecuación de la recta ($y = 0.0709x + 1.0475$) con un $r^2 = 0.9981$. **B.** Se realizó el tratamiento de las bandas para la eliminación del ruido de fondo. **C.** Se analizó un gel SDS-PAGE 12% (p/v) donde se construyó una curva con diferentes cantidades de BSA (ng) en comparación con 5 μ L de la proteína parcialmente purificada, tinción azul de coomassie R250. **MW**, Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker.



La producción de proteínas de membrana (PM) recombinantes, que provienen de organismos eucariotas, en sistemas heterólogos como *E. coli* presenta ciertas desventajas respecto al uso de sistemas de expresión como *Saccharomyces cerevisiae* o células de mamífero, debido a que se requiere un procesamiento específico para su correcto ensamblaje en la membrana citoplasmática y su transporte (maquinaria de importación y reconocimiento en algunos casos de péptido señal) así como para su modificación post traduccional (p. ej. la glicosilación), cuya maquinaria no está presente en organismos procariontes. Por lo tanto, la expresión de PMs en sistemas heterólogos frecuentemente resulta ser tóxica para la célula, se lleva a cabo en muy bajos niveles (bajo rendimiento), conlleva a plegamientos incorrectos y formación de agregados (CI)^{45,46}. A pesar de que en la actualidad se han modificado cepas de *E. coli* con el propósito de aumentar los rendimientos en la producción de PMs, como por ejemplo las cepas C41(DE3) y C43(DE3), se ha comprobado que su eficiencia es restringida⁴⁵. Por otra parte, se han diseñado vectores para dirigir la expresión de proteínas eucariotas hacia la membrana de *E. coli*, como aquellos con la proteína fusión MISTIC y sus ortólogos⁴⁷, sin embargo, estos vectores no están comercialmente disponibles. Teniendo en cuenta que la sobre expresión depende de la combinación adecuada del gen a expresar, el vector de

clonación y el sistema de expresión, es necesario evaluar varias combinaciones entre estos factores como se llevó a cabo en este trabajo para Trx-*LbTNTA*.

Considerando lo anterior, era de esperarse una baja expresión y acumulación en la fracción insoluble (cuerpos de inclusión debido a la formación de agregados) de Trx-*LbTNTA* en el sistema de expresión seleccionado en este trabajo, no obstante, para el objetivo planteado el sistema de expresión *E. coli* es apropiado por las facilidades técnicas y de costos. De acuerdo con esto y como se ha evidenciado en otros estudios, la expresión de proteínas de membrana siempre constituye un reto^{48, 49}.

7.1.2. Producción de anticuerpos aviares (IgY's α -Trx-*LbTNTA*)

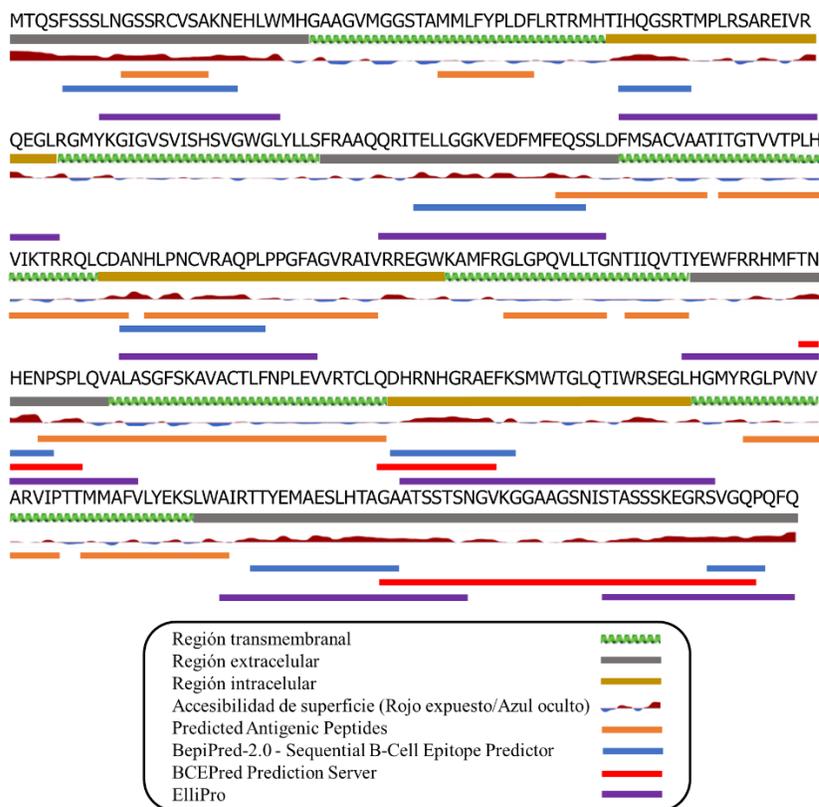
En trabajos anteriores en los cuales se ha reportado la dificultad en la producción de anticuerpos contra proteínas de membrana⁵⁰, se pueden considerar dos aspectos importantes, en primer lugar la obtención del antígeno, ya que sistemas de expresión como *E. coli* no permiten rendimientos altos para proteínas de membrana (como se mostró anteriormente en este trabajo). En segundo lugar, estas proteínas presentan baja inmunogenicidad ya que poseen regiones extracelulares “pobres”, una alta hidrofobicidad debida a los segmentos transmembranales y estructuras tridimensionales complejas que dependen de un ambiente lipídico (membrana), lo que se traduce en la ausencia de epítomos conformacionales^{51,52}. Para hacer frente a esto, existen dos enfoques metodológicos ampliamente utilizados, el primero consiste en la producción de anticuerpos a partir de péptidos correspondientes con las regiones de los epítomos, sin embargo, los péptidos pequeños no presentan inmunogenicidad, por lo que requieren de una proteína de transporte inerte (p. ej. BSA) con el objetivo de estimular la respuesta inmune, lo que en ocasiones resulta ser complejo; asimismo, estos péptidos son diseñados a partir de predicciones desde la secuencia primaria, no obstante, algunos epítomos pueden estar restringidos a la secuencia tridimensional de la proteína, ya que están formados por secuencias cortas y discontinuas, que por este método no pueden plegarse o ensamblarse juntas. El segundo enfoque consiste en utilizar la proteína completa como antígeno, lo que proporciona una gran ventaja frente al primera metodología y es la producción de anticuerpos de gran variedad (policlonales) contra múltiples epítomos a lo largo de toda la proteína, aumentando así la probabilidad del reconocimiento de la proteína endógena. De acuerdo con esta información y teniendo en cuenta que el objetivo de la producción de los anticuerpos es la inmunodetección de *LbTNTA* endógeno, en este trabajo se utilizó la proteína completa obtenida en el numeral **7.1.1** para las inoculaciones.

Con el propósito de identificar los epítomos de *LbTNTA*, se llevó a cabo su predicción mediante los servidores basados en secuencia, Predicted Antigenic Peptides (basado en la frecuencia de aparición de un aminoácido en epítomos experimentalmente determinados), BepiPred-2.0 - Sequential B-Cell Epitope Predictor (el cual tiene en cuenta información de la estructura secundaria y la accesibilidad de superficie para determinar la exposición de cada residuo)⁵³ y BCEPred (se basa en las características fisicoquímicas de cada aminoácido como lo son la hidrofiliidad, flexibilidad, polaridad, accesibilidad y superficie de exposición)⁵⁴, sobre la secuencia del candidato sin la etiqueta de tioredoxina, ya que el objetivo de la producción de los anticuerpos es la detección de la proteína endógena que no la posee. Adicionalmente se realizó una predicción de epítomos basada en estructura con el predictor ElliPro (tiene en cuenta la accesibilidad de superficie y la estructura 3D, con lo que puede identificar epítomos discontinuos o estructurales)⁵⁵, a partir del modelo de estructura terciaria obtenido de *LbTNTA*. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la **Figura 7-5**.

A partir del análisis desde la estructura primaria y teniendo en cuenta la estructura secundaria refinada (como se muestra más adelante) de *LbTNTA*, se identificó que el servidor Predicted Antigenic Peptides muestra epítomos tanto en regiones transmembrana como en aquellas que no lo son (**Figura 7-5, barras de color naranja**. 11-GSSRCVSA-18, 38-MMLFYPLDF-46, 80-KGIGVSVISHSVG WGLYLLSFR-101, 121-EQSSLD FMSACVAA-134, 136-ITGTVVTPHVI KTRRQLCDA-156, 158-HLPNCVRAQPLPPGFAGVRAIV-179, 190-GLGPQVLLTG-199, 201-TIIQVTI-207, 221-N PSPLQVALASGFSKAVACTLFNPLEVVRTCLQ-253, 284-RGLPVNVAR VIP-295, 298-MMAF VLYEKSLWA-310), por lo tanto, es muy probable que de acuerdo con la estrategia metodológica planteada para la producción de los anticuerpos (**6.1.3**) en donde *LbTNTA* no se encontraba en su conformación tridimensional, los IgY's policlonales también hayan sido producidos contra estas regiones. Sin embargo, al utilizar información de la accesibilidad de superficie para la predicción (BepiPred-2.0 y BCEPred), se predijeron epítomos solamente para las regiones de residuos expuestos (extracelular e intracelular), (**Figura 7-5, barras de color azul para BepiPred 2.0**. 5-FSSSLNGSSRCVSAKNE-21, 54-IHQGSRT-60, 108-TELLGGKVEDFMFEQS-123, 156-A NHLPNCVRAQPL-168, 219-HENP-222, 254-DHRNHGRAEFK-264, 313-TTYEMAESLHTAG A-326 y 355- SVGQP-359. **Figura 7-5, barras de color rojo para BCEPred** 217-TNHENPSP-224, 253-QDHRNHGRA E-262 y 325-GAATSSTSNGVKGAAGSNISTASSSKEGRSVGQ-358). Al comparar estos epítomos con los predichos a partir de la estructura terciaria (ElliPro) (**Figura 7-5, barras de color púrpura**, 9-LNGSSRCVSAKNEHLW-24, 54-IHQGSRTMPLRSAREIVR Q EGLR-76, 105-QRIT ELLGGKVEDFMFEQSSL-125, 156-A NHLPNCVRAQPLPPGFA-173,

207-IYE WFRRHMFTNHENPSPLQVALA-230, 255-HRHHGAEFKSMWTGLQTIWRSEGLH G-281, 310-AIRTTYEMAESLHTAGAATSSTS-332 y 345-STASSSKEGRSVGQPQFQ-362), es posible identificar regiones comunes entre ellos, principalmente entre BepiPred 2.0 y ElliPro, lo que indica una mayor probabilidad de ser regiones inmunogénicas en *LbTNTA*, las cuales serían el blanco de reconocimiento de los IgY's α -Trx-*LbTNTA* para el candidato endógeno *in situ*, ya que en estas condiciones la proteína se encontraría en su conformación tridimensional al interior de una membrana y por lo tanto los anticuerpos no podrían acceder a los epítomos de las regiones transmembranales.

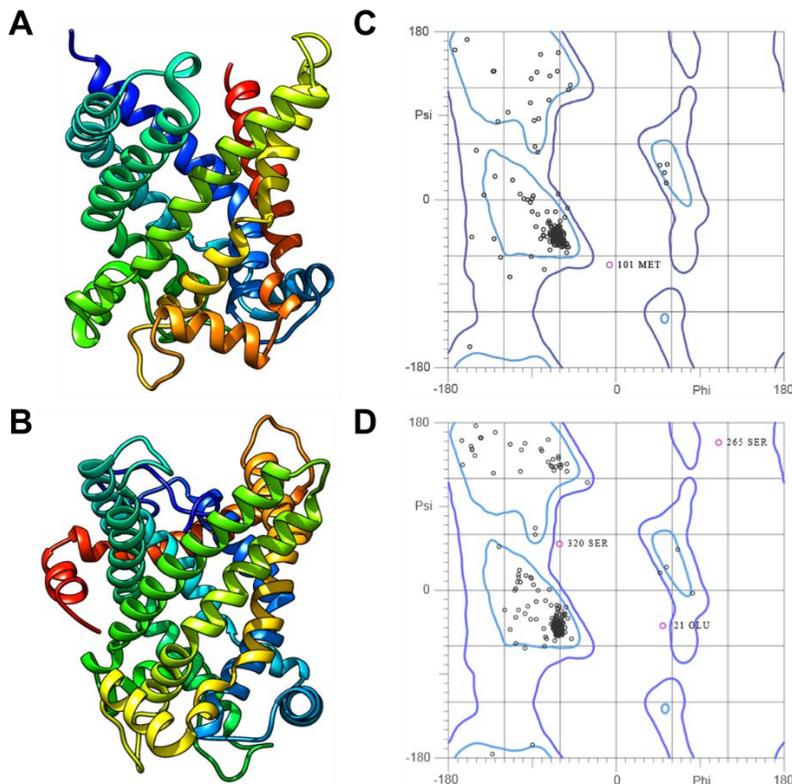
Figura 7-5. Predicción de epítomos para *LbTNTA*. Se utilizaron los servidores Predicted Antigenic Peptides, BepiPred-2.0 y BCEPred basados en la estructura primaria y ElliPred basado en la estructura terciaria, para determinar la localización de epítomos para el candidato *LbTNTA*.



Con el objetivo de observar los epítomos predichos de una mejor manera, se planteó el uso del modelo de estructura terciaria obtenido previamente para *LbTNTA*³, sin embargo, este modelo fue construido a partir de una secuencia de la proteína incompleta (289 residuos), en donde se eliminaron los extremos N- y C-terminal ($\Delta_{1-18}\Delta_{308-362}$ *LbTNTA* correspondiente con el dominio de la familia de transportadores mitocondriales, IPR023395 en Interpro) para mejorar los resultados del

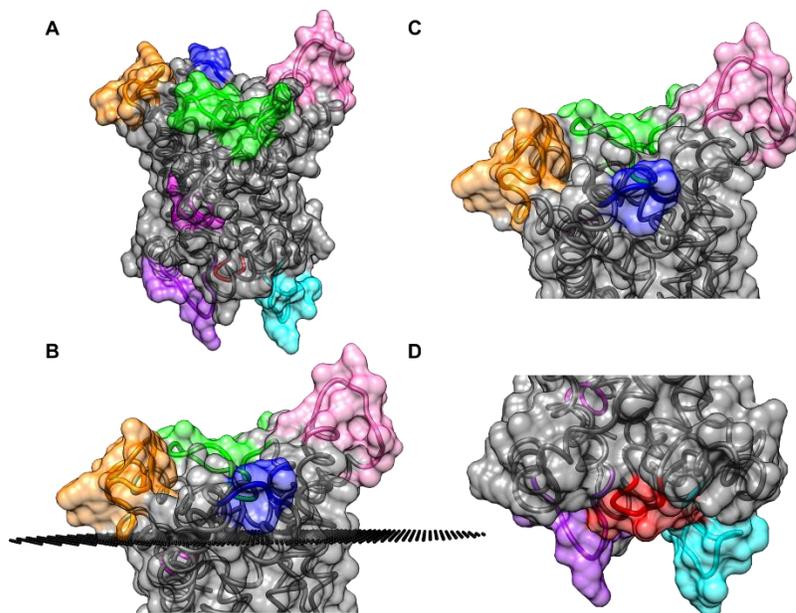
modelamiento por el servidor I-TASSER. Teniendo en cuenta esta información, se decidió realizar un nuevo modelamiento a partir de la secuencia completa, esta vez con el método de modelamiento *ab initio*, a través de la plataforma ROBETTA, la cual construye modelos predictivos tanto por comparación como por *ab initio* a partir de las características fisicoquímicas de cada aminoácido^{56,57}. El modelo obtenido fue refinado por 3DRefine (<http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/>) y evaluado por gráficos de Ramachandran mediante MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) con 96.94% de los residuos en la región favorecida, que a pesar de no superar el umbral de 98.0%, es un valor muy cercano y adicionalmente superior al del modelo obtenido con I-TASSER⁵⁸ previamente de 93.06% (**Figura 7-6**), por lo tanto este fue seleccionado para análisis posteriores.

Figura 7-6. Evaluación de los modelos de estructura terciaria para *Lb*TNTA. Se muestran los modelos de estructura terciaria obtenidos para *Lb*TNTA y su correspondiente validación mediante gráficos de Ramachandran. **A.** Modelo para $\Delta_{1-18}\Delta_{308-362}$ *Lb*TNTA correspondiente con el dominio de la MCF obtenido por I-TASSER. **B.** Modelo para *Lb*TNTA completo obtenido por ROBETTA. **C.** Gráfico de Ramachandran para el modelo de $\Delta_{1-18}\Delta_{308-362}$ *Lb*TNTA y **D.** Gráfico de Ramachandran para el modelo de *Lb*TNTA. **A.** y **B.** Imágenes generadas mediante UCSF-Chimera v 1.10.2⁵⁹. **C.** y **D.** Gráficos obtenidos con MolProbity.



A continuación, en el modelo obtenido con ROBETTA, se señaló la ubicación de los epítomos obtenidos por BepiPred-2.0, así como la superficie molecular de la proteína (**Figura 7-7**), con esto, fue posible identificar que las regiones inmunogénicas predichas corresponden con zonas altamente expuestas en la proteína, un requisito indispensable para el reconocimiento e interacción molecular con los anticuerpos. Asimismo se evidenció la localización de los epítomos predichos sobre los extremos extra e intracelulares para este modelo (**Figura 7-7B-D**).

Figura 7-7. Disposición espacial de los epítomos predichos con BepiPred-2.0 sobre el modelo de estructura terciaria obtenido mediante ROBETTA para *LbTNTA*. Se muestran los ocho epítomos predichos en: verde (5-FSSSLNGSSRCVSAKNE-21), rojo (54-IHQGSRT-60), amarillo (108-TELLGGKVEDFMFEQS-123), cian (156-ANHLPNCVRAQPL-168), azul (219-HENP-222), púrpura (254-DHRNHGRAEFK-264), rosado (313-TTYEMAESLHTAGA-326) y magenta (355-SVGQP-359). La superficie para el modelo se muestra con una transparencia del 50%. Vista frontal del modelo completo obtenido por Robetta (**A**). Vistas posteriores de la región extracelular (**B** y **C**) y la región intracelular (**D**). En **B** se muestra la delimitación de la región extracelular de la membrana. Imágenes generadas mediante UCSF-Chimera v 1.10.2.



A partir de la proteína Trx-*LbTNTA* (antígeno) parcialmente purificada con una concentración de ≈ 204.374 ng/ μ L se inició la producción de anticuerpos policlonales aviares en gallinas Babcock brown de 32 semanas de edad. El modelo aviar fue utilizado ya que se conoce muy bien su sistema inmune siendo muy parecido al de mamíferos, con la generación de tres tipos de inmunoglobulinas (IgM, IgA e IgY, esta última relacionada evolutivamente con la IgG y la IgE de mamíferos), adicionalmente, presenta algunas ventajas para la producción de anticuerpos policlonales; en primer

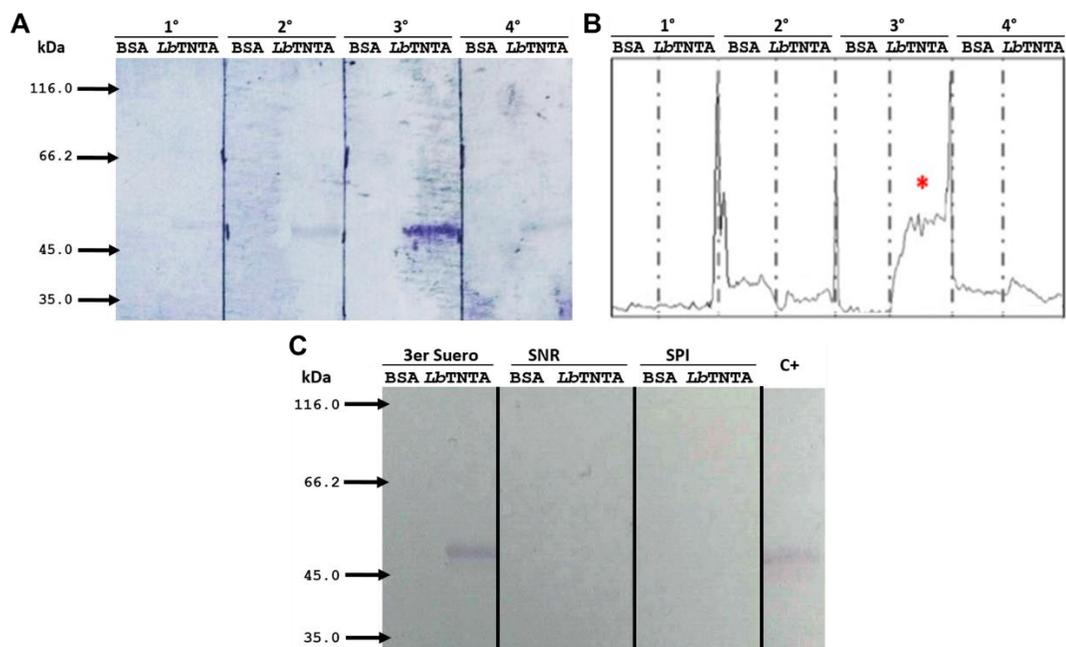
lugar, la gran distancia filogenética existente entre tripanozomátidos y aves, conlleva al reconocimiento de un gran número de epítomos en proteínas provenientes de estos protozoarios y por consiguiente mayor producción de anticuerpos; en segundo lugar, su alta estabilidad, ya que pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo (meses e incluso años) y aún conservar su actividad antigénica⁶⁰; en tercer lugar, los IgY's pueden obtenerse desde dos fuentes, el suero y los huevos, por lo que su recolección puede ser un método no invasivo si solamente se trabaja con los huevos, en comparación con el trabajo con mamíferos como ratones o conejos, en donde es requerida la punción o el sacrificio para la obtención de los sueros inmunogénicos; por último, la cantidad de anticuerpos obtenida por más es mucho mayor en aves (≈ 1.500 mg solamente en huevos) que en mamíferos (≈ 200 mg), con un rendimiento de anticuerpos específicos del $\approx 5\%$ y del 2 – 10% respectivamente⁶¹ y con alta avidéz (10^9 L/mol), incluso después de la primera inmunización, alcanzada en mamíferos solamente hasta el cuarto refuerzo⁶².

En este trabajo se recolectaron tanto las sangrías como los huevos posteriores a cada inoculación del antígeno (**6.1.3**), estos últimos fueron utilizados en un trabajo paralelo en nuestro grupo de investigación, por lo tanto, para la detección de *LbTNTA* endógeno, solamente se utilizaron las sangrías, esto teniendo en cuenta que aunque las IgY's se encuentran principalmente en la yema de los huevos (7.9 – 25 mg/mL, frente a IgM 0.15 mg/mL e IgA 0.7 mg/mL), son las inmunoglobulinas presentes en mayor concentración en el suero sanguíneo (5 – 15 mg/mL) en comparación con las IgM (1 – 3 mg/mL) y las IgA (0.3 – 0.5 mg/mL)⁶² y son transportadas desde el suero hacia los huevos a través del epitelio folicular con un tiempo de retraso de 3 a 6 días desde su aparición en sangre⁶³. Adicionalmente, se utilizaron las sangrías por su facilidad en el procesamiento de los sueros y la obtención de anticuerpos específicos para *LbTNTA* (**6.1.3.2**).

A partir de las 4 sangrías recolectadas, se obtuvieron los respectivos sueros inmunogénicos (sin la purificación de los anticuerpos específicos α -Trx-*LbTNTA*), posteriormente estos fueron evaluados mediante western blot y densitometría, con lo cual se identificó que el tercer suero presenta el mayor reconocimiento del antígeno (**Figura 7-8A-B**), por lo tanto, este fue seleccionado para los ensayos de inmunodetección de *LbTNTA* endógeno. Este resultado concuerda con lo observado en la producción de anticuerpos en el modelo aviar, en donde la respuesta adaptativa o de memoria ante una reinfección promueve una mayor producción de anticuerpos específicos contra el antígeno, lo que se traduce en una respuesta más rápida, más fuerte y más eficiente⁶⁴. Asimismo se comprobó que para ninguna de las sangrías hubo reconocimiento inespecífico de BSA y finalmente se

determinó que el reconocimiento de Trx-*LbTNTA* por parte de los sueros inmunogénicos es producto del proceso de inmunización y no por características intrínsecas de las gallinas utilizadas (**Figura 7-8C**), esto mediante la evaluación por western blot del suero pre-inmune (antes de la inmunización) y el suero no relacionado (gallina control) frente a 300 ng de Trx-*LbTNTA*.

Figura 7-8. Evaluación de sangrías α -Trx-*LbTNTA*. **A.** Se evaluaron los sueros obtenidos para cada una de las cuatro sangrías mediante el reconocimiento de 300 ng de antígeno (Trx-*LbTNTA*), como control negativo se utilizaron 300 ng de BSA. **B.** Análisis densitométrico con el software ImageJ. **C.** Evaluación de la especificidad del tercer suero (α -Trx-*LbTNTA*), SNR (suero no relacionado) y SPI (suero pre inmune), los sueros fueron utilizados en una dilución 1:5.000. C+, control positivo, anticuerpo comercial α -Trx 1:6.000. **A** y **C.** Western blot revelado por el sistema biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina. El asterisco indica la mayor área determinada para el tercer suero. *LbTNTA* corresponde con la proteína recombinante Trx-*LbTNTA*. MW, Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker.

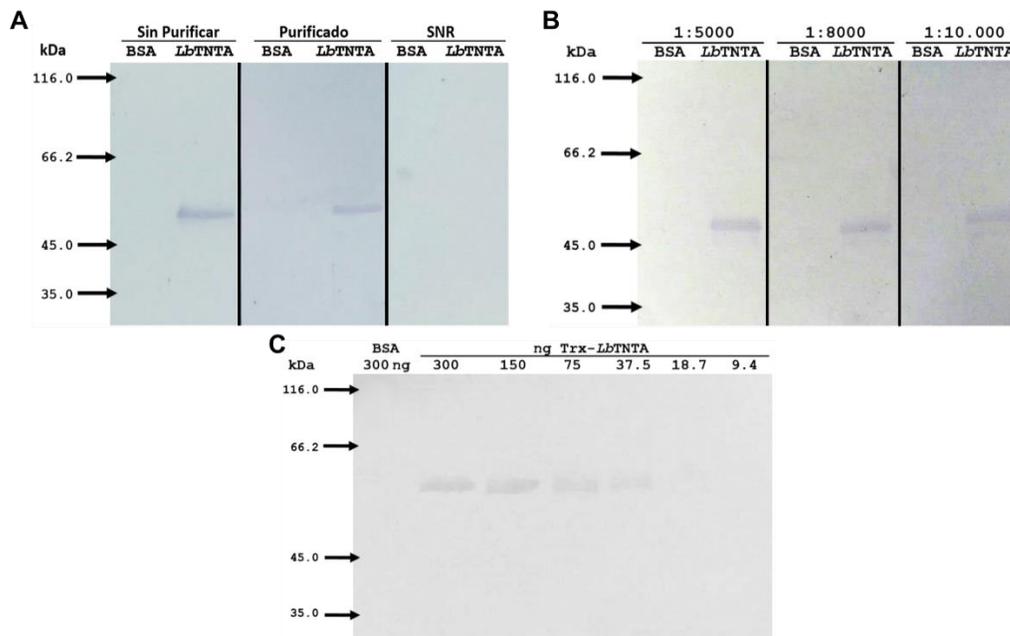


7.1.3. Evaluación de IgY's α -Trx-*LbTNTA*

Una vez se comprobó la especificidad del suero de la tercera sangría en el reconocimiento de Trx-*LbTNTA*, se purificaron los anticuerpos específicos contra la proteína recombinante mediante afinidad al antígeno (**6.1.3.2**), los cuales también demostraron la capacidad de reconocerlo en diluciones 1:5.000, al igual que el suero sin purificar (**Figura 7-9A**). A continuación, los IgY's α -Trx-*LbTNTA* purificados fueron caracterizados mediante ensayos de western blot para evaluar su calidad, de esta manera se determinó la mayor dilución de anticuerpo capaz de reconocer 300 ng del

antígeno, identificándose que incluso con la mayor dilución evaluada (1:10.000) esta cantidad fue detectada (**Figura 7-9B**). Asimismo, se evaluó la mínima cantidad de antígeno reconocida por una dilución 1:5.000 de anticuerpo, con una detección de hasta 37.5 ng de proteína recombinante (**Figura 7-9C**).

Figura 7-9. Evaluación de anticuerpos α -Trx-*Lb*TNTA mediante western blot. A. Evaluación de la purificación de los IgY's a partir del tercer suero mediante el reconocimiento de 300 ng de Trx-*Lb*TNTA, como control se utilizaron 300 ng de BSA. Los sueros no relacionado (SNR) y de la tercera sangre sin purificar se emplearon en una dilución 1:5.000, al igual que los α -Trx-*Lb*TNTA purificados. B. Evaluación de la mayor dilución de anticuerpo capaz de reconocer 300 ng de antígeno y C. Evaluación de la mínima cantidad de Trx-*Lb*TNTA reconocida por una dilución 1:5.000 del α -Trx-*Lb*TNTA. Western blot revelado por el sistema biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina. *Lb*TNTA corresponde con la proteína recombinante Trx-*Lb*TNTA. MW, Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker.



De acuerdo con estos resultados y a pesar de que se recomienda el uso de gallinas entre 18 a 20 semanas de edad para la producción de anticuerpos⁶⁵, se obtuvo una herramienta eficaz en la detección del candidato, con capacidad de reconocer bajas cantidades del antígeno (hasta 37,5 ng) en altas diluciones (1:5.000), lo que demuestra que gallinas mayores como las utilizadas (32 semanas), en edad de ponencia, pueden ser empleadas en la producción de anticuerpos. Adicionalmente, estos resultados demuestran la producción de una herramienta inmunológica de buena calidad para el estudio del candidato *Lb*TNTA en extractos celulares.

7.2. Determinación de la localización sub-celular del candidato *LbTNTA* endógeno.

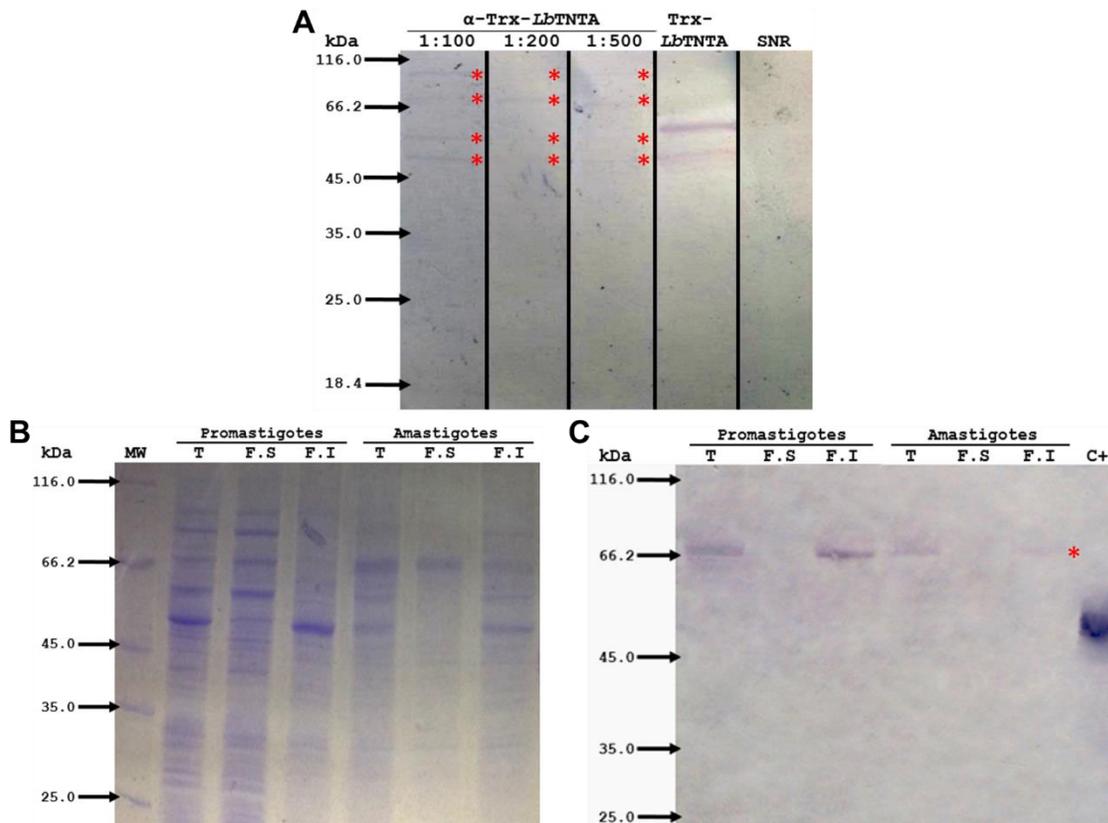
A partir de la herramienta inmunológica previamente producida y evaluada se procedió a la identificación del candidato *LbTNTA* endógeno, para ello, en primer lugar se detectó la proteína en extractos celulares de promastigotes y amastigotes de *Leishmania braziliensis* y a continuación se llevaron a cabo ensayos de inmunolocalización mediante microscopía de fluorescencia para ambos estadios. A continuación se muestran los resultados obtenidos a partir de estos ensayos y su análisis correspondiente.

7.2.1. Inmunodetección sobre extractos proteicos de *L. braziliensis*

Se evaluaron extractos proteicos totales de promastigotes de *L. braziliensis* con diferentes diluciones del suero sin purificar (1:100, 1:200 y 1:500) para determinar la dilución de trabajo (**Figura 7-10A**). Con este ensayo se identificaron cuatro bandas de mayor peso al esperado (39.83 kDa) de 92.47, 79.51, 64.72 y 57.14 kDa en las tres diluciones evaluadas, las cuales no fueron reconocidas por el SNR. Adicionalmente, se determinó que el mejor reconocimiento se obtuvo para la dilución 1:100 del anticuerpo, por lo cual se tomó como la dilución de trabajo. Con el objetivo de mejorar la especificidad del reconocimiento se utilizaron los anticuerpos purificados desde la tercera sangría en esta misma dilución para la detección de la proteína endógena sobre extractos proteicos totales y fracciones solubles e insolubles de amastigotes axénicos y promastigotes (**Figura 7-10C**). De esta manera, de las bandas reconocidas anteriormente, se detectó únicamente la de ≈ 79.51 kDa (≈ 40 kDa más de lo esperado) tanto en proteínas totales como en la fracción insoluble de ambos estadios. Esta banda de mayor tamaño al esperado (39.83 kDa), corresponde con *LbTNTA* modificado por glicosilaciones (como se demuestra más adelante **Figura 7-13B-C**). Lo anterior teniendo en cuenta que la glicosilación es una modificación postraduccional común en proteínas localizadas en membranas que aumenta su solubilidad y estabilidad, mediando en algunos casos interacciones con otras proteínas. Asimismo, las glicoproteínas al ser analizadas mediante SDS-PAGE presentan alteraciones en su movilidad electroforética, debido a que la glicosilación afecta la hidrofobicidad local de la proteína y por consiguiente su afinidad con el SDS disminuye, como se ha demostrado en varios estudios⁶⁶⁻⁶⁹.

Figura 7-10. Inmunodetección del candidato *LbTNTA* sobre extractos proteicos de amastigotes axénicos y promastigotes de *L. braziliensis*. A. Evaluación de diluciones de suero para la inmunodetección de

LbTNTA sobre extractos proteicos de promastigotes de *L. braziliensis*. Control positivo Trx-*LbTNTA* (*LbTNTA*). **SNR**, suero no relacionado. **B.** Extractos proteicos de promastigotes y amastigotes axénicos de *L. braziliensis* **C.** Reconocimiento sobre extractos proteicos de promastigotes y amastigotes axénicos de *L. braziliensis* con α -Trx-*LbTNTA* purificado (1:100). **T.** proteínas totales, **F.S.** y **F.I.**, fracciones proteicas soluble e insoluble respectivamente. **C+**, control positivo Trx-*LbTNTA* **A.** y **C.** Western blot revelado por el sistema biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina. **B.** SDS-PAGE al 12% (p/v), tinción azul de Coomassie R250. Los asteriscos muestran los reconocimientos específicos para el candidato endógeno. **MW**, Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker.



Para estudiar esta modificación sobre el candidato, es necesario conocer la forma en la que ocurre, teniendo en cuenta que, la glicosilación de proteínas se puede clasificar en diferentes categorías, de las cuales destacan tres principalmente, ya que han sido ampliamente estudiadas identificándose que difieren entre sí en el tipo de enlace, núcleo de carbohidratos y aminoácido sobre el cual se une el glucósido a la proteína. En la primera se encuentra la N-glicosilación, que en eucariotas se lleva a cabo en el lumen del retículo endoplasmático (RE), en donde el núcleo $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ es transferido desde el donante dolicol-pirofosfato (formado por 19 unidades de isopreno) hacia un residuo de asparagina en la secuencia Asn-X-Ser/Thr ($X \neq$ prolina) de la proteína a glicosilar, por acción del complejo de la oligosacaril transferasa (OST) formando un enlace de tipo amida. En

mamíferos y levaduras, el complejo OST es multimérico y está unido a la membrana del RE, formado por una sub-unidad catalítica (STT3) y otras no catalíticas, las cuales contribuyen, entre otras cosas, a la especificidad de sustrato⁷⁰. Todos los N-glicanos comparten el mismo núcleo de azúcares y de acuerdo a sus ramificaciones pueden ser agrupados en 3 categorías, la primera se denomina oligomanosa, al estar compuestos únicamente por residuos de manosa; la segunda, glicanos complejos, al presentar ramificación y composición variada de carbohidratos y la última recibe el nombre de híbridos, ya que presentan ramificaciones complejas sobre el brazo Man α 1-3 de la primer manosa del núcleo base y en su brazo Man α 1-6, alta composición de residuos de manosa⁷¹. Por otra parte, en parásitos unicelulares de la familia de los tripanosomátidos se han identificado varias copias de STT3, pero no de las sub-unidades no catalíticas. Asimismo, se ha evidenciado que estos parásitos no sintetizan al dolicol-pirofosfato-glucosa y que el núcleo que se transfiere desde el dolicol-pirofosfato-oligosacárido a la proteína, varía entre las diferentes especies (Man_(5, 6, 7, 9)GlcNAc₂)⁷², a su vez el dolicol es más corto que en otros eucariotas, compuesto por 10 – 13 unidades de isopreno.

El segundo grupo es la O-Glicosilación, que, en animales, ocurre a partir de la transferencia de la GalNAc desde el UDP-GalNAc hacia residuos de serina o treonina por acción de la enzima N-acetilgalactosaminil transferasa (GALNT, presente únicamente en el reino animal) en el aparato de Golgi formando un enlace de tipo éter. Sobre la GalNAc, se forman cuatro tipos de núcleos (Gal β 1-3GalNAc, GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc, GlcNAc β 1-3GalNAc y GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc) que pueden extenderse por la adición de otros residuos como GalNAc, Gal, GlcNAc, Fuc, y Sia (excluyendo a Man, Glc y Xyl). En este tipo de glicosilación los residuos son donados desde nucleótidos unidos a azúcares mediante la acción de una glicosil transferasa⁷³. En el caso de los Tripanosomátidos como *Trypanosoma cruzi*, la O-glicosilación ocurre vía GlcNAc α 1-Thr por la N-acetil- α -glucosaminil transferasa en residuos de treonina y el núcleo base se forma por la unión de dos residuos de β Gal y finalmente uno de α Gal o Sia sobre GlcNAc α 1-Thr; este proceso ocurre de manera similar a los demás eucariotas en el aparato de Golgi⁷².

Por último, la C-glicosilación o C-manosilación consiste en la unión Man α 1-2Trp sobre el anillo indol de la cadena lateral de este aminoácido en el motivo W-X-X-W, en donde el primer triptófano es quien sufre la modificación. Esta glicosilación ocurre en el retículo endoplasmático y su donador biosintético es el dolicol-pirofosfato-manosa que se genera a partir del GDP-manosa por acción de la C-manosil transferasa. Esta modificación ha sido identificada únicamente en animales⁷⁴.

Teniendo en cuenta esta información, se predijeron los posibles sitios de glicosilación en *LbTNTA* con los servidores GlycoEP, NetOGlyc-4.0 y NetNGlyc-1.0, el primero de ellos es un predictor

especializado para glicoproteínas de eucariotas que se basa en la estructura primaria (<http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/submit.html>), mientras que los otros dos se basan en la información experimental de proteínas provenientes únicamente de mamíferos, a pesar de esto, se predijeron sitios de glicosilación comunes con los tres servidores lo que hace más probable esta predicción (**Tabla 7-1**). Para conocer los sitios con mayor potencial de ser blanco de esta modificación y teniendo en cuenta que *LbTNTA* es un candidato a una proteína transmembranal, se compararon estos resultados con la topología, la cual fue predicha previamente³ identificando 7 regiones transmembranales con el extremo N-Terminal en la region externa y el C-Terminal en la interna (**Figura 7-11A**) obtenido mediante PHYRE2 (basado en los métodos MEMSAT3, MEMSAT3VM y MEMEMBED)⁷⁵.

Tabla 7-1. Predicción de glicosilaciones para *LbTNTA*. Predicción de los posibles sitios de glicosilación en *LbTNTA* con los servidores GlycoEP, NetOGlyc-4.0 y NetNGlyc-1.0. En negrilla se muestran los residuos expuestos presentes únicamente en la cara externa de acuerdo con topología para el candidato mediante PHYRE2.

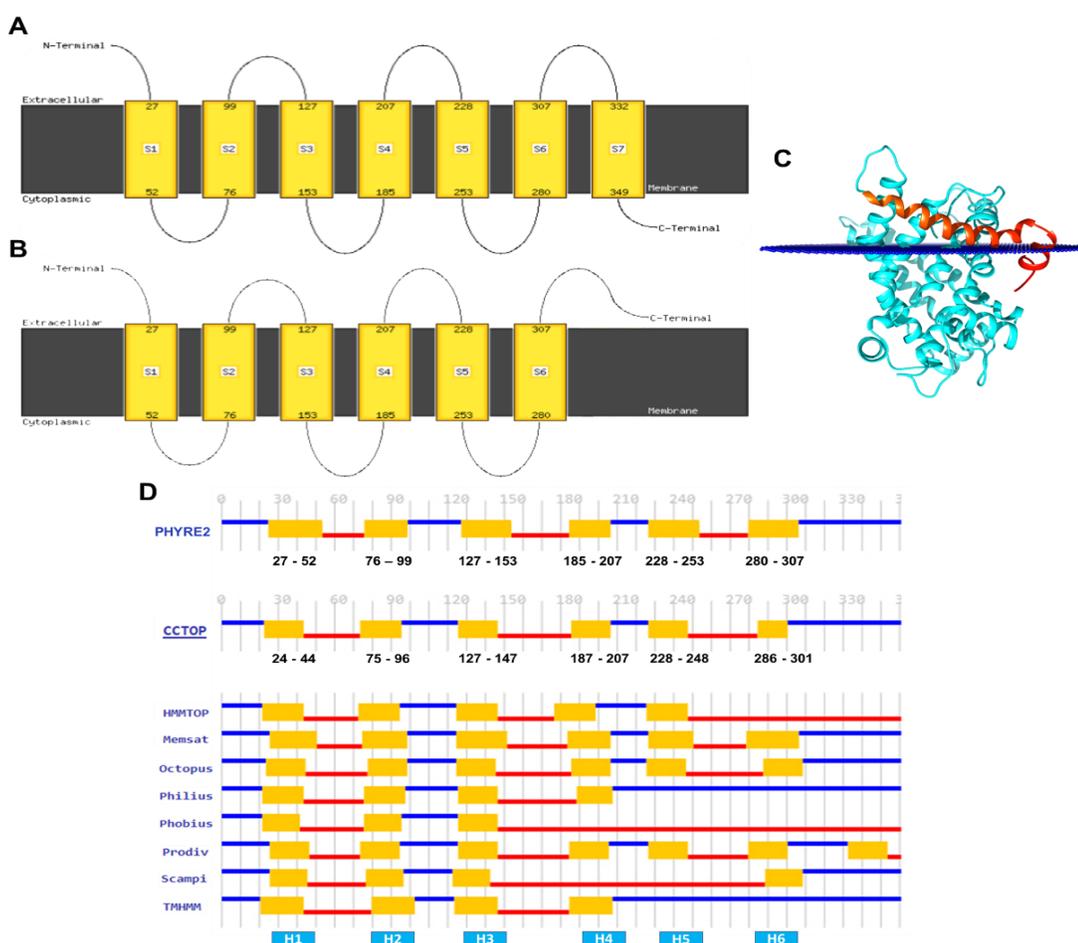
Servidor		GlycoEP	NetOGlyc-4.0	NetNGlyc 1.0
Glicosilación	Residuo	Posición	Posición	Posición
N-Glicosilación	Asn	10, 221 y 343	10	-
O-Glicosilación	Thr	2, 135, 137, 139, 142, 240, 323, 328, 331 y 346	-	-
	Ser	4, 6, 329, 330, 332 y 345	-	4, 6, 7, 8, 12, 13, 330
C-Glicosilación	Trp	-	-	-

Al comparar la topología predicha por PHYRE2 con el modelo de estructura terciaria obtenido mediante el servidor ROBETTA, se identificó que posiblemente la séptima hélice, se encuentre localizada hacia la cara externa (**Figura 7-11C**). De esta manera, al modificar el modelo de topología obtenido en un estudio previo de nuestro grupo para ajustarlo a los resultado obtenidos por ROBETTA, ambos extremos N- y C-Terminal se encontrarían ubicados en la region externa y el candidato presentaría 6 regiones transmembranales (**Figura 7-11B**), características típicas de los miembros de la familia de transportadores mitocondriales (como se muestra más adelante), dominio

identificado previamente de manera *in silico* para el candidato. Estos resultados concuerdan con la comparación realizada por el servidor CCTOP (Constrained Consensus TOPology prediction server) de los perfiles de hidrofobicidad predichos con varios algoritmos (HMMTOP, Memsat, Octopus, Philius, Phobius, Prodiv, Scampi y TMMHM)⁷⁶, con el cual también se obtuvo un consenso de 6 hélices α transmembranales en coordenadas muy similares para el candidato (**Figura 7-11D**).

Figura 7-11. Predicción de la topología del candidato *LbTNTA* mediante PHYRE2 y CCTOP.

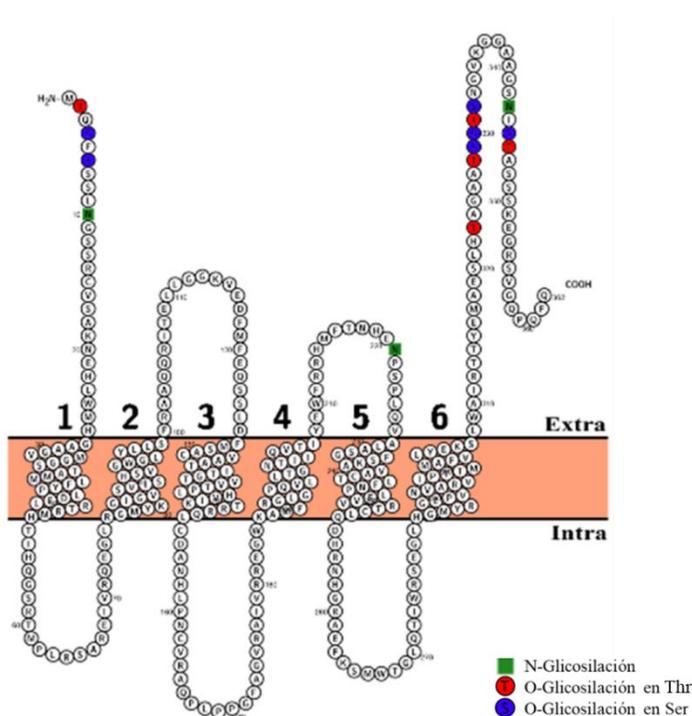
A. Modelo de topología predicho para *LbTNTA* mediante PHYRE2 previamente; **B.** Modelo de topología adaptado para el candidato teniendo en cuenta a **C.** Modelo de estructura terciaria predicho mediante ROBETTA por *ab initio*, visualización en UCSF-Chimera v 1.10.2 y **D.** Consenso de regiones transmembranales a partir de diferentes algoritmos con el servidor CCTOP para *LbTNTA*. En **C** se muestra la séptima hélice α en rojo y en azul oscuro el lado externo del espacio correspondiente a la membrana.



De acuerdo con las glicosilaciones predichas y la topología adaptada para el candidato, los sitios con mayor potencial de ser blanco de glicosilación son T2, S4, S6, N10, N221, T323, T328, S329, S330, T331, S332, N343, S345 y T346, ubicados en la cara externa de la membrana, siendo 3 sitios para

N-Glicosilación y 11 para O-Glicosilación, localizados principalmente en los extremos N- y C-Terminal (**Figura 7-12**). Sin embargo, se debe tener en cuenta que al encontrarse en posiciones próximas entre sí es muy probable que el candidato no las presente en su totalidad.

Figura 7-12. Localización de las O- y N-glicosilaciones predichas para *LbTNTA* mediante el servidor GlycoEP. Se muestran los sitios potenciales de glicosilación sobre *LbTNTA* teniendo en cuenta las regiones externas predichas en el modelo de topología generado mediante PROTEUS y adaptado para una mejor visualización.

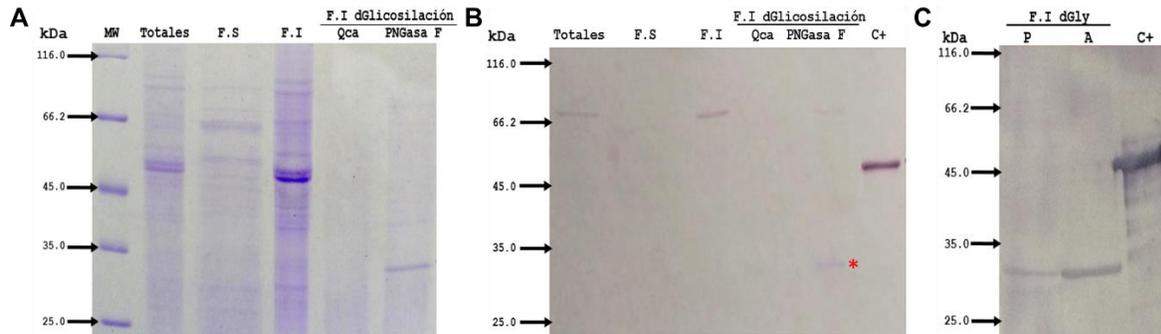


Para comprobar estos resultados a nivel experimental, se decidió evaluar la presencia de N-Glicosilaciones, teniendo en cuenta que este tipo de glicosilación adiciona carbohidratos de mayor complejidad y tamaño que las O-Glicosilaciones lo que podría explicar la diferencia entre el tamaño predicho y el obtenido para el candidato endógeno (40 kDa aproximadamente). Para esto, se utilizaron dos enfoques metodológicos sobre la fracción insoluble de extractos proteicos de promastigotes de *L. braziliensis*. El primero consistió en un tratamiento químico con HCl el cual no es específico y remueve tanto N- como O-glicosilaciones y el segundo, un tratamiento enzimático no denaturante con la enzima PNGasa F específica para N-Glicosilaciones simples y complejas (**Figura 7-13A-B**). Estos resultados demostraron que el tratamiento térmico conlleva a la

degradación del extracto proteico, mientras que con el tratamiento enzimático fue posible identificar un perfil proteico diferencial en comparación con el no desglicosilado (**Figura 7-13A**).

Al evaluar los extractos de promastigotes mediante western blot se comprobó el reconocimiento únicamente de la banda de ≈ 79.51 kDa en proteínas totales, fracción insoluble y en el tratamiento de desglicosilación enzimática. Adicionalmente, se identificó una banda de ≈ 30.07 kDa únicamente en el tratamiento con la PNGasa F (**Figura 7-13B**), al igual que en el tratamiento con esta glicosidasa sobre la fracción insoluble de amastigotes axénicos (**Figura 7-13C**). La proteína detectada se encuentra ≈ 9.76 kDa por debajo del peso esperado para el candidato sin glicosilaciones (≈ 39.83 kDa), sin embargo, esto era de esperarse ya que se ha comprobado que la hidrofobicidad de una proteína disminuye su interacción con el SDS en geles SDS-PAGE y por consiguiente su completa denaturación, prevaleciendo su estructura nativa compacta; en este caso al ser un candidato a proteína transmembranal presenta una alta hidrofobicidad, por lo que su movilidad electroforética aumenta, mostrando un peso aparentemente menor que no es debido a degradación como se ha demostrado para otras proteínas de membrana^{38,69} e incluso para la proteína recombinante Trx-*LbTNTA* como se mencionó anteriormente (**7.1.1**). Por otra parte, la presencia de la doble banda de ≈ 79.51 y ≈ 30.07 kDa en la fracción insoluble desglicosilada de promastigotes (**Figura 7-13B**), se debió a un tratamiento parcial con la PNGasa F como se demuestra en **Figura 7-13C** en donde se detecta únicamente la banda de menor tamaño.

Figura 7-13. Evaluación de glicosilaciones presentes en el candidato *LbTNTA* endógeno. A. Para el estadio promastigote se obtuvieron las fracciones soluble (F.S) e insoluble (F.I), la cual fue sometida a desglicosilación química con HCl y enzimática con la N-glicosidasa PNGasa F. B. Inmunodetección del candidato endógeno en promastigotes con α -Trx-*LbTNTA* purificado (1:100) sobre las fracciones obtenidas. C+, control positivo Trx-*LbTNTA* y C. Inmunodetección del candidato endógeno en promastigotes (P) y amastigotes axénicos (A) con α -Trx-*LbTNTA* purificado (1:100) sobre la fracción insoluble. C+, control positivo Trx-*LbTNTA*. A. SDS-PAGE al 12% (p/v), tinción azul de Coomassie R250. B y C. Western blot revelado por el sistema biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina. El asterisco muestra al candidato desglicosilado en promastigotes de *L. braziliensis*. MW, Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker.



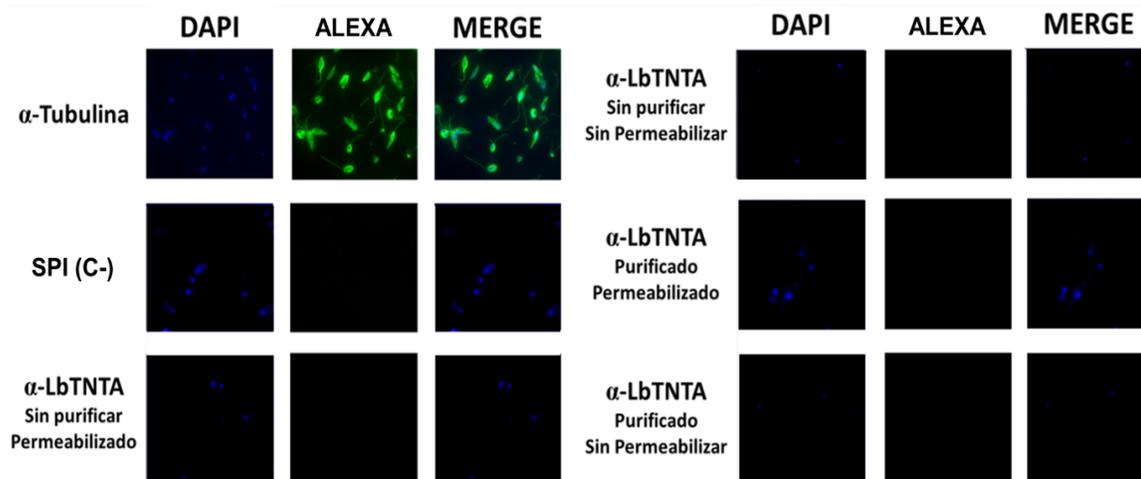
De esta manera se comprobó que la herramienta inmunológica desarrollada permitió la identificación de *LbTNTA* endógeno en ambos estadios de *L. braziliensis*, asimismo se comprobó la presencia de N-glicosilaciones sobre el candidato, las cuales ocasionan una alteración en su movilidad electroforética en SDS-PAGE. De acuerdo con esto, el candidato glicosilado se detecta con un tamaño de ≈ 79.51 kDa y su forma desglicosilada con ≈ 30.07 kDa, lo que daría lugar a la adición de una o múltiples cadenas de oligosacáridos de aproximadamente ≈ 49.44 kDa en ambos estadios del parásito. Asimismo, se considera que la banda de ≈ 30.07 kDa no es producto proteolítico de *LbTNTA* correspondiente a la eliminación un péptido señal, ya que el candidato presenta los elementos estructurales requeridos para su importación hacia la mitocondria, como se ha reportado para la mayor parte de los miembros de la familia de transportadores mitocondriales, como lo son los motivos METS (Px[DE]xx[KR]) localizados en las hélices impares que posiblemente interactúan con la maquinaria de importación, así como la presencia del tercer motivo METS (presente en H5), que para algunos miembros de la MCF, se encarga de la correcta inserción de la proteína en la membrana interna mitocondrial, posterior a la síntesis de esta proteína en el citoplasma.

7.2.2. Localización sub-celular del candidato *LbTNTA* en *L. braziliensis*

A partir de los anticuerpos α -Trx-*LbTNTA* producidos en el modelo aviar se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia sobre promastigotes de *L. braziliensis*. En un primer ensayo se utilizaron tanto el suero sin purificar como los anticuerpos purificados mediante afinidad al antígeno en la misma dilución de trabajo que en western blot (1:100); estos anticuerpos se utilizaron en condiciones de permeabilización de la membrana de los parásitos con acetona y sin realizar este proceso (**Figura 7-14**) con el objetivo de mejorar la detección de la proteína si esta se encontrara localizada en la

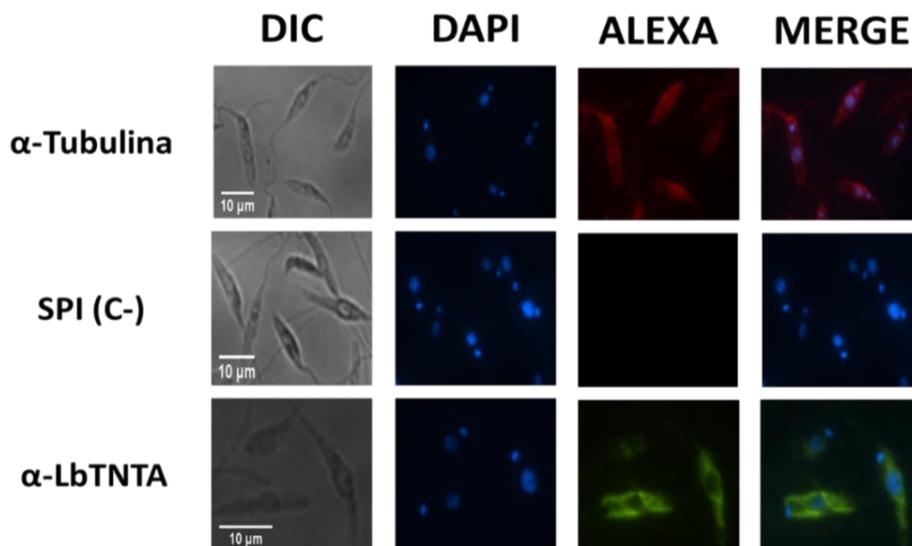
membrana citoplasmática, a pesar de esto no se logró identificar la proteína bajo ninguna de las condiciones evaluadas para este ensayo.

Figura 7-14. Inmunolocalización de *LbTNTA* endógeno en promastigotes de *Leishmania braziliensis* con α -Trx-*LbTNTA* 1:100. Microscopía de fluorescencia para *LbTNTA*. Se utilizó tanto el tercer suero sin purificar como los anticuerpos α -Trx-*LbTNTA* purificados (1:100) en condiciones de permeación y sin esta. Como control positivo se utilizó α -tubulina (verde) y como control negativo el suero pre inmune (SPI), los núcleos se tiñeron con DAPI (1 mg/mL) (azul). Se utilizó el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1. Objetivo 60x.



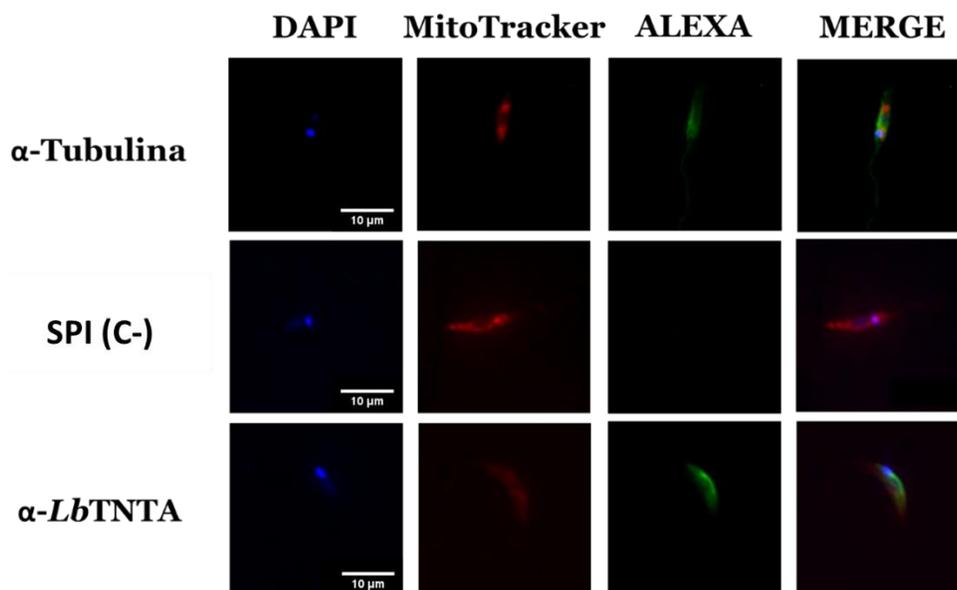
Teniendo en cuenta estos resultados y con el propósito de optimizar el reconocimiento del candidato, se llevó a cabo un protocolo de permeabilización con acetona como se ha demostrado para otras proteínas de membrana⁶⁹. Adicionalmente se decidió disminuir el factor de dilución del anticuerpo primario a 1:10 en un nuevo ensayo de inmunofluorescencia sobre promastigotes (**Figura 7-15**), en el cual se detectó la proteína endógena salvo en las regiones correspondientes al núcleo y el kinetoplasto, por lo tanto, se descartó la hipótesis de que el candidato se encuentra en las membranas de estos organelos para este estadio del parásito. Por otra parte, se observan agregados que pueden corresponder con el tráfico vesicular por organelos como el RE y el aparato de Golgi, de la misma manera, al comparar con la imagen de luz, se identificó que la detección no corresponde con toda la célula, como se observa en la región apical y del flagelo, por lo que se descarta también su localización en el citoplasma, pero no en la membrana citoplasmática, ya que el candidato podría estar sujeto a dominios específicos a lo largo de la membrana, ni tampoco se descarta en otros organelos como el glicosoma o la mitocondria.

Figura 7-15. Immunolocalización de *LbTNTA* endógeno en promastigotes de *Leishmania braziliensis* con α -Trx-*LbTNTA* purificados 1:10. Microscopía de fluorescencia para *LbTNTA*. Se utilizaron los anticuerpos α -Trx-*LbTNTA* purificados (1:10) en condiciones de permeación. Como control positivo se utilizó α -tubulina (rojo) y como control negativo el suero pre inmune (SPI), los núcleos se tiñeron con DAPI (1 mg/mL) (azul). Se utilizó el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1. Objetivo 60x.



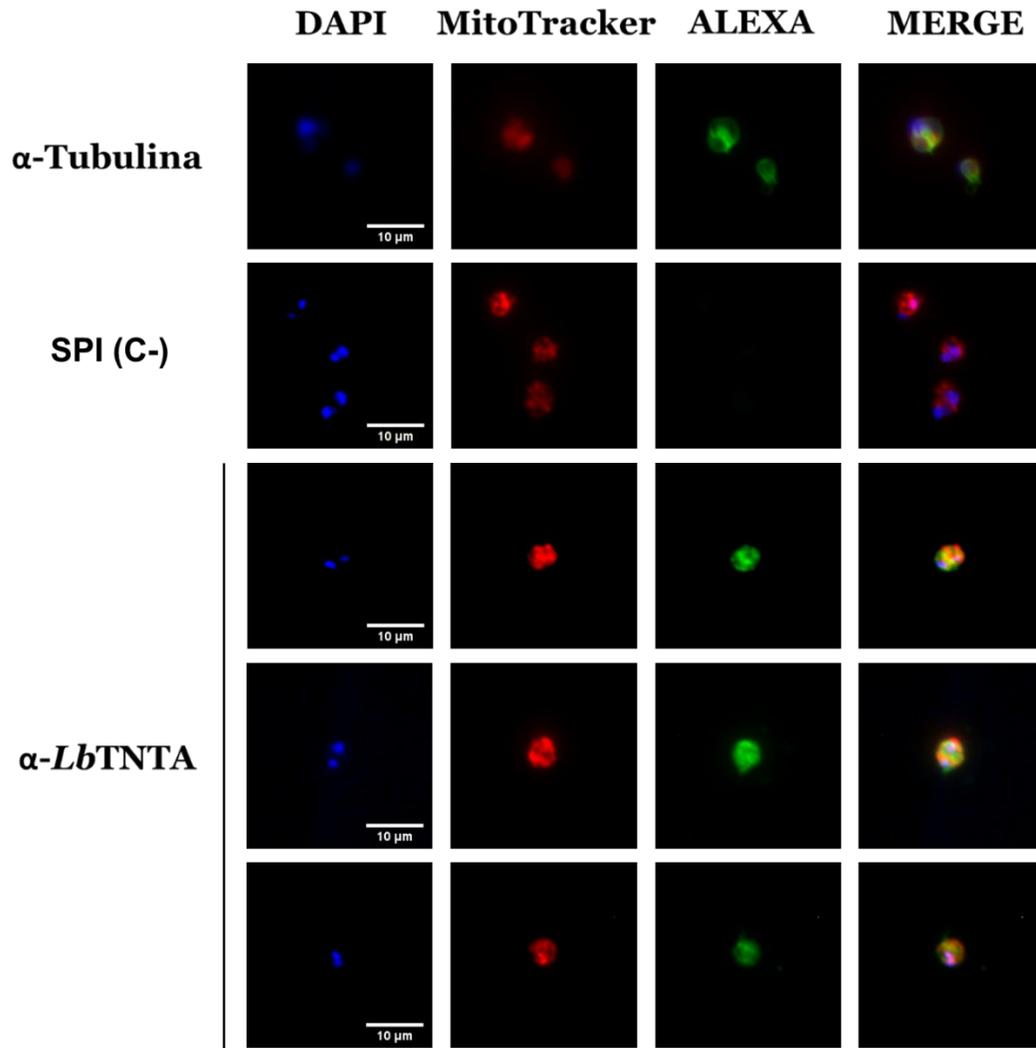
Debido a que se descartó la localización de *LbTNTA* en las membranas nuclear y del kinetoplasto y en citoplasma y a que en un estudio previo de nuestro grupo de investigación se realizó la predicción de su localización sub-celular en la membrana del peroxisoma o de la mitocondria³, organelos que poseen membranas poco permeables y que requieren de transportadores específicos, se llevó a cabo un ensayo de co-localización en promastigotes con la sonda mitocondrial MitoTracker Red CMXRos (ThermoFisher) (**Figura 7-16**) la cual se une específicamente a este organelo debido a su potencial de membrana *in vivo*. Este ensayo permitió evidenciar que *LbTNTA* no presenta una co-localización con la mitocondria en el estadio promastigote.

Figura 7-16. Ensayo de co-localización en mitocondria para *LbTNTA* endógeno en promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Microscopía de fluorescencia para *LbTNTA*. Se utilizaron los anticuerpos α -Trx-*LbTNTA* purificados (1:10) en condiciones de permeación. Como control positivo se utilizó α -tubulina (verde) y como control negativo el suero pre inmune (SPI), los núcleos se tiñeron con DAPI (1 mg/mL) (azul). Las mitocondrias fueron teñidas con la sonda MitoTracker Red CMXRos 1 μ M (rojo). Se utilizó el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1. Objetivo 60x.



Teniendo en cuenta esta información y que algunos miembros de la familia de transportadores mitocondriales no solamente se localizan en la membrana interna mitocondrial sino que también en la membrana de peroxisoma^{77,78}, cloroplasto⁷⁹ e incluso que, para el caso específico de tripanosomátidos como *Trypanosoma brucei*, pueden presentar una localización diferencial en la membrana de mitocondria o glicosoma de acuerdo al estadio en el cual se encuentra el parásito⁸⁰, se procedió a realizar un ensayo de inmunofluorescencia para *LbTNTA* en amastigotes axénicos de *L. braziliensis* con la sonda MitoTracker Red CMXRos (ThermoFisher) y bajo las mismas condiciones que con los promastigotes (**Figura 7-17**). Con este ensayo se identificó que en el estadio amastigote existe una co-localización mitocondrial parcial de *LbTNTA* (coloración amarilla debida a la superposición entre el verde y el rojo).

Figura 7-17. Ensayo de co-localización en mitocondria para *LbTNTA* endógeno en amastigotes axénicos de *Leishmania braziliensis*. Microscopía de fluorescencia para *LbTNTA*. Se utilizaron los anticuerpos α -Trx-*LbTNTA* purificados (1:10) en condiciones de permeación. Como control positivo se utilizó α -tubulina (verde) y como control negativo el suero pre inmune (SPI), los núcleos se tiñeron con DAPI (1 mg/mL) (azul). Las mitocondrias fueron teñidas con la sonda MitoTracker Red CMXRos 1 μ M (rojo). Se utilizó el microscopio Nikon Eclipse C1 Plus y el Software EZ-C1. Objetivo 60x.



De acuerdo con esto, se determinó una localización sub-celular diferencial para *LbTNTA* en ambos estadios de *L. braziliensis* (**Figura 7-16 y 7-17**), esto concuerda, con lo que se ha reportado para el transportador MCP6 de *T. brucei*, un miembro de la MCF para el cual no se ha establecido su funcionalidad, sin embargo, se determinó que, en la forma presente en el vector, el transportador es predominantemente mitocondrial, mientras que, en la forma presente en el torrente sanguíneo, es principalmente glicosomal⁸⁰. Para el caso de *LbTNTA*, se observó una localización parcialmente mitocondrial en la forma intracelular (amastigote axénico) y señales adicionales que pueden corresponder al tránsito de la proteína por el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, en donde es modificada y translocada hacia la mitocondrial. A nivel funcional, existen diferencias significativas en la bioenergética de la mitocondria de amastigotes en comparación con promastigotes⁸¹, de esta manera, los amastigotes dependen principalmente del ciclo de los ácidos

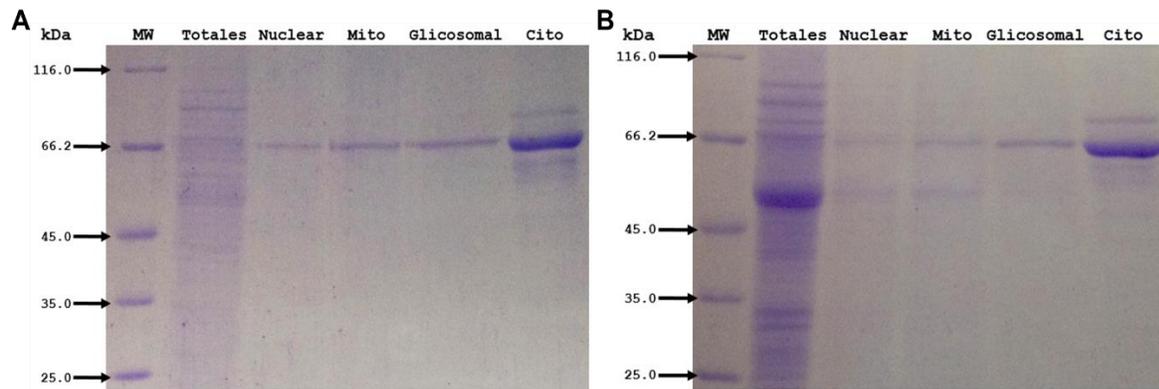
tricarboxílicos y la respiración mitocondrial para la obtención de energía en lugar de la glucólisis⁸². Teniendo en cuenta que la principal fuente de carbono en este estadio son aminoácidos, los cuales son convertidos en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en donde el NAD⁺ es requerido para la transferencia de electrones y posterior producción de energía mediante la fosforilación oxidativa, *LbTNTA* posiblemente tiene el rol de abastecer de NAD⁺ a la matriz mitocondrial para que ocurran estos procesos. Como fuente adicional para la obtención de energía, los amastigotes pueden usar, en una menor proporción, ácidos grasos, los cuales son metabolizados en el glicosoma mediante la β -oxidación, sin embargo, el producto final de su metabolismo, el acetyl-CoA, es oxidado en la mitocondria.

Por su parte, no se logró determinar la localización de *LbTNTA* en promastigotes, sin embargo, teniendo en cuenta la localización diferencial del transportador MCP6 de *T. brucei*, es posible que en *L. braziliensis*, *LbTNTA* presente una localización glicosomal para el estadio extracelular. Teniendo en cuenta que en este estadio la mayor fuente de carbono es la glucosa y por consiguiente su supervivencia depende principalmente de la glucólisis⁸³, vía que se lleva a cabo en el glicosoma, es posible que *LbTNTA* aporte el NAD⁺ necesario para el metabolismo de la glucosa y la producción de energía mediante la obtención de diferentes productos como el glicerol y el piruvato⁸⁴. A su vez y como sea reportado para otros transportadores de NAD^{79,85,86}, es posible que *LbTNTA* lleve a cabo un antiporte de NAD⁺ con ADP, el cual es producido al interior del glicosoma en la glucólisis. Adicionalmente, cabe resaltar que el glicosoma es un organelo funcionalmente muy diverso, asimismo, esta funcionalidad, varía dependiendo del estadio en el que se encuentra el parásito. Por ejemplo, al ser la glucólisis la principal fuente de energía en promastigotes, las enzimas de esta vía metabólica tendrán una tasa de traducción mayor frente a las de las demás rutas; por el contrario, en amastigotes, los ácidos grasos hacen parte de la principal fuente de energía, por consiguiente la mayor tasa de traducción corresponderá para la enzimas de la β -oxidación⁸⁴.

Para corroborar estos resultados, se llevó a cabo fraccionamiento celular de amastigotes axénicos y promastigotes de *L. braziliensis*, de esta manera se estandarizó una metodología con la que se obtuvieron las fracciones nuclear, de membrana citoplasmática y mitocondria, glicosomal y citosólica (**Figura 7-18**). De esta manera se pretendió distinguir entre las proteínas presentes en la fracción mitocondrial de las de la fracción glicosomal. A la fecha se realizan ensayos de inmunodetección sobre estos extractos celulares.

Figura 7-18. Fraccionamiento celular de amastigotes axénicos y promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Fracciones proteicas obtenias a partir del fraccionamiento celular de amastigotes axénicos (A) y

promastigotes (**B**) de *L. braziliensis*. Se obtuvieron la fracción nuclear, mitocondrial y membrana citoplasmática (Mito), glicosomal y citosólica (Cito). SDS-PAGE al 12% (p/v), tinción azul de Coomassie R250. **MW**, Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker.

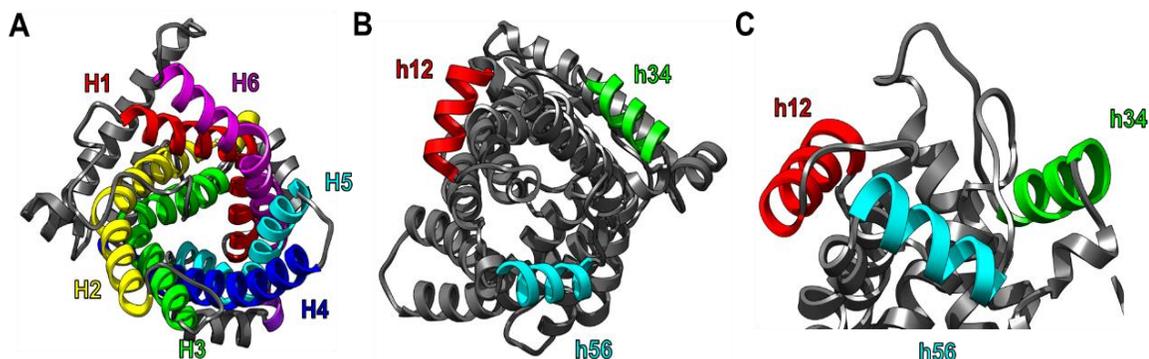


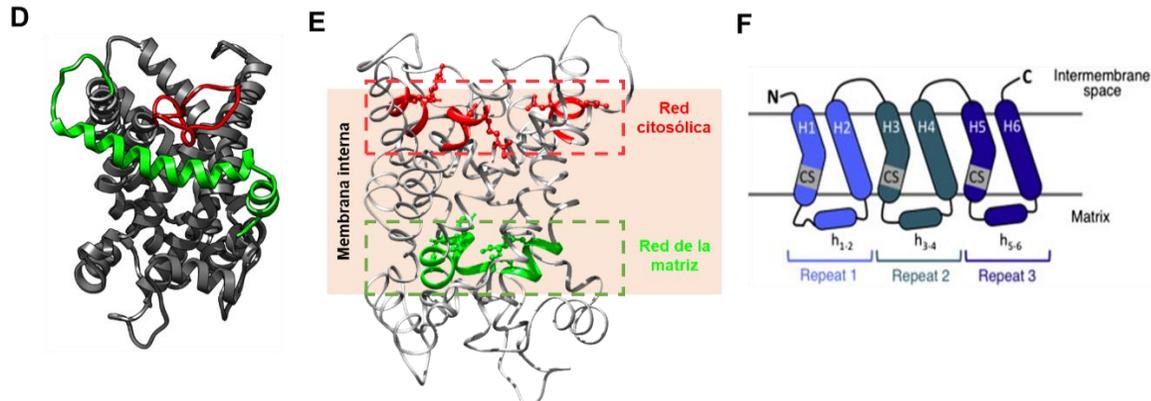
CAPÍTULO II: EVALUACIÓN FUNCIONAL DE *Lb*TNTA

Para el estudio funcional de *Lb*TNTA, es necesario tener en cuenta algunas consideraciones a nivel estructural, de esta manera, el candidato presenta las características típicas de los miembros de la familia de transportadores mitocondriales (MCF), dominio identificado previamente *in silico*. La principal característica de la secuencia primaria es la presencia de tres repeticiones en tándem de ≈ 100 aminoácidos con variaciones en su hidrofobicidad, cada una de las cuales se pliega dando lugar a dos hélices α , con giros aleatorios entre ellas, de esta manera, el dominio consta de 6 hélices que se disponen espacialmente en forma de canal con la cavidad central abierta hacia la cara externa de la membrana y cerrada hacia la cara interna (Figura 7-19A). Adicionalmente, presenta 3 hélices α cortas hacia la cara interna (h12, h34 y h56 en Figura 7-19B-C), las cuales se ubican sobre la superficie de la membrana, mientras que los extremos N- y C-terminal se encuentran ubicados hacia la cara externa^{87,88} (Figura 7-19D).

Figura 7-19. Representación de las principales características estructurales de la MCF sobre el modelo de estructura terciaria de *Lb*TNTA.

A. Visualización de las 6 hélices transmembranales en rojo H1, amarillo H2, verde H3, azul H4, cian H5 y púrpura H6. **B. y C.** Hélices α cortas en rojo h12, verde h34 y cian h56 señaladas sobre la cara interna de la membrana. **D.** Los extremos N-Terminal (rojo) y C-Terminal (verde) ubicados hacia la cara externa de la membrana. **E.** Localización de los motivos Px[DE]xx[KR] (METS o CS) de las hélices impares los cuales forman la red de la matriz o de la cara interna de la membrana (en verde) y los motivos [YF][DE]xx[KR] de las hélices pares correspondientes con la red citosólica o de la cara externa de la membrana (en rojo) y **F.** Modelo de topología en el cual se muestran las 3 repeticiones, hélices transmembranales (H1-H6), hélices cortas (h12, h34 y h56), así como la posición de los motivos SC o METS propuesto para todos los miembros de la familia de transportadores mitocondriales (MCF) tomado de Ferramosca, A. y Zara, V.⁸⁹. Imágenes generadas mediante UCSF-Chimera v 1.10.2.

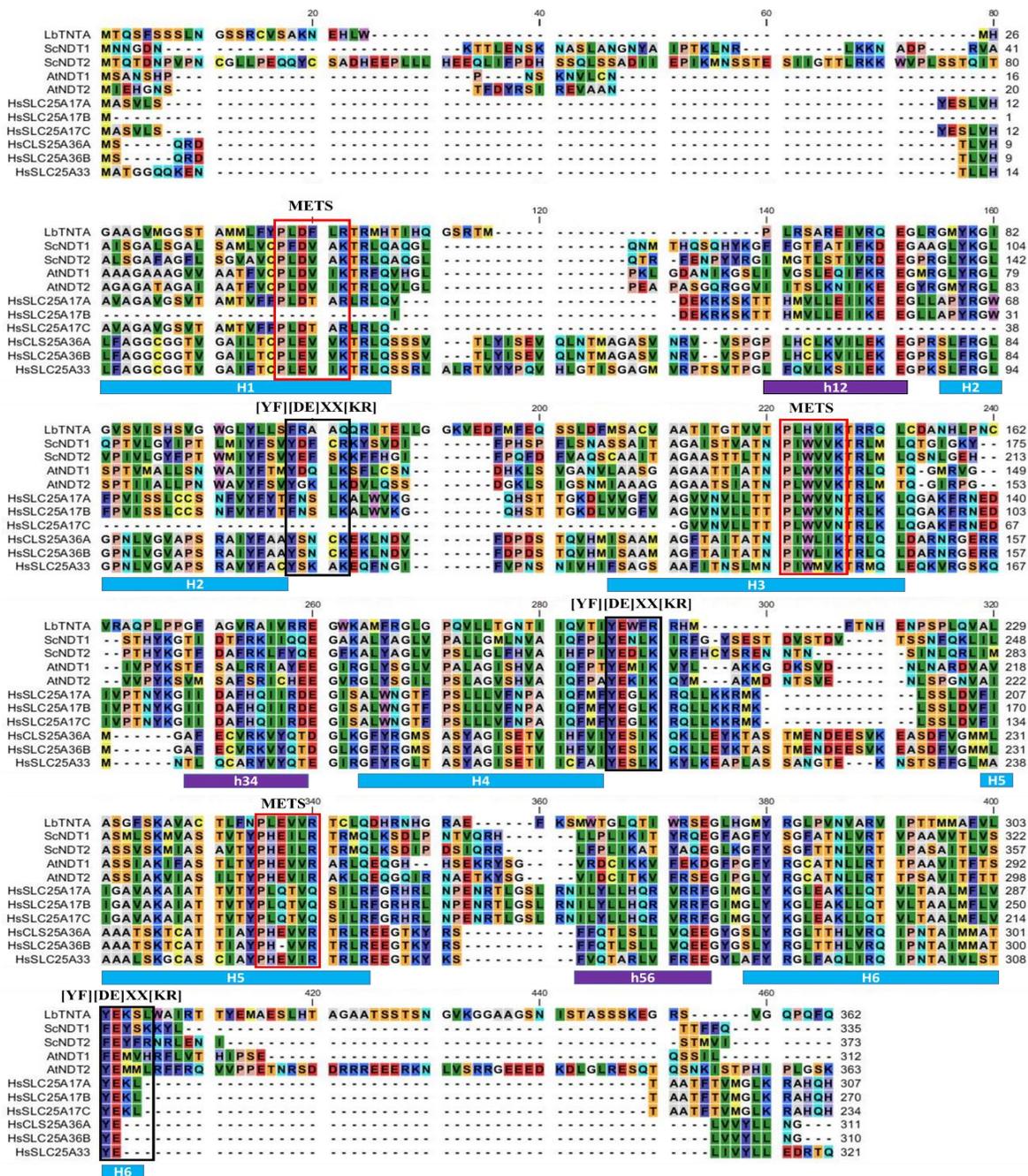




Cada hélice impar (H1, H3 y H5) posee el motivo *mitochondrial energy transfer signature* (METS) también denominado *carrier signature* (CS) compuesto por Px[DE]xx[KR] hacia la cara interna de la membrana, relacionado con la actividad transportadora. Los aminoácidos cargados dentro de este motivo, forman puentes salinos (red de la matriz), los cuales mantiene cerrada la cavidad central. De manera análoga se ha identificado el motivo [YF][DE]xx[KR] en las hélices pares (H2, H4 y H6) hacia la cara externa de la membrana, cuyos residuos cargados también forman puentes salinos (red citosólica) como en el motivo METS. Ambas redes fueron identificadas *in silico* en la estructura primaria del candidato al realizar un alineamiento múltiple mediante CLC Sequence Viewer 8.0 con otros transportadores de nucleótidos evaluados experimentalmente (**Figura 7-20**) y su posición, al ser comparada con la estructura secundaria predicha y con el modelo de estructura terciaria obtenido mediante ROBBETA (**Figura 7-19E**), concuerdan con lo establecido para otros miembros de esta familia como se muestra en el modelo **Figura 7-19F**⁸⁹.

Figura 7-20. Representación de las principales características estructurales de la familia de transportadores mitocondriales sobre el modelo de estructura primaria de *LbTNTA*.

Alineamiento múltiple entre el candidato seleccionado para *L. braziliensis* *LbTNTA* con algunos miembros de la familia de transportadores mitocondriales como los de *Saccharomyces cerevisiae* *ScNDT1* y *ScNDT2*, de *Arabidopsis thaliana* *AtNDT1* y *AtNDT2* y los de *Homo sapiens* *HsSLC25A36A*, *HsSLC25A36B*, *HsSLC25A33*, *HsSLC25A17A*, *HsSLC25A17B* y *HsSLC25A17C* con. En el recuadro rojo se muestran los motivos Px[DE]xx[KR] (METS o CS) presentes en las hélices impares y en los recuadros negros los motivos [YF][DE]xx[KR] de las hélices pares. En la parte inferior del alineamiento se muestran las hélices predichas para el candidato de acuerdo con el modelo de estructura secundaria. CLC Sequence Viewer 8.0.



7.3. Evaluación de la capacidad transportadora del candidato *LbTNTA*

La capacidad transportadora de *LbTNTA* se evaluó mediante la complementación de cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en el transporte de NAD⁺. Adicionalmente, se abordaron dos enfoques, los cuales consisten en la reconstitución en liposomas mediada por detergentes y la expresión del candidato recombinante en membranas de *E. coli*. Estas metodologías han sido ampliamente utilizadas, teniendo en cuenta que estudios funcionales y estructurales de proteínas transportadoras han demostrado la importancia del ambiente de membrana en su funcionamiento, ya que sus interacciones favorecen el plegamiento e interacción con ligandos. Asimismo, estos acercamientos han sido utilizados para el estudio de transportadores de la MCF. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los enfoques y su análisis correspondiente.

7.3.1. Evaluación de la capacidad transportadora mediante complementación en *Saccharomyces cerevisiae*.

El modelo eucariota de levadura presenta varias ventajas para la producción y evaluación estructural y funcional de proteínas de membrana provenientes de organismos eucariotas frente a modelos procariontes como *E. coli*. Debido a sus características, comercialmente se encuentran disponibles levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica*, las cuales son ampliamente usadas en el estudio de proteínas transmembranales de eucariotas. Las levaduras, al ser eucariotas, presentan la maquinaria necesaria para la modificación post-traducciona de este tipo de proteínas y su tránsito a membrana. Adicionalmente, al ser un organismo unicelular facilita su manipulación en el laboratorio. Actualmente se conoce un gran número de proteínas transmembranales recombinantes producidas en este modelo, que han permitido la elucidación de su estructura terciaria (acuoporina humana 2, canal TRAAK humano, leucotrieno C4 sintasa humana, glicoproteína-P algal y su homólogo de ratón y el transportador de nitrato NRT1.1 de *Arabidopsis thaliana*, entre otros)⁹⁰. De igual manera mediante este modelo han sido evaluados funcionalmente algunos miembros de la familia de los transportadores mitocondriales como el transportador cloroplastico *AtNDT1* y el mitocondrial *AtNDT2* de *Arabidopsis thaliana*⁷⁹, los transportadores mitocondriales SLC25A33 y SLC25A36 de

*Homo sapiens*³⁰, los transportadores mitocondriales Rim-2⁸⁹, ScNDT1 y ScNDT2²⁷ de *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros.

El uso de cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* se basa en la ortología de genes y en su consecuente conservación funcional en eucariotas, de esta manera, es posible llevar a cabo ensayos en donde un organismo que, previamente ha sido modificado genéticamente para presentar una deficiencia en un proceso específico y por consiguiente una variación en su fenotipo (morfología, velocidad de crecimiento, etc.), se complementa con la información genética de uno de sus ortólogos, en este caso el gen de interés. De esta manera si se observa un reestablecimiento del fenotipo silvestre es posible evaluar la funcionalidad de diversas proteínas. En la actualidad se encuentran disponibles un gran número de mutantes de *S. cerevisiae* en el centro de recursos EUROSCARF (<http://www.euroscarf.de/index.php?name=News>) ubicado en Frankfurt, Alemania.

De acuerdo con esta información se decidió utilizar la cepa BY4741 (MATa; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0, Y01398 en EUROCFARF), para la cual se ha reemplazado el gen del transportador NDT1 (YIL006w) por kanMX4. Teniendo en cuenta que esta sepa es autótrofa para histidina, leucina, metionina y uracilo se decidió utilizar el vector de expresión pYES2, especializado en la expresión de proteínas en levaduras, que confiere la capacidad de sintetizar uracilo como método de selección y el cual no otorga una etiqueta para el reconocimiento de la proteína. En este vector se llevó a cabo la clonación de la secuencia codificante de *LbTNTA* (1.089 pb) y adicionalmente la secuencia del transportador mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* AtNDT2 (1.093 pb, NM_102349.4 en NCBI), el cual se utilizó como control positivo para la evaluación funcional del candidato ya que previamente fue caracterizado como un transportador con afinidad para el NAD⁺.

7.3.1.1. Clonación de *LbTNTA* en pYES2

Teniendo en cuenta el sitio de múltiple clonación del vector pYES2 y la secuencia de *LbTNTA*, se escogieron dos enzimas de restricción que permitieran la inserción en sentido 5'–3' y en el marco de lectura de pYES2 y que a su vez, no tuvieran sitio de corte dentro de la secuencia del candidato, de esta manera se adicionó el sitio de corte para BamHI en el cebador directo y el de EcoRI en el cebador reverso (**Tabla 7-2**).

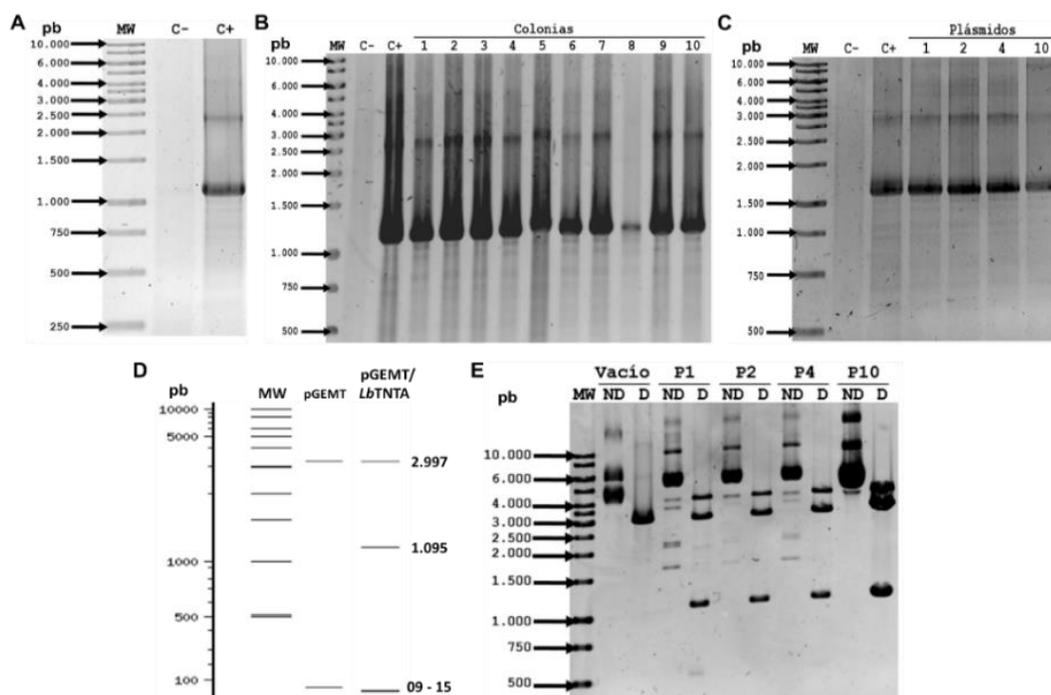
Tabla 7-2. Cebadores diseñados para la clonación de *LbTNTA* en el vector de levadura pYES2.

Se muestra la secuencia, longitud, temperatura de anillaje y porcentaje de GC para los cebadores diseñados. En amarillo se muestra el sitio de restricción de BamHI y en cian el de EcoRI.

CEBADOR	SECUENCIA (5'-3')	LONGITUD	Tm	%GC
DIRECTO	GGA.TCC.ATG.ACG.CAG.TCT.TTC	21 pb	62	52.4
REVERSO	GAA.TTC.CTA.CTG.GAA.CTG.AGG.C	22 pb	59	50.0

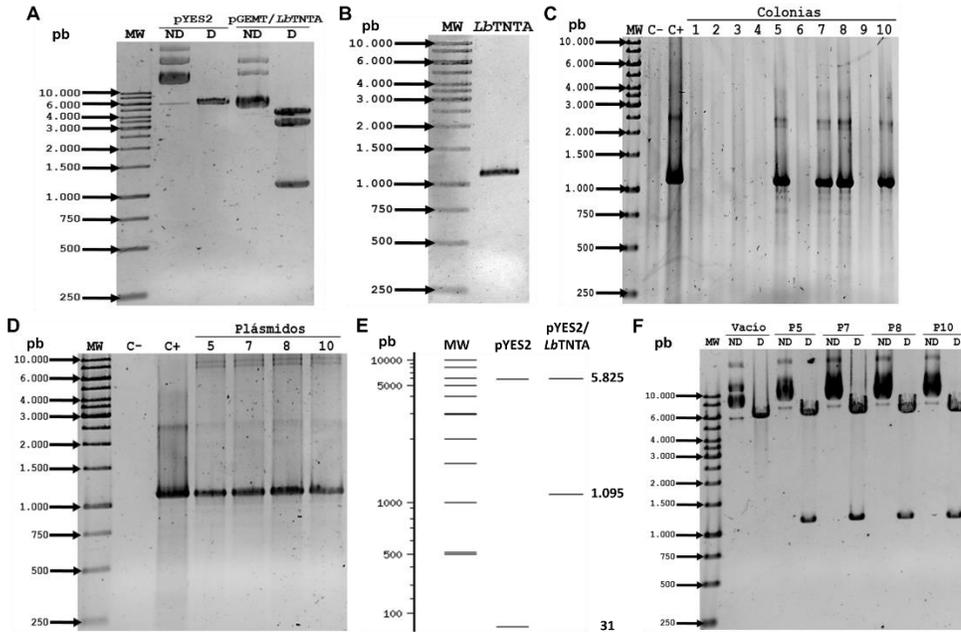
Para la clonación del candidato en el vector de levadura pYES2, fue necesario llevar a cabo un proceso de sub-clonación en el vector pGEMT-Easy, con el objetivo de garantizar una mayor eficiencia en el corte por parte de las enzimas de restricción seleccionadas. Para obtener el amplificado correspondiente (1.095 pb) se utilizó como plantilla el vector pBAD202/*LbTNTA* con un Tm = 57 °C (**Figura 7-21A**), cuyo producto de PCR fue purificado desde gel de agarosa (**6.3.1.2**), a continuación se llevó a cabo su ligación en pGEMT-Easy (6.3.1.3) y se transformó en células *E. coli* TOP10 (**6.1.1.2**). De las colonias obtenidas fueron evaluadas 10 mediante PCR (**Figura 7-21B**, **6.3.1.5**), identificándose la presencia del inserto en todas ellas, posteriormente, se extrajo ADN plasmídico de 5 de ellas y se evaluó por PCR (**6.3.1.5**), confirmándose la identidad de pGEMT/*LbTNTA* (**Figura 7-21C**). Finalmente, se evaluaron los plásmidos mediante restricción enzimática con BamHI y EcoRI (**6.3.1.6**) corroborando la presencia de *LbTNTA* (**Figura 7-21E**) por comparación con el perfil predicho para el vector recombinante (**Figura 7-21D**).

Figura 7-21. Sub-clonación de *LbTNTA* en pGEMT-Easy. Se muestra el proceso de sub-clonación de *LbTNTA* **A.** Amplificación de *LbTNTA* desde pBAD/*LbTNTA*. **B.** PCR de colonia. **C.** PCR de ADN plasmídico. **D.** Predicción del perfil de digestión enzimática con BamHI y EcoRI de pGEMT/*LbTNTA* y pGEMT-Easy vacío mediante NEB CUTTER 2.0 y **E.** Perfil de digestión enzimática con BamHI y EcoRI de ADN plasmídico. MW, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder. C-, control negativo, PCR sin plantilla. C+, control positivo PCR, amplificación desde pBAD/*LbTNTA*. ND, plásmidos sin digerir. **D.** plásmidos digeridos. Geles de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.



Una vez se comprobó que los plásmidos evaluados correspondían con pGEMT/*LbTNTA*, se procedió a liberar a *LbTNTA* mediante digestión enzimática con las enzimas BamHI y EcoRI (**Figura 7-22A**), el inserto fue purificado desde gel (**Figura 7-22B**), posteriormente este se ligó en el vector pYES2 (previamente digerido con las mismas enzimas, **Figura 7-22A**) y se transformó en células *E. coli* TOP10, de las colonias obtenidas fueron evaluadas 10 mediante PCR y se comprobó la presencia de *LbTNTA* en cuatro de ellas (**Figura 7-22C**). A continuación, se extrajo el ADN plasmídico (metodología) de las colonias positivas y se comprobó que correspondía con pYES2/*LbTNTA* mediante PCR (**Figura 7-22D**) y digestión enzimática con las enzimas BamHI y EcoRI (**F**) de acuerdo con el perfil de digestión predicho para el plásmido recombinante (**Figura 7-22E**). A partir de esto constructo se realizaron los ensayos de complementación como se muestra más adelante.

Figura 7-22. Clonación de *LbTNTA* en pYES2. Se muestra el proceso de clonación de *LbTNTA* en pYES2 **A.** Digestión enzimática con las enzimas BamHI y EcoRI para pGEMT/*LbTNTA* y pYES2 **B.** Inserto purificado (*LbTNTA*). **C.** PCR de colonia. **D.** PCR de ADN plasmídico. **E.** Digestión enzimática predicha con BamHI y EcoRI de pYES2/*LbTNTA* y pYES2 vacío mediante NEB CUTTER 2.0. **F.** Digestión enzimática con BamHI y EcoRI de ADN plasmídico. MW, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder. C-, control negativo, PCR sin plantilla. C+, control positivo PCR, amplificación desde pBAD/*LbTNTA*. ND, plásmidos sin digerir. D, plásmidos digeridos. Geles de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.



7.3.1.2. Clonación de *At*NDT2 en pYES2

Como se mencionó anteriormente se utilizó como control positivo para los ensayos de complementación al transportador de NAD⁺ de *Arabidopsis thaliana At*NDT2, para el cual se ha comprobado experimentalmente su capacidad transportadora mediante esta misma metodología. La secuencia codificante de este transportador tiene una longitud de 1.093 pb la cual se tuvo en cuenta al igual que el sitio de múltiple clonaje de pYES2 para el diseño de cebadores, con lo cual se determinó que la clonación podía llevarse a cabo adicionando los sitios de restricción de las mismas enzimas que para *Lb*TNTA, es decir, el sitio de corte para BamHI en el primer directo y el de EcoRI en el primer reverso (Tabla 7-3).

Tabla 7-3. Cebadores diseñados para la clonación de *At*NDT2 en el vector de levadura pYES2.

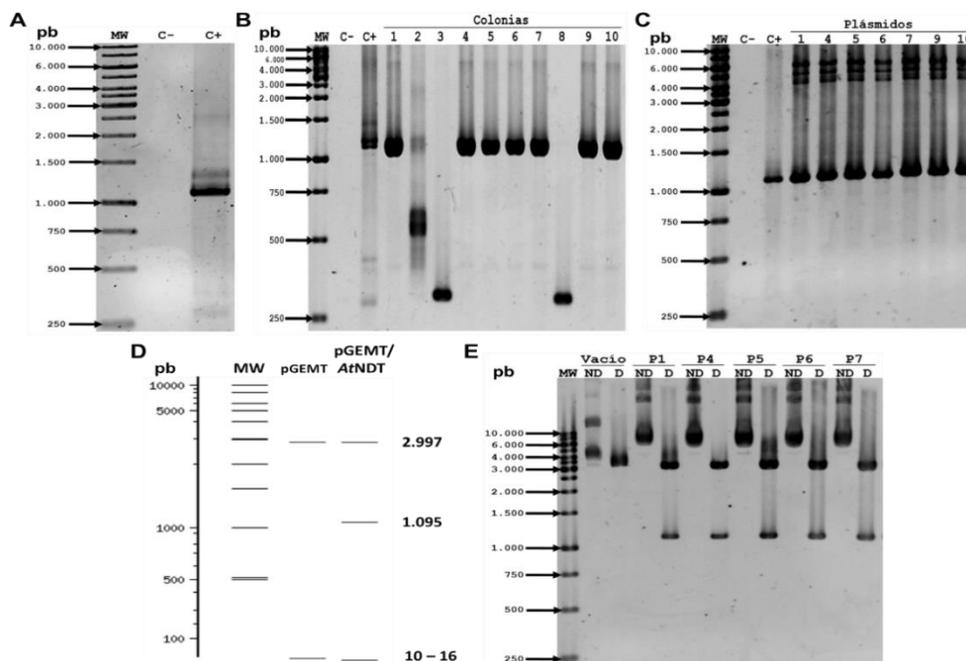
Se muestra la secuencia, longitud, temperatura de anillaje y porcentaje de GC para los cebadores diseñados. En amarillo se muestra el sitio de restricción de BamHI y en cian el de EcoRI.

CEBADOR	SECUENCIA (5'–3')	LONGITUD	T _m	%GC
DIRECTO	GGA.TCC.ATG.ATT.GAA.CAT.GGG	21 pb	62	48
REVERSO	GAA.TTC.TTA.TTT.GCT.TCC.AAG.AGG	24 pb	60	38

Se realizó la sub-clonación de *At*NDT2 en el vector pGEMT-Easy para asegurar el correcto corte de las enzimas de restricción, para ello se amplificó la secuencia codificante del transportador con un

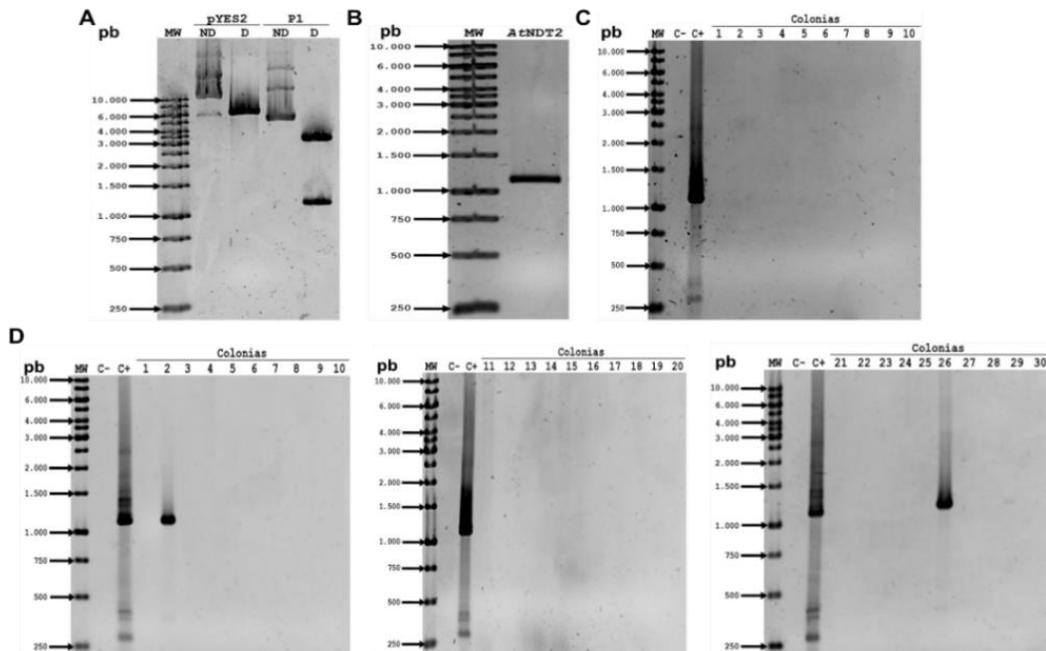
$T_m = 58\text{ }^\circ\text{C}$ a partir de cDNA (donado por el Doctor Camilo Lopez, departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá), teniendo en cuenta que este transportador posee 8 intrones. Después de múltiples intentos de ligación a partir de este amplificado no se obtuvieron resultados positivos, por lo tanto, se decidió optimizar la temperatura de anillaje de la amplificación. De esta manera se determinó que con una temperatura de anillamiento de $60\text{ }^\circ\text{C}$ se obtiene una mejor amplificación (**Figura 7-23A**). El amplificado se purificó desde gel de agarosa y se utilizó para llevar a cabo la ligación en el vector pGEMT-Easy y el producto fue transformado en células *E. coli* TOP10, de las colonias que crecieron se seleccionaron 10, las cuales fueron analizadas por PCR para las que se obtuvo un amplificado correspondiente con *At*NDT2 en 7 de ellas (**Figura 7-23B**), de esta manera se procedió a extraer el ADN plasmídico de estas y se analizó mediante PCR observando un resultado positivo para todas ellas (**Figura 7-23C**). Adicionalmente los plásmidos fueron evaluados por digestión enzimática con BamHI y EcoRI, con lo que se comprobó la presencia de *At*NDT2 en todos ellos (**Figura 7-23E**) de acuerdo con el perfil de digestión predicho (**Figura 7-23D**).

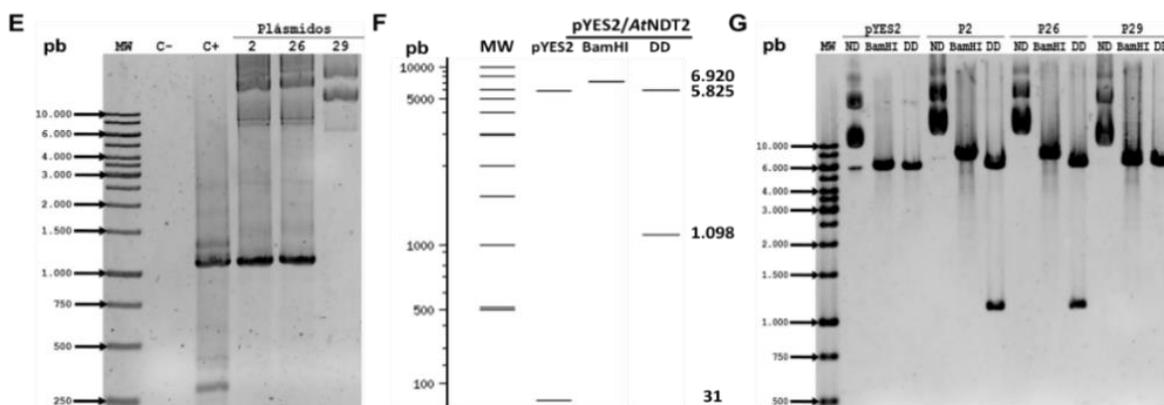
Figura 7-23. Sub-clonación de *At*NDT2 en pGEMT-Easy. Se muestra el proceso de sub-clonación de *At*NDT2 **A.** Amplificación de *At*NDT2 desde cDNA. **B.** PCR de colonia. **C.** PCR de ADN plasmídico. **D.** Predicción del perfil de digestión enzimática con BamHI y EcoRI de pGEMT/*At*NDT2 y pGEMT-Easy vacío mediante NEB CUTTER 2.0 y **E.** Perfil de digestión enzimática con BamHI y EcoRI de ADN plasmídico. MW, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder. C-, control negativo PCR sin plantilla. C+, control positivo PCR amplificación desde cDNA. ND, plásmidos sin digerir. D, plásmidos digeridos. Geles de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.



A partir de los plásmidos pGEMT/*At*NDT2 verificados previamente, se llevó a cabo la liberación del inserto mediante digestión con las enzimas BamHI y EcoRI, al mismo tiempo se digirió a pYES2 con las mismas enzimas (**Figura 7-24A**), a continuación se purificó el inserto desde gel de agarosa (**Figura 7-24B**), se ligó con el vector pYES2 y la primera mitad de reacción se transformó en células *E. coli* TOP10. De las colonias que crecieron fueron evaluadas 10 mediante PCR, encontrando que ninguna presentó el inserto (**Figura 7-24C**), por esta razón se transformó la segunda mitad de reacción de ligación y se evaluaron 30 de las colonias obtenidas, obteniendo un amplificado para 3 de ellas (**Figura 7-24D**), de las cuales se extrajo ADN plasmídico y se evaluó mediante PCR observando un amplificado para dos de ellas (**Figura 7-24E**), paralelamente se evaluaron mediante restricción enzimática con BamHI y EcoRI, perfiles que al ser comparados con las predicciones (**Figura 7-24F**) demuestran la identidad de los plásmidos pYES2/*At*NDT2 (**Figura 7-24G**).

Figura 7-24. Clonación de *At*NDT2 en pYES2. Se muestra el proceso de clonación de *At*NDT2 en pYES2. **A.** Digestión enzimática con BamHI y EcoRI de pGEMT/*At*NDT2 y pYES2. **B.** Inserto purificado (*At*NDT2). **C.** PCR de las colonias obtenidas con la primera mitad de ligación. **D.** PCR de las colonias tenidas con la segunda mitad de ligación. **E.** PCR de ADN plasmídico. **F.** Digestión enzimática predicha con BamHI y EcoRI para pYES2/*At*NDT2 y pYES2 vacío mediante NEB CUTTER 2.0. **G.** Digestión enzimática con BamHI y EcoRI de ADN plasmídico. **MW**, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder. **C-**, control negativo PCR sin plantilla. **C+**, control positivo PCR amplificación desde pGEMT/*At*NDT2. **ND**, plásmidos sin digerir. **BamHI**, digestión plásmidos con BamHI. **DD**, doble digestión plásmidos con BamHI y EcoRI. Geles de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.





Estos resultados muestran la obtención de los vectores recombinantes pYES2/*LbTNTA* y pYES2/*AtNDT2* necesarios para los ensayos de complementación, a continuación se llevó a cabo un ensayo de transfección en la cepa BY4741 (MATa; *ura3* Δ 0; *leu2* Δ 0; *his3* Δ 1; *met15* Δ 0, YIL006w::kanMX4), para el vector pYES2 vacío y los correspondientes vectores recombinantes mediante electroporación, así como para el vector pYES2 vacío en la cepa silvestre (WT) (6.3.3.3). Finalmente, se sembraron 300 μ L de los productos de transfección en cajas con Medio Mínimo Sintético (MMS) deficiente en uracilo (*Ura*⁻), con el objetivo de realizar la selección de las colonias transfectantes.

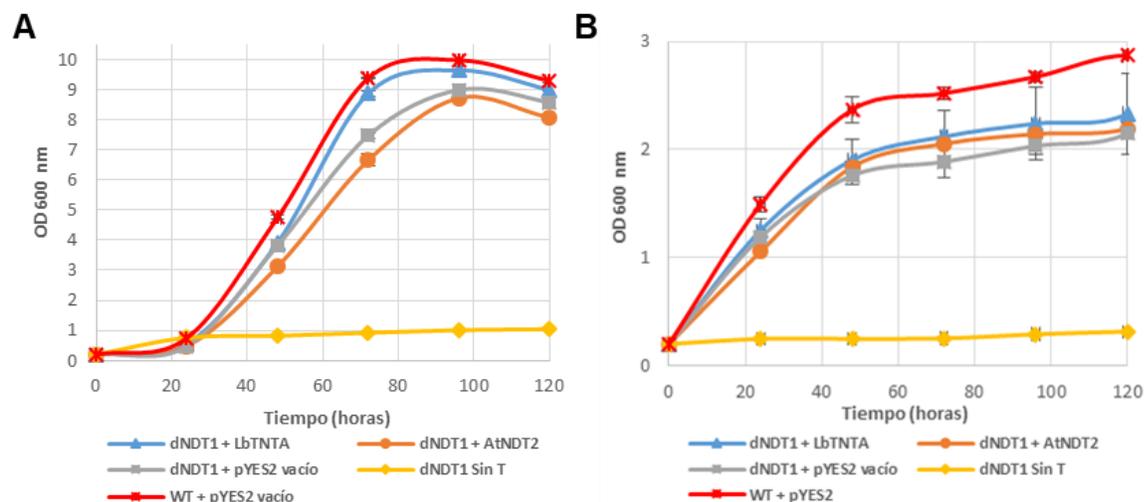
Para cada uno de los ensayos se obtuvieron transfectantes, cuyo crecimiento fue evaluado en medio líquido MS *Ura*⁻ suplementado con rafinosa al 2 % (p/v) (Figura 7-25A) o etanol al 2 % (p/v) (Figura 7-25B), de esta manera se determinó que al utilizar una fuente de carbono fermentable como la rafinosa, no es posible apreciar una diferencia significativa en el crecimiento de cada uno de los transfectantes, pero si con relación a la cepa mutante (Δ NDT1) sin transfectar, debida a la presencia del sistema pYES2 el cual otorga prototrofia de uracilo y la capacidad de crecimiento en el medio MS *Ura*⁻, de esta manera se demostró la obtención de los transfectantes.

Por otra parte, al evaluar el crecimiento con una fuente de carbono no fermentable como el etanol, se evidenció en primer lugar la atenuación del crecimiento para cada uno de los transfectantes en comparación con el crecimiento en presencia de rafinosa, lo cual ocurre principalmente con la cepa mutante (Δ NDT1) debido a la ausencia de uno de los transportadores mitocondriales de NAD⁺ y a la dependencia de su uso a nivel mitocondrial en el ciclo del glioxilato, al cual ingresa el etanol para la posterior síntesis de glucosa y finalmente la obtención de energía. Sin embargo, mediante este ensayo tampoco se logró evidenciar una diferencia en el crecimiento entre el transfectante del

candidato *LbTNTA* y el de pYES2 vacío, por lo tanto, se llevó a cabo la evaluación del crecimiento en medio sólido MS Ura⁻.

Figura 7-25. Evaluación del crecimiento en medio líquido MS Ura- suplementado con galactosa

0.1 %(p/v) ensayos de complementación. Se incubaron cultivos líquidos a 30 °C a 180 r.p.m para los transfectantes ΔNDT1+ pYES2/*LbTNTA* (azul), ΔNDT1+ pYES2/*AtNDT2* (naranja), ΔNDT1+ pYES2 vacío (gris), ΔNDT1 sin transfectar (amarillo) y la cepa silvestre + pYES2 vacío (rojo). Para el seguimiento del crecimiento se realizaron lecturas de OD₆₀₀ cada 24 horas durante 5 días. **A.** Crecimiento en medio MS Ura⁻ con fuente de carbono fermentable (rafinosa 2 %(p/v) y **B.** Crecimiento en medio MS Ura⁻ con fuente de carbono no fermentable (etanol 2 %(p/v).

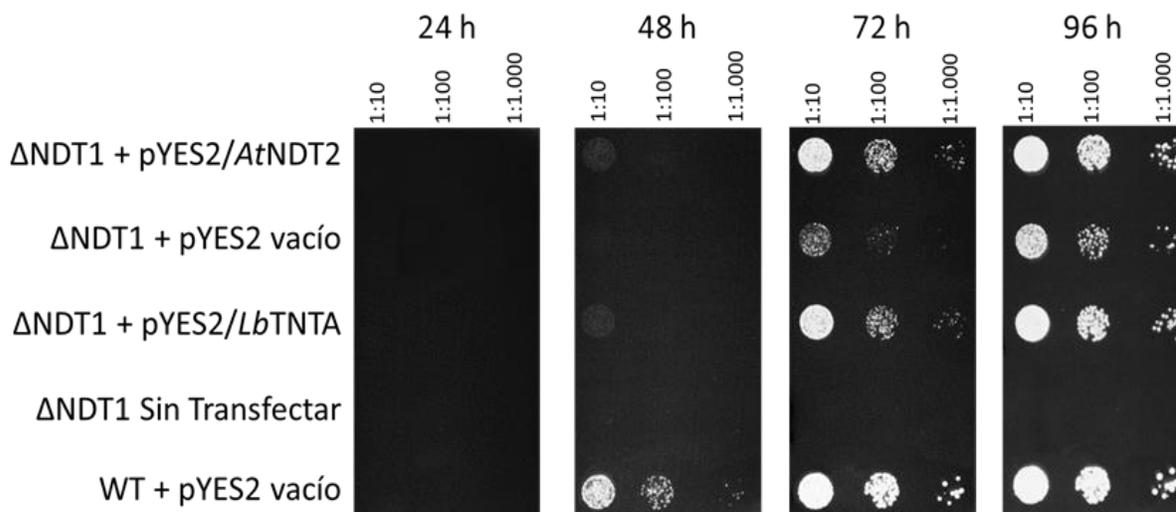


Para la evaluación del crecimiento en medio sólido MS-Agar, se utilizaron 3 diluciones seriadas 1/10 con el objetivo de observar una diferencia en el crecimiento al disminuir el número de células (**Figura 7-26**). Con este ensayo, se evidenció una diferencia en el crecimiento tanto para el transfectante del candidato *LbTNTA* como para el del control positivo *AtNDT2* con relación al del vector vacío a partir de las 48 horas (día 2), sin embargo, este crecimiento fue menor en comparación con el de la cepa silvestre, lo que indica que existe una recuperación parcial del fenotipo silvestre debida a la complementación de la cepa mutante ΔNDT1 con el candidato evaluado. Mediante este ensayo se logró comprobar la capacidad de *LbTNTA*, de reestablecer parcialmente el fenotipo silvestre de la cepa mutante ΔNDT1.

Figura 7-26. Evaluación del crecimiento en medio sólido MS Ura- suplementado con galactosa

0.1 %(p/v) ensayos de complementación. Se sembraron 10 μL de 3 diluciones seriadas 1/10 en medio MS-Agar suplementado con etanol al 2 %(p/v) para los transfectantes ΔNDT1+ pYES2/*LbTNTA*, ΔNDT1+ pYES2/*AtNDT2*, ΔNDT1+ pYES2 vacío, ΔNDT1 sin transfectar y la cepa silvestre + pYES2 vacío, los cuales fueron incubados a 30 °C.

Para el seguimiento del crecimiento se documentaron imágenes cada 24 horas durante 4 días con el analizador de imágenes Imager® Gel DocTMXR y el software Quantity One Basic 4.6.3 de BIORAD™.



Aunque los resultados mediante los ensayos en medio líquido aún no son concluyentes y sea necesaria la estandarización de este protocolo empleando una OD_{600nm} menor para el inóculo inicial. Paralelamente los ensayos de crecimiento en medio sólido permitieron comprobar la complementación parcial del fenotipo silvestre de la cepa mutante Δ NDT1 lo cual concuerda con el análisis *in silico* en el cual se identificaron las características de la familia de transportadores mitocondriales en *LbTNTA* como se ya se ha mencionado, por lo tanto, era de esperarse la complementación de esta cepa ya que el candidato presenta los elementos estructurales requeridos para su importación hacia la mitocondria como lo son los motivos METS o CS (Px[DE]xx[KR]) localizados en las hélices impares que posiblemente interactúan con la maquinaria de importación. Así como la presencia del tercer motivo METS (presente en H5), que para algunos miembros de la MCF, se encarga de la correcta inserción de la proteína en la membrana interna mitocondrial. A su vez, se ha identificado que los tres motivos reclutan dímeros de la proteína Tom70, presente en la membrana externa mitocondrial que reconoce a los miembros de la familia de los transportadores mitocondriales de metabolitos⁸⁹.

Estos ensayos de funcionalidad mediante complementación, demostraron que *LbTNTA* tiene la capacidad de restablecer parcialmente la velocidad de crecimiento de la cepa mutante Δ NDT1 de *S. cerevisiae* en medio de cultivo MS Ura⁻ suplementado con fuentes de carbono no fermentables como el etanol (**Figura 7-26**). Como se ha reportado previamente⁸⁵, este mutante presenta niveles menores

de NAD⁺ y NADH mitocondriales con relación a la cepa silvestre y por ende una actividad disminuida de las enzimas mitocondriales dependientes de NAD⁺, piruvato deshidrogenasa (PDH) y acetaldehído deshidrogenasa (ACDH), esta última, conocida por catalizar el paso limitante en el metabolismo del etanol como fuente de carbono en levaduras, lo que deriva en un retraso del crecimiento; de acuerdo con esto, el restablecimiento parcial del fenotipo es debido a la complementación del gen deleciónado (Ndt1p) por un análogo con la misma función, por lo tanto *LbTNTA* tiene la capacidad de transportar NAD⁺. Sin embargo, no se descarta el flujo de NAD⁺ aportado por Ndt2, lo que se evidencia en la ligera diferencia de crecimiento de Δ NDT1 con relación a la cepa silvestre, en comparación con la del doble mutante Δ NDT1 Δ NDT2^{79,85,86}, a pesar de esto, el sistema de solo uno de los mutantes fue suficiente para comprobar la funcionalidad de *LbTNTA*.

De manera adicional a la complementación, en este trabajo se abordaron dos estrategias para caracterizar funcionalmente al candidato como se muestra a continuación.

7.3.2. Evaluación funcional empleando un sistema para la reconstitución en liposomas de *LbTNTA* mediada por detergentes.

Para la evaluación funcional del candidato se desarrolló un sistema el cual permitiera la reconstitución de *LbTNTA* a partir de la proteína recombinante Trx-*LbTNTA* purificada obtenida previamente y de lípidos extraídos desde eritrocitos humanos por mezcla de solventes. El objetivo de esta estrategia metodológica fue obtener un sistema para evaluar funcionalmente al candidato. Como control positivo para estos ensayos se utilizó al transportador mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* *AtNDT2*, el cual fue clonado en el sistema de expresión pBAD202/d-TOPO, el mismo en el que se encuentra *LbTNTA*. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la reconstitución de la proteína en liposomas mediada por detergentes.

7.3.2.1. Clonación de *AtNDT2* en el vector pBAD202/d-TOPO

El transportador *AtNDT2* utilizado como control positivo para los ensayos funcionales se clonó en el vector pBAD202/d-TOPO con el objetivo de obtener una proteína recombinante fusionada a la misma etiqueta de tiorredoxina que *LbTNTA* en el extremo N-terminal. De esta manera, se diseñaron

cebadores para la amplificación de *At*NDT2, teniendo en cuenta la adición de la secuencia CACC, necesaria para garantizar la correcta direccionalidad en el vector (**Tabla 7-4**).

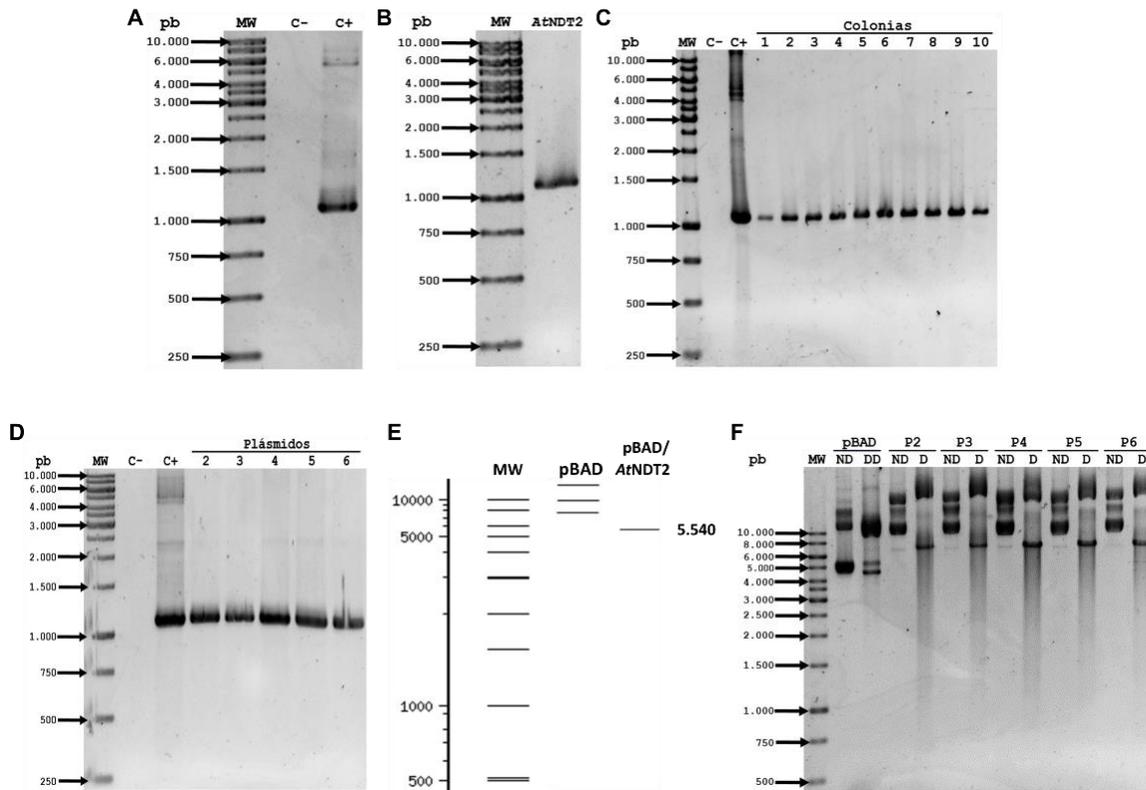
Tabla 7-4. Cebadores diseñados para la clonación de *At*NDT2 en el vector pBAD202/d-TOPO.

Se muestra la secuencia, longitud, temperatura de anillaje y porcentaje de GC para los cebadores diseñados. En amarillo se muestra la secuencia CACC necesaria para garantizar la correcta direccionalidad del inserto.

CEBADOR	SECUENCIA (5'-3')	LONGITUD	Tm	%GC
DIRECTO	CAC.CAT.GAT.TGA.ACA.TGG.G	19 pb	58	47
REVERSO	TTA.TTT.GCT.TCC. AAG.AGG.GAT	21 pb	58	38

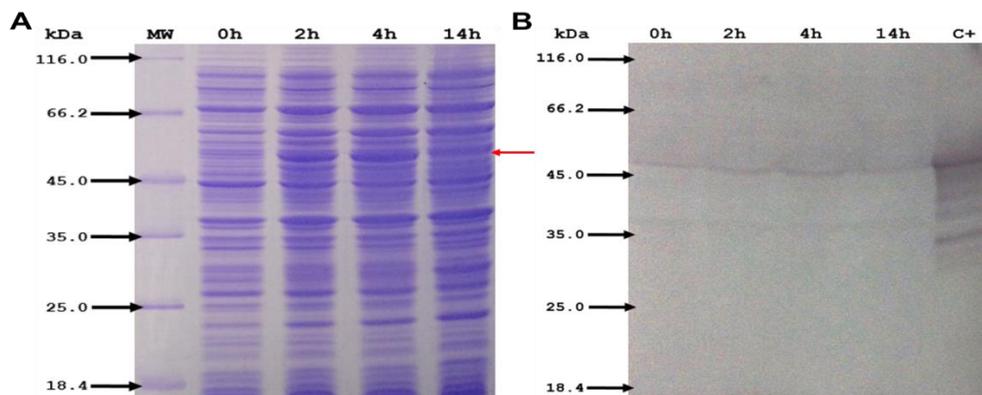
Con estos cebadores se llevó a cabo la amplificación de *At*NDT2 desde el vector pGEMT/*At*NDT2 con una temperatura de anillamiento de 58 °C (**6.3**), obteniéndose un producto único (**Figura 7-27A**), el cual fue purificado desde gel de agarosa para remover la plantilla (**Figura 7-27B**), a continuación se procedió a realizar la ligación con el vector pBAD202/d-TOPO y el producto fue transformado en células *E. coli* TOP10. De las colonias que crecieron se evaluaron 10 mediante PCR obteniéndose un amplificado del tamaño esperado (1.097 pb, **Figura 7-27C**) por lo tanto se extrajo ADN plasmídico de 5 de ellas y se evaluó por PCR evidenciándose el amplificado correspondiente (**Figura 7-27D**). Paralelamente los plásmidos fueron evaluados mediante digestión enzimática con KpnI (**6.3.1.6**) verificándose la presencia de *At*NDT2 (**Figura 7-27F**) al comparar el perfil de digestión con el predicho (**Figura 7-27E**).

Figura 7-27. Clonación de *At*NDT2 en pBAD202/d-TOPO. Se muestra el proceso de clonación de *At*NDT2 en pBAD202/d-TOPO **A.** Amplificación de *At*NDT2 desde pGEMT/*At*NDT2 (1.097 pb), **B.** Amplificado purificado de *At*NDT2. **C.** PCR de colonia. **D.** PCR de ADN plasmídico. **E.** Predicción del perfil de digestión enzimática con KpnI de pBAD/*At*NDT2 y pBAD202/d-TOPO vacío mediante NEB CUTTER 2.0 y **F.** Perfil de digestión enzimática con KpnI de ADN plasmídico. MW, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder. C-, control negativo PCR sin plantilla. C+, control positivo PCR amplificación desde pGEMT/*At*NDT2. ND, plásmidos sin digerir. D, plásmidos digeridos. Geles de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.



Con el plásmido recombinante pBAD/*AtNDT2* se esperaba la obtención de la proteína recombinante Trx-*AtNDT2* de 52.5 kDa (39.5 *AtNDT2* + 13 Trx), un tamaño similar a la proteína recombinante Trx-*LbTNTA* en este mismo sistema (52.8 kDa). Para verificar la expresión de la proteína se realizó una inducción con L-arabinosa al 0.02% y se evaluaron tiempos de inducción de 2, 4 y 14 horas a 37 °C en la cepa de expresión de *E. coli* BL21(DE3), condiciones establecidas para la mayor expresión de *LbTNTA* (1). La inducción de la proteína Trx-*AtNDT2*, fue evaluada mediante SDS-PAGE y western blot, con lo que se identificó la mayor expresión del transportador a las 4h (**Figura 7-28A**), proteína que es reconocida por el anticuerpo comercial α -Trx en una dilución de 1:6.000 (**Figura 7-28B**). De esta manera, se comprobó la obtención de la proteína recombinante Trx-*AtNDT2* para los ensayos de reconstitución.

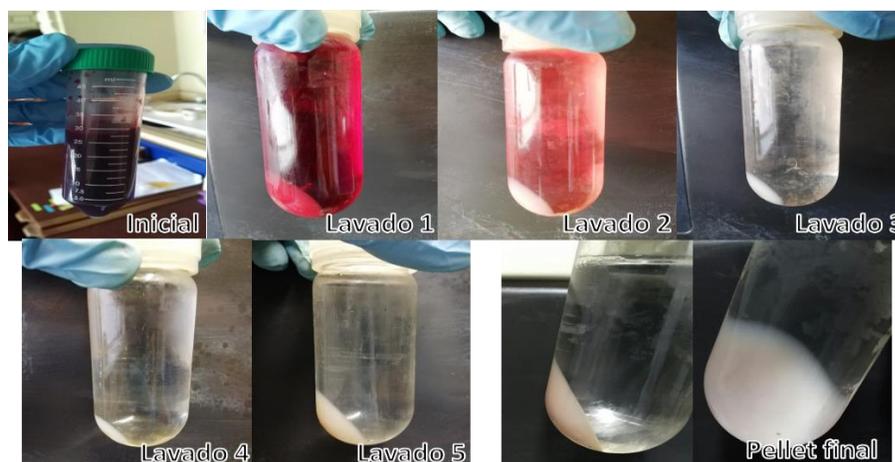
Figura 7-28. Evaluación de la expresión de la proteína Trx-*AtNDT2*. La expresión de la proteína recombinante Trx-*AtNDT2* con L-arabinosa al 0.02% como inductor a una temperatura de 37 °C en la cepa *E. coli* BL21(DE3), fue evaluada mediante **A.** SDS-PAGE al 12 % (p/v), tinción azul de Coomassie y **B.** Western blot revelado por el sistema biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina. **0h, 2h, 4h y 14h**, tiempos de inducción. Se utilizó el anticuerpo comercial α -Trx en una dilución 1:6.000. MW, Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker. La flecha muestra la expresión de Trx-*AtNDT2*.



7.3.2.2. Obtención de lípidos

La extracción de lípidos de membrana se realizó a partir de eritrocitos de sangre humana, los cuales fueron aislados desde sangre total donada por el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS). Inicialmente, los eritrocitos se lisaron por choque hipotónico con una solución de PBS 0.033X pH 8.0 hasta observar una pérdida total de la coloración rojiza debida a la hemoglobina (**Figura 7-29**), de esta manera, se obtuvieron las membranas de los eritrocitos o eritrocitos fantasma.

Figura 7-29. Proceso de obtención de eritrocitos fantasma mediante choque hipotónico. Los eritrocitos provenientes de sangre humana se lisaron por choque hipotónico con PBS 0.033X hasta observar una pérdida total de coloración rojiza, para esto, se realizaron 5 lavados seguidos de centrifugación para la obtención del pellet de eritrocitos fantasma.



El proceso de obtención de los eritrocitos fantasma fue evaluado mediante SDS-PAGE, en cuanto al contenido proteico, para esto, se realizó la cuantificación por Bradford bajo condiciones denaturantes de cada uno de los lavados (sobrenadantes S1 – S5) y pellets (células, P1 – P5) (**Figura 7-30A**). Al

analizar el gel de proteínas obtenido, se identificó la presencia de la albúmina sérica humana en la fracción del suero y de las proteínas totales, lo que demuestra una adecuada separación entre el suero y las células rojas, así como la presencia de las sub-unidades de la hemoglobina, presentes únicamente en las fracciones correspondientes a los glóbulos rojos. De igual manera se comprobó la disminución de la hemoglobina posterior a cada uno de los lavados realizados y el enriquecimiento de las proteínas constituyentes de las membranas de los eritrocitos tales como la α y β espectrina (bandas 1 y 2), la ankirina (banda 2.1), la actina (banda 5) y la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (banda 6), entre otras (**Figura 7-30B**), como se observó al comparar el pellet final con el perfil de proteínas de membrana de eritrocitos humanos⁹¹ (**Figura 7-30C**).

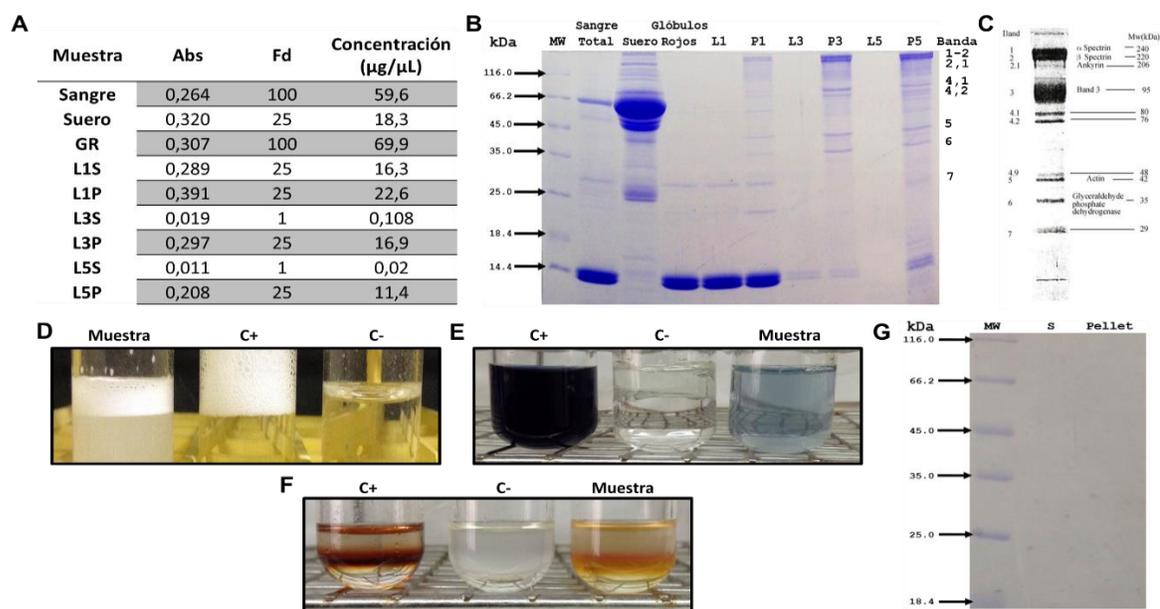
A partir de los eritrocitos fantasma extraídos (pellet final **Figura 7-29**) se realizó la extracción del componente lipídico mediante mezcla de solventes de diferente polaridad y centrifugación (**6.3.2**). Con el objetivo de comprobar el tipo de lípidos presentes en la muestra extraída y de acuerdo con estudios previos en donde se ha reportado una composición para la membrana de eritrocitos humanos de fosfolípidos como la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina, entre otros, así como esfingosinas y colesterol⁹²⁻⁹⁴, se llevó a cabo un ensayo de saponificación (**Figura 7-30D**) y la prueba de Fiske-Subbarow (**Figura 7-30E**) para la identificación de fosfolípidos, observándose la formación de espuma y de una coloración azul de la muestra respectivamente para cada prueba, confirmando la presencia de este tipo de lípidos en la muestra. Adicionalmente se realizó la prueba de Salkowsky (**Figura 7-30F**), con la cual se observó la formación de un anillo naranja-rojizo, resultado positivo para la presencia de colesterol.

Una vez se comprobó la presencia de lípidos de membrana en la muestra extraída, se evaporó el solvente y se llevó a cabo un ensayo de formación de liposomas al 5 % (p/v) en el buffer NaCl 50 mM y HEPES 10 mM pH 7.0, mediante incubación con agitación constante a temperatura ambiente, teniendo en cuenta que se ha reportado el uso de este buffer para los ensayos de transporte para los transportadores *ScNDT1*, *ScNDT2* de *S. cerevisiae* y *AtNDT1* y *AtNDT2* de *A. thaliana*, además de presentar una composición similar al utilizado en protocolos de reconstitución mediada por detergentes y dialisis^{95,96}. A continuación se realizó la mezcla de reconstitución con 40.8 μ g de Trx-*LbTNTA* purificado, 150 μ L de liposomas al 5 % (p/v) y SDS 69 mM en el mismo buffer a un volumen final de 1 mL. El uso del SDS tuvo como objetivo la solubilización de la proteína, el cual posteriormente fue removido gradualmente mediante diálisis escalonada en el mismo buffer durante 150 horas a temperatura ambiente con agitación constante, para favorecer las interacciones lípido-

proteína y la formación de los proteoliposomas (reconstitución). Para la obtención de los proteoliposomas, se centrifugó a 100.000 g por 1.5 horas, las fracciones obtenidas fueron evaluadas mediante SDS-PAGE para verificar la integridad de la proteína posterior al proceso de dialisis, sin embargo, no se detectó la proteína en ninguna de las fracciones, probablemente debido a degradación de la misma bajo las condiciones evaluadas (**Figura 7-30G**).

Figura 7-30. Evaluación del proceso de extracción de lípidos de membranas de eritrocitos humanos.

Se evaluaron cada uno de los pasos del proceso de extracción de lípidos. **A.** Cuantificación por Bradford bajo condiciones denaturantes de muestras de sangre total, suero, glóbulos (**GR**), de los sobrenadantes resultantes después de cada lavado (**L1S**, **L3S** y **L5S**) y obtención de los pellet de células correspondientes (**L1P**, **L3P** y **L5P**). **B.** Evaluación del perfil proteico de cada una de las fracciones mediante SDS-PAGE al 12 % (P/V), tinción azul de Coomassie, cargando 15 µg de cada muestra. **C.** Perfil proteico para las membranas de eritrocitos humanos determinado por Yiqin, L. y Junfan, L.⁹¹. **D.** Ensayo de saponificación para la muestra de lípidos extraída. C+, control positivo (lecitina). C-, control negativo (cloroformo). **E.** Prueba de Fiske-Subbarow para la muestra de lípidos extraída. C+, control positivo (lecitina). C-, control negativo (cloroformo). **F.** Prueba de Salkowsky para la muestra de lípidos extraída. C+, control positivo (colesterol). C-, control negativo (cloroformo). **G.** Evaluación del proceso de reconstitución mediada por detergentes mediante SDS-PAGE al 12 % (P/V), tinción azul de Coomassie. S, sobrenadante obtenido posterior a la ultracentrifugación y Pellet, proteoliposomas.



Aunque la reconstitución en liposomas se planteó inicialmente como una estrategia promisoriosa, esta metodología resulta dispendiosa y pese a múltiples ensayos, no se obtuvieron resultados positivos. Adicionalmente, la reconstitución por este método no asegura la correcta direccionalidad de la proteína, por ello se abordó un segundo enfoque metodológico, como se muestra a continuación.

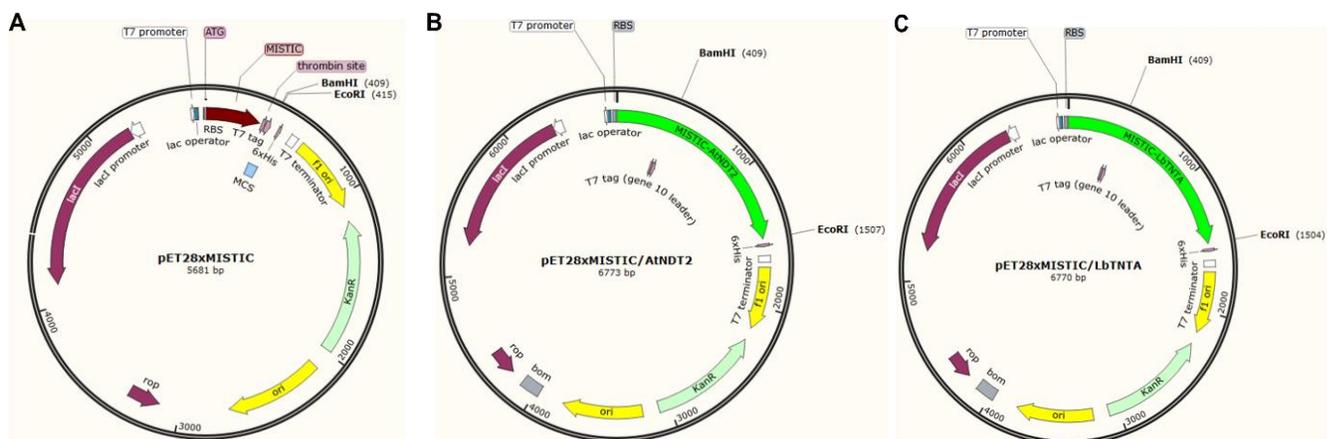
7.3.3. Evaluación funcional empleando un sistema para la obtención del candidato recombinante en membranas de *E. coli*.

Esta estrategia consistió en la clonación y expresión del candidato *LbTNTA* y del transportador *AtNDT2* en el sistema heterólogo *E. coli*, fusionados en el extremo N-terminal a ortólogos de proteínas MISTIC, una familia de proteínas de origen bacteriano de las especies del género *Bacillus*, que se encuentran asociadas a membrana, para las que se ha identificado que al encontrarse fusionadas con otras proteínas favorecen su integración en la membrana a pesar de no presentar un péptido señal, en lugar de su agregación citoplasmática como cuerpos de inclusión, disminuyendo así la toxicidad de estas proteínas para la célula y aumentando sus niveles de expresión. Principales obstáculos para la expresión de proteínas transmembranales de eucariotas en sistemas bacterianos como *E. coli*^{97,98}.

En este trabajo, se utilizó el vector recombinante pET28xMISTIC donado por el Dr Wolfram Antonin del laboratorio Friedrich Miescher de la sociedad Max Planck en Tübingen, Alemania. Este vector posee la proteína MISTIC proveniente de *Bacillus subtilis* de 110 aa como etiqueta fusión en el extremo N-terminal y la etiqueta 6xHis en el C-terminal (**Figura 7-31A**). Al evaluar el sitio de múltiple clonaje del vector, se estableció que los cebadores diseñados para la clonación en el vector pYES2 (**Tabla 7-2** y **Tabla 7-3**) permitían la inserción direccionada de las secuencias codificantes de *LbTNTA* y *AtNDT2* en el vector (**Figura 7-31B-C**), sin embargo, para ambas secuencias, en el diseño de los cebadores reversos se incluyó el codón de parada, por lo tanto, las proteínas recombinantes obtenidas (MISTIC-*LbTNTA* y MISTIC-*AtNDT2*) no presentan la etiqueta 6xHis para su correspondiente inmunodetección.

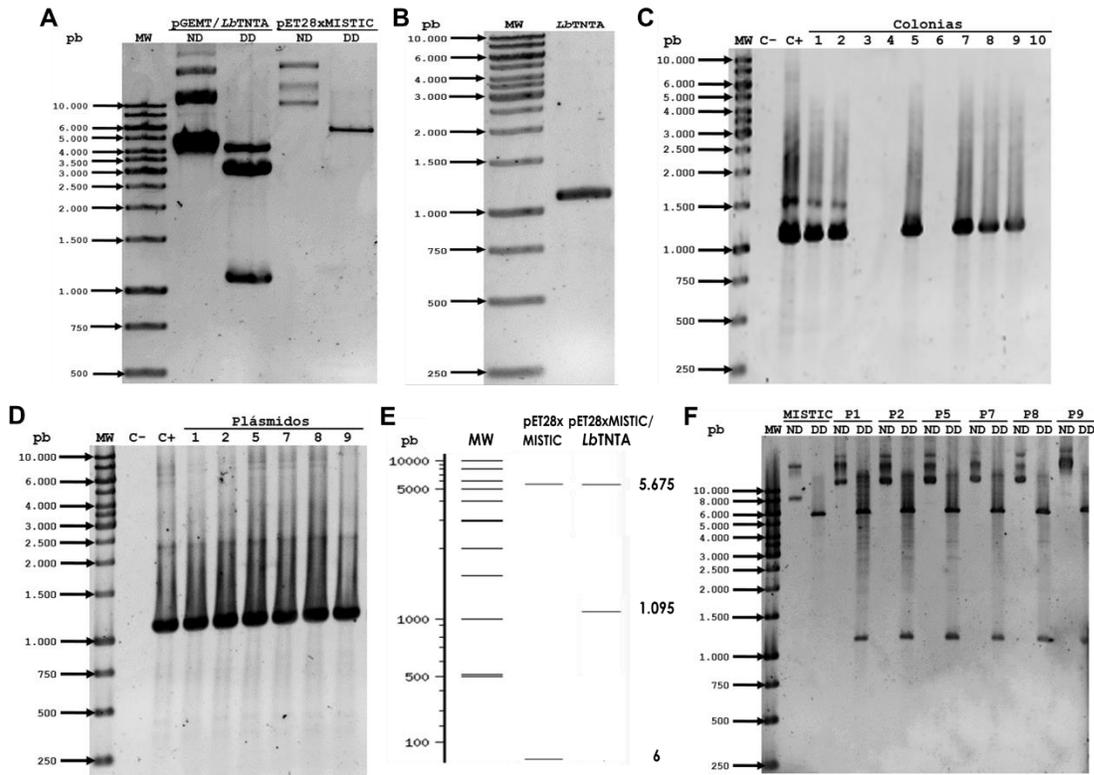
Figura 7-31. Vectores recombinantes pET28xMISTIC/*LbTNTA* y pET28xMISTIC/*AtNDT2*.

A. Vector pET28xMISTIC vacío. **B.** Vector pET28xMISTIC/*AtNDT2* y **C.** Vector recombinante pET28xMISTIC/*LbTNTA*. En todos los casos se muestran las especificaciones del vector (promotor, operador, orígenes de replicación, gen de resistencia a kanamicina (KanR), sitio de múltiple clonaje (MCS) y los sitios de corte para BamHI y EcoRI). En verde se muestran las proteínas recombinantes MISTIC-*AtNDT2* (**B**) y MISTIC-*LbTNTA* (**C**). Imágenes generadas con el software Snapgene viewer 3.3.4.



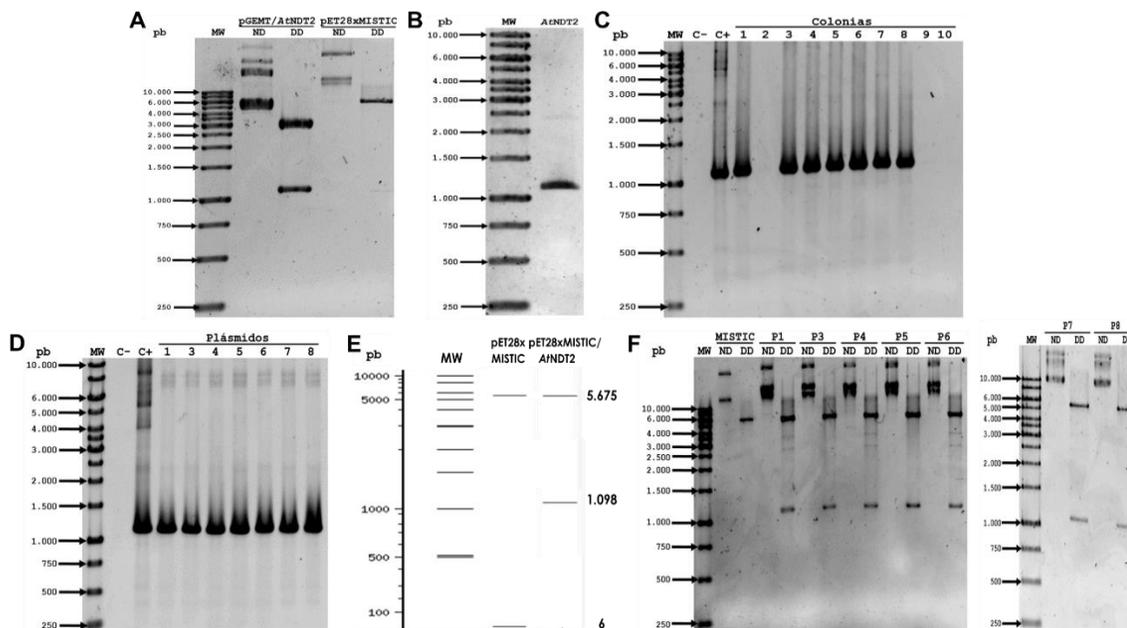
En primer lugar se llevó a cabo la clonación de *LbTNTA* tomando como partida el vector pGEMT/*LbTNTA* previamente construido en este trabajo, para esto, se realizó la digestión enzimática de este vector recombinante y de pET28xMISTIC con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI evidenciándose la liberación de *LbTNTA* y la linearización del vector vacío (**Figura 7-32A**), a continuación, se purificó el inserto liberado desde gel de agarosa (**Figura 7-32B**) y se ligó con pET28xMISTIC. El producto de ligación fue transformado en células *E. coli* TOP10 y de las colonias que crecieron se evaluaron 10 mediante PCR, obteniéndose un amplificado del tamaño esperado en 6 de ellas (**Figura 7-32C**), para las cuales se extrajo ADN plasmídico el cual se verificó mediante PCR (**Figura 7-32D**) y digestión enzimática con BamHI y EcoRI (**Figura 7-32F**) comprobándose la presencia de *LbTNTA* por comparación con el perfil de digestión predicho (**Figura 7-32E**).

Figura 7-32. Clonación de *LbTNTA* en pET28xMISTIC. Se muestra el proceso de clonación de *LbTNTA* en pET28xMISTIC **A.** Digestión enzimática con BamHI y EcoRI de pGEMT/*LbTNTA* y pET28xMISTIC vacío **B.** Inserto purificado (*LbTNTA*). **C.** PCR de colonia. **D.** PCR de ADN plasmídico. **E.** Digestión enzimática predicha con BamHI y EcoRI de pET287xMISTIC/*LbTNTA* y pET28xMISTIC vacío mediante NEB CUTTER 2.0. **F.** Digestión enzimática con BamHI y EcoRI de ADN plasmídico. **MW**, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder. **C-**, control negativo PCR sin plantilla. **C+**, control positivo PCR amplificación desde pBAD/*LbTNTA*. **ND**, plásmidos sin digerir. **DD**, plásmidos digeridos. Geles de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.



Posteriormente, se clonó la secuencia codificante de *AtNDT2* el cual será utilizado como control positivo en los ensayos de evaluación funcional, para esto se llevó a cabo la digestión enzimática del vector pGEMT/*AtNDT2* obtenido previamente en este trabajo y de pET28xMISTIC vacío, con lo que se identificó la liberación del inserto y la linearización del vector vacío (Figura 7-33A), a continuación, se purificó el inserto desde gel de agarosa (Figura 7-33B), se ligó con pET28xMISTIC y el producto de ligación se transformó en células *E. coli* TOP10. De las colonias obtenidas fueron evaluadas 10 mediante PCR obteniéndose un amplificado del tamaño esperado en 7 de ellas (Figura 7-33C), por consiguiente se extrajo ADN plasmídico y se comprobó la presencia de *AtNDT2* mediante PCR (Figura 7-33D) y digestión enzimática con BamHI y EcoRI (Figura 7-33F) por comparación con el perfil de digestión predicho (Figura 7-33E).

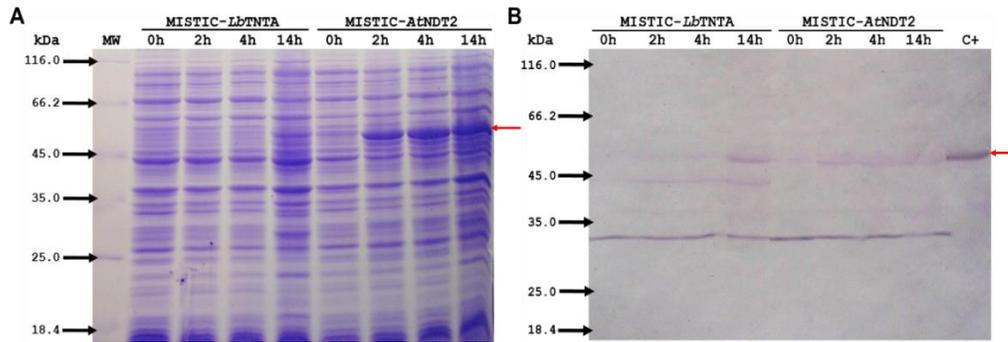
Figura 7-33. Clonación de *AtNDT2* en pET28xMISTIC. Se muestra el proceso de clonación de *AtNDT2* en pET28xMISTIC. **A.** Digestión enzimática con BamHI y EcoRI para pGEMT/*AtNDT2* y pET28xMISTIC. **B.** Inseto purificado (*AtNDT2*). **C.** PCR de las colonias. **D.** PCR de ADN plasmídico. **E.** Digestión enzimática predicha con BamHI y EcoRI de pET28xMISTIC/*AtNDT2* y pET28xMISTIC vacío mediante NEB CUTTER 2.0. **F.** Digestión enzimática con BamHI y EcoRI de ADN plasmídico. MW, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder. C-, control negativo PCR sin plantilla. C+, control positivo PCR amplificación desde pGEMT/*AtNDT2*. ND, plásmidos sin digerir. BamHI, digestión plásmidos con BamHI. DD, doble digestión plásmidos con BamHI y EcoRI. Geles de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio.



De acuerdo con los resultados anteriores, se decidió evaluar la expresión de las proteínas MISTIC-*LbTNTA* y MISTIC-*AtNDT2* para las cuales se esperaba un tamaño de 55.3 (39.8 *LbTNTA* + 15.4 MISTIC) y 55.0 kDa (39.5 *AtNDT2* + 15.4 MISTIC) respectivamente, un tamaño similar a la proteína recombinante *Trx-LbTNTA* (52.8 kDa), el cual se empleó como control positivo en ensayos de western blot. Para verificar la expresión de la proteína se realizó una inducción con IPTG 1mM y se evaluaron tiempos de inducción de 2, 4 y 14 horas a 37 °C en la cepa de expresión de *E. coli* BL21(DE3), condiciones establecidas para la mayor expresión de *LbTNTA* (1). La inducción de las proteínas recombinantes fue evaluada mediante SDS-PAGE y western blot, teniendo en cuenta, como se mencionó anteriormente, que ninguna de las proteínas presenta la etiqueta 6xHis para su inmunodetección, por lo tanto, se utilizaron los anticuerpos α -*Trx-LbTNTA* purificados. A partir de estos procedimientos, se identificó la mayor expresión del candidato a las 14 horas y para MISTIC-*AtNDT2* a las 4h (**Figura 7-34A**), adicionalmente, se comprobó que ambas proteínas son reconocidas por los anticuerpos α -*Trx-LbTNTA* en una dilución de 1:5.000, lo cual indica que existe un reconocimiento cruzado del anticuerpo por *AtNDT2* (**Figura 7-34B**), lo que era de esperarse debido a que este transportador fue utilizado como plantilla para la búsqueda de *LbTNTA* en el genoma de *L. braziliensis*. De esta manera, se comprobó la obtención de las proteínas MISTIC-*LbTNTA* y MISTIC-*AtNDT2*.

Figura 7-34. Evaluación de la expresión de las proteínas MISTIC-*LbTNTA* y MISTIC-*AtNDT2*. La expresión de las proteínas recombinantes MISTIC-*LbTNTA* y MISTIC-*AtNDT2* con IPTG 1 mM como inductor a una temperatura de 37 °C en la cepa *E. coli* BL21(DE3) fue evaluada mediante A. SDS-PAGE al 12 % (P/V),

tinción azul de Coomassie y **B.** Western blot revelado por el sistema biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina. **0h, 2h, 4h y 14h**, tiempos de inducción. Se utilizó el anticuerpo IgY α -Trx-*LbTNTA* en una dilución 1:5.000. **MW**, Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker. La fleche indica a MISTC-*LbTNTA* y MISTIC-*A α NDT2*.



Aunque durante la realización de este trabajo no fue posible evaluar las membranas de *E. coli* con el sistema pET28xMISTIC, la producción de esta herramienta, permitirá la adecuada evaluación funcional del candidato, ya que, mediante este sistema se asegura la correcta direccionalidad del transportador en la membrana.

8. Conclusiones

Mediante el desarrollo de este trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se identificó un transportador de NAD en *Leishmania braziliensis* (*LbTNTA*) que presenta las principales características de la familia de transportadores mitocondriales. Este transportador se expresa tanto en amastigotes axénicos como en promastigotes con una localización diferencial y se encuentra modificado por N-Glicosilaciones. Estos resultados comprueban la existencia del primer transportador de NAD identificado en parásitos protozoarios, el TNTA de *L. braziliensis* (*LbTNTA*).
- Se determinó mediante herramientas computacionales que el candidato *LbTNTA* presenta las principales características de la familia de transportadores mitocondriales como lo son una estructura en forma de canal compuesta por tres motivos repetidos en tándem que al plegarse en su conformación tridimensional forman 6 hélices α transmembranales, así como la presencia de las 3 hélices α cortas (h12, h34 y h56) en el extremo de la cara interna de la membrana. Adicionalmente se predijeron los motivos característicos que conforman la red de la cara externa de la membrana (Px[DE]xx[KR], denominado METS o CS) presentes en las hélices impares y los de la cara interna de la membrana ([YF][DE]xx[KR]) presentes en las hélices pares.
- Se logró obtener la cantidad necesaria de proteína recombinante Trx-*LbTNTA* para la producción de una herramienta inmunológica en el modelo aviar, que permitió el estudio de *LbTNTA* en extractos celulares de amastigotes axénicos y promastigotes de *Leishmania braziliensis*, a pesar de la dificultad en la expresión de proteínas de eucariotas transmembranales en sistemas heterólogos como el de *E. coli*. Adicionalmente, se predijeron los posibles epitopes para el candidato de acuerdo con su estructura secundaria y terciaria.
- Se identificó el candidato en extractos celulares de amastigotes axénicos y promastigotes de *Leishmania braziliensis* con un tamaño de ≈ 79.51 kDa, superior al teórico (39.8 kDa) para ambos estadios, mediante la herramienta inmunológica producida en el modelo aviar.
- El candidato endógeno se encuentra modificado por N-glicosilaciones, lo que explica su inmunodetección con un tamaño aparente de ≈ 79.51 kDa. Al remover estas glicosilaciones, es posible la detección de la forma desglicosilada de ≈ 30.07 kDa, lo que daría lugar a la

adición de una o múltiples cadenas de oligosacáridos de ≈ 49.44 kDa. Asimismo, se predijeron los posibles sitios para estas glicosilaciones en la secuencia de *LbTNTA* de acuerdo con su topología.

- La evaluación de la localización sub-celular del candidato mediante inmunofluorescencia permitió identificar que *LbTNTA* se localiza diferencialmente en el estadio amastigote axénico y promastigote de *Leishmania braziliensis*, presentando una co-localización mitocondrial parcial en el primer estadio.
- Se determinó la funcionalidad de *LbTNTA* mediante el diseño y construcción de un sistema para evaluar la complementación de la cepa mutante Δ NDT1 de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Se obtuvo adicionalmente una segunda herramienta para la caracterización de la capacidad transportadora de *LbTNTA*, a partir de la producción de la proteína recombinante MISTICx*LbTNTA* insertada directamente en membranas de *E. coli*, constituyendo un método más eficiente a la reconstitución del candidato en liposomas, la cual no aportó los resultados esperados. Este acercamiento metodológico permitirá evaluar el transportador en estas membranas.

9. Perspectivas

A partir de este trabajo se produjeron 3 herramientas promisorias para continuar con el estudio y caracterización del candidato, por consiguiente, se propusieron las siguientes perspectivas:

- Confirmar la localización diferencial de *LbTNTA* en amastigotes axénicos y promastigotes de *Leishmania braziliensis* mediante fraccionamiento celular y western blot.
- Evaluar funcionalmente a *LbTNTA* mediante complementación en *Saccharomyces cerevisiae* a partir de la herramienta producida con el vector pYES2 y la cepa mutante BY4741 Δ NDT2 (MATa; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0, YEL006w::kanMX4), el cual corresponde con un mutante del segundo transportador mitocondrial de este organismo.
- Confirmar la funcionalidad de *LbTNTA* y determinar su especificidad y constantes cinéticas a partir de la proteína producida en el sistema de expresión pET28xMISTIC.
- Realizar estudios estructura/función de *LbTNTA* empleando mutantes delecionales.
- Realizar la búsqueda y evaluación de posibles inhibidores específicos para *LbTNTA*.

10. Bibliografía

- (1) Contreras, L. E.; Neme, R.; Ramírez, M. H. *Protein Expr. Purif.* **2015**, *115*, 26–33.
- (2) Contreras Rodríguez, L. E. Obtención y caracterización bioquímica y funcional de la enzima recombinante nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT), Universidad Nacional de Colombia, 2016.
- (3) Morales Herrera, D. S. Contribución al estudio de transportadores en tripanosomátidos: clonación de por lo menos un gen codificante para proteínas transportadoras de NAD⁺, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, 2016.
- (4) Nelson, D.; Cox, M. *Lehninger: Principles of biochemistry*, 5th ed.; New York, 2008.
- (5) National Center for Biotechnology Information. Pubchem pubchem.ncbi.nlm.nih.gov%0A.
- (6) Feldman, J. L.; Baeza, J.; Denu, J. M. *J. Biol. Chem.* **2013**.
- (7) Liu, C.; Yu, X. *Curr Protein Pept Sci* **2015**, *16* (6), 491–501.
- (8) Patel, S.; Churchill, G. C.; Galione, A. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26* (8).
- (9) Lee, H. C. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (38), 31633–3164.
- (10) Magni, G.; Amici, A.; Emanuelli, M.; Orsomando, G.; Raffaelli, N.; Ruggieri, S. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004.
- (11) Nikiforov, A.; Dölle, C.; Niere, M.; Ziegler, M. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (24), 21767–21778.
- (12) Niño Riveros, C. H. 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.
- (13) O'Hara, J. K.; Kerwin, L. J.; Cobbold, S. A.; Tai, J.; Bedell, T. A.; Reider, P. J.; Llinás, M. *PLoS One* **2014**.
- (14) Forero-Baena, N.; Sánchez-Lancheros, D.; Buitrago, J. C.; Bustos, V.; Ramírez-Hernández, M. H. *Biochim. Open* **2015**, *1*, 61–69.

-
- (15) Mehl, R. A.; Kinsland, C.; Begley, T. P. *J. Bacteriol.* **2000**.
- (16) Emanuelli, M.; Carnevali, F.; Lorenzi, M.; Raffaelli, N.; Amici, A.; Ruggieri, S.; Magni, G. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **1999**, *455*, 13–17.
- (17) Emanuelli, M.; Amici, A.; Carnevali, F.; Pierella, F.; Raffaelli, N.; Magni, G. *Protein Expr. Purif.* **2003**, *27*, 357–364.
- (18) Kato, M.; Lin, S. J. *J. Biol. Chem.* **2014**.
- (19) Hashida, S.-N.; Takahashi, H.; Kawai-Yamada, M.; Uchimiyama, H. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **1999**, *455*, 13–17.
- (20) Hunt, L.; Lerner, F.; Ziegler, M. *New Phytologist.* 2004.
- (21) Berger, F.; Lau, C.; Dahlmann, M.; Ziegler, M. *J. Biol. Chem.* **2005**.
- (22) Yang, N. J.; Hinner, M. J. In *Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols*; 2015.
- (23) Haferkamp, I.; Schmitz-Esser, S.; Linka, N.; Urbany, C.; Collingro, A.; Wagner, M.; Horn, M.; Neuhaus, H. E. *Nature* **2004**, *432*, 622–625.
- (24) Haferkamp, I.; Schmitz-Esser, S.; Wagner, M.; Neigel, N.; Horn, M.; Neuhaus, H. E. *Mol. Microbiol.* **2006**, *60* (6), 1534–1545.
- (25) Audia, J. P.; Winkler, H. H. *J. Bacteriol.* **2006**.
- (26) Daugherty, R. M.; Linka, N.; Audia, J. P.; Urbany, C.; Neuhaus, H. E.; Winkler, H. H. *J. Bacteriol.* **2004**, *186* (10), 3262–3265.
- (27) Todisco, S.; Agrimi, G.; Castegna, A.; Palmieri, F. *J. Biol. Chem.* **2006**.
- (28) Palmieri, F.; Rieder, B.; Ventrella, A.; Blanco, E.; Do, P. T.; Nunes-Nesi, A.; Trauth, A. U.; Fiermonte, G.; Tjaden, J.; Agrimi, G.; Kirchberger, S.; Paradies, E.; Fernie, A. R.; Neuhaus, H. E. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (45), 31249–31259.
- (29) Agrimi, G.; Russo, A.; Scarcia, P.; Palmieri, F. *Biochem. J.* **2012**, *443* (1), 241–247.
- (30) Di Noia, M. A.; Todisco, S.; Cirigliano, A.; Rinaldi, T.; Agrimi, G.; Iacobazzi, V.; Palmieri, F. *J. Biol. Chem.* **2014**.

- (31) Palmer, I.; Wingfield, P. T. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2012**.
- (32) Schägger, H. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (1), 16–22.
- (33) Yang, P.-C.; Mahmood, T. *N. Am. J. Med. Sci.* **2012**, *4* (9), 429.
- (34) Moreno-gonzález, P. A. **2013**, *42* (2), 12–20.
- (35) Lagos M, L. F.; Moran, O.; Camacho, M. *Exp. Parasitol.* **2007**, *116*, 163–170.
- (36) Himbert, S.; Alsop, R. J.; Rose, M.; Hertz, L.; Dhaliwal, A.; Moran-Mirabal, J. M.; Verschoor, C. P.; Bowdish, D. M. E.; Kaestner, L.; Wagner, C.; Rheinstädter, M. C. *Sci. Rep.* **2017**.
- (37) Palmieri, F.; Indiveri, C.; Bisaccia, F.; Iacobazzi, V. In *Métodos en Enzimología*; 1995; pp 349–369.
- (38) Rath, A.; Glibowicka, M.; Nadeau, V. G.; Chen, G.; Deber, C. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (6), 1760–1765.
- (39)
- (40) Papaneophytou, C. P.; Kontopidis, G. *Protein Expression and Purification*. 2014.
- (41) García-Fruitós, E. *Microbial Cell Factories*. 2010.
- (42) Rinas, U.; Bailey, J. E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**.
- (43)
- (44) HARTLEY, D. L.; KANE, J. F. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**.
- (45) Miroux, B.; Walker, J. E. *Over-production of Proteins in Escherichia coli: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels*; 1996; Vol. 260.
- (46) Bernaudat, F.; Frelet-Barrand, A.; Pochon, N.; Dementin, S.; Hivin, P.; Boutigny, S.; Rioux, J. B.; Salvi, D.; Seigneurin-Berny, D.; Richaud, P.; Joyard, J.; Pignol, D.; Sabaty, M.; Desnos, T.; Pebay-Peyroula, E.; Darrouzet, E.; Vernet, T.; Rolland, N. *PLoS One* **2011**.

-
- (47) Dvir, H.; Choe, S. *Protein Expr. Purif.* **2009**.
- (48) Revzin, L. D. .
- (49) Rawlings, A. E. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44* (3).
- (50) Hamakubo, T.; Kusano-Arai, O.; Iwanari, H. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2014**.
- (51) Yagi, H.; Masuko, T. *YAKUGAKU ZASSHI* **2013**, *133* (9), 939–945.
- (52) abchain, B. **2014**.
- (53) Jespersen, M. C.; Peters, B.; Nielsen, M.; Marcatili, P. *Nucleic Acids Res.* **2017**.
- (54) Saha, S.; Raghava, G. P. S. 2010.
- (55) Füsseder, N.; Sette, A.; Ponomarenko, J.; Bourne, P. E.; Bui, H.-H.; Li, W.; Peters, B. *BMC Bioinformatics* **2008**.
- (56) Bradley, P.; Misura, K. M. S.; Baker, D. *Science (80-.)*. **2005**.
- (57) Simons, K. T.; Kooperberg, C.; Huang, E.; Baker, D. *Assembly of Protein Tertiary Structures from Fragments with Similar Local Sequences using Simulated Annealing and Bayesian Scoring Functions*.
- (58) Zhang, Y. *BMC Bioinformatics* **2008**.
- (59) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *J. Comput. Chem.* **2004**.
- (60) Larsson, A.; Balow, R.-M.; Lindahl, T. L.; Forsberg, P.-O. *Chicken Antibodies: Taking Advantage of Evolution-A Review*.
- (61) Hendriksen, C.; Erhard, M.; Larsson, A. *The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21 Refinement of the care and use of laboratory ferrets (Mustela putorius furo) View project*; 2016.
- (62) Fischer, G.; Lima, M. de; Vargas, G. D.; Esteves, P. A.; Hübner, S. de O.; Munhoz, L. S. *Ciência Rural* **2014**.

- (63) Chalghoumi, R.; Beckers, Y.; Portetelle, D.; Théwis, A. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2009**, *13* (2), 295–308.
- (64) Olarte, A.; Clavijo, C.; Díaz, H. **2011**, *78*, 174–182.
- (65) Leenaars, M.; Hendriksen, C. F. M. *Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations*.
- (66) Quiza, M.; Downton, M.; Perry, K. J.; Sexton, P. M. *Endocrinology* **1997**.
- (67) Donovan, A.; Wang, H.; Delaby, C.; Canonne-Hergaux, F.; Gros, P. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2005**.
- (68) El-Guindy, A. S.; Lee, Y.; Gradoville, L.; Miller, G.; Gerlach, J.; Nikiforow, S.; Shedd, D.; Viswanathan, S. R.; Dela Cruz, C. S. *J. Exp. Med.* **2004**.
- (69) Selcuk Unal, E.; Zhao, R.; Qiu, A.; Goldman, I. D. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2008**.
- (70) Castilho, A.; Beihammer, G.; Pfeiffer, C.; Göritzer, K.; Montero-Morales, L.; Vavra, U.; Maresch, D.; Grünwald-Gruber, C.; Altmann, F.; Steinkellner, H.; Strasser, R. *Plant Biotechnol. J.* **2018**.
- (71) Stanley, P.; Schachter, H.; Taniguchi N. In *Essentials of Glycobiology*; Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., Ed.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press: California, 2009.
- (72) Izquierdo, L.; Atrih, A.; Rodrigues, J. A.; Jones, D. C.; Ferguson, M. A. J. *Eukaryot. Cell* **2009**.
- (73) Brockhausen, I.; Schachter, H.; Stanley, P. In *Essentials of Glycobiology*; Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., Ed.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press: California, 2009.
- (74) Freeze, H.; Haltiwanger, R. In *Essentials of Glycobiology*; Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., Ed.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press: California, 2009.
- (75) Kelley, L. A.; Mezulis, S.; Yates, C. M.; Wass, M. N.; Sternberg, M. J. E. *Nat. Protoc.* **2015**.

-
- (76) Dobson, L.; Reményi, I.; Tusnády, G. E. *Nucleic Acids Res.* **2015**.
- (77) van Roermund, C. W. T.; Drissen, R.; van den Berg, M.; Ijlst, L.; Hettema, E. H.; Tabak, H. F.; Waterham, H. R.; Wanders, R. J. A. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *21* (13), 4321–4329.
- (78) Nakagawa, T.; Imanaka, T.; Morita, M.; Ishiguro, K.; Yurimoto, H.; Yamashita, A.; Kato, N.; Sakai, Y. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (5), 3455–3461.
- (79) Palmieri, F.; Rieder, B.; Ventrella, A.; Blanco, E.; Do, P. T.; Nunes-Nesi, A.; Trauth, a U.; Fiermonte, G.; Tjaden, J.; Agrimi, G.; Kirchberger, S.; Paradies, E.; Fernie, A. R.; Neuhaus, H. E. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (45), 31249–31259.
- (80) Colasante, C.; Alibu, V. P.; Kirchberger, S.; Tjaden, J.; Clayton, C.; Voncken, F. *Eukaryot. Cell* **2006**, *5* (8), 1194–1205.
- (81) Mondal, S.; Roy, J. J.; Bera, T. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2014**, *46* (5), 395–402.
- (82) Dey, R.; Meneses, C.; Salotra, P.; Kamhawi, S.; Nakhasi, H. L.; Duncan, R. *Mol. Microbiol.* **2010**, *77* (2), 399–414.
- (83) Subramanian, A.; Jhavar, J.; Sarkar, R. R. *PLoS One* **2015**, *10* (9).
- (84) Michels, P. A. M.; Bringaud, F.; Herman, M.; Hannaert, V. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier 2006, pp 1463–1477.
- (85) Todisco, S.; Agrimi, G.; Castegna, A.; Palmieri, F. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (3), 1524–1531.
- (86) van Roermund, C. W. T.; Schroers, M. G.; Wiese, J.; Facchinelli, F.; Kurz, S.; Wilkinson, S.; Charton, L.; Wanders, R. J. A.; Waterham, H. R.; Weber, A. P. M.; Link, N. *Plant Physiol.* **2016**, *171* (3), 2127–2139.
- (87) Kunji, E. R. S. In *FEBS Letters*; 2004; Vol. 564, pp 239–244.
- (88) Ruprecht, J. J.; Hellowell, A. M.; Harding, M.; Crichton, P. G.; McCoy, A. J.; Kunji, E. R. S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (4), E426–E434.
- (89) Froschauer, E. M.; Rietzschel, N.; Hassler, M. R.; Binder, M.; Schweyen, R. J.; Lill, R.; Mühlenhoff, U.; Wiesenberger, G. *Biochem. J.* **2013**, *455* (1), 57–65.
- (90) Rothnie, A. J.; Patel, A.; Bill, R. M.; Routledge, S. J.; Wilks, M. D. B.; Mikaliunaite, L.;

- Low, F.; Bawa, Z.; Clare, M.; Hardy, D.; Cartwright, S. P. *Methods* **2015**.
- (91) Lu, Y.; Liu, J. *Front. Biol. China* **2007**, 2 (3), 247–255.
- (92) DOĞRU PEKİNER, B. *Ankara Univ. Eczac. Fak. Derg.* **2014**, 169–182.
- (93) Kuypers, F. A. *Curr. Mol. Med.* **2008**, 8 (7), 633–638.
- (94) Chico, Y.; Lafita, M.; Ramírez-Duque, P.; Merino, F.; Ochoa, B. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2000**, 1502 (3), 380–390.
- (95) Murray, D. T.; Griffin, J.; Cross, T. A. *Biochemistry* **2014**, 53 (15), 2454–2463.
- (96) Parmar, M. M.; Edwards, K.; Madden, T. D. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1999**, 1421 (1), 77–90.
- (97) Dvir, H.; Choe, S. *Protein Expr. Purif.* **2009**, 68 (1), 28–33.
- (98) Alves, N. S.; Astrinidis, S. A.; Eisenhardt, N.; Sieverding, C.; Redolfi, J.; Lorenz, M.; Weberruss, M.; Moreno-Andrés, D.; Antonin, W. *Sci. Rep.* **2017**, 7.