



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DE UN CANDIDATO A  
TRANSPORTADOR DE NAD<sup>+</sup> EN EL  
PARÁSITO PROTOZOARIO  
*Trypanosoma cruzi***

**Miguel Esteban Chacón Gómez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá D.C., Colombia  
2021



# **EVALUACIÓN DE UN CANDIDATO A TRANSPORTADOR DE NAD<sup>+</sup> EN EL PARÁSITO PROTOZOARIO *Trypanosoma cruzi***

**Miguel Esteban Chacón Gómez**

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

Directora:

María Helena Ramírez Hernández *Dr. rer. nat*

Línea de Investigación:

Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica - LIBBIQ

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2021



*“El secreto de la genialidad es el de conservar el espíritu del niño hasta la vejez, lo cual quiere decir nunca perder el entusiasmo”*

*“Las palabras pueden ser como rayos X si se usan apropiadamente: lo atraviesan todo.”*

*Aldous Huxley*



## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, espacio que con su excelencia y carácter diverso me ha dotado de herramientas que me acompañarán el resto de mi vida, y que me ha convencido de que siempre debemos buscar ser un factor de cambio positivo para la sociedad; a los empleados de las diferentes dependencias de la universidad, y con especial cariño a los profesores y demás miembros de los departamentos de Biología y Química, quienes me han acompañado y guiado a lo largo de mi proceso formativo.

A la Facultad de Ciencias y a la Beca Auxiliar Docente que me permitieron adelantar mis estudios de maestría, al igual que a la DIB por la financiación del proyecto código 42176 “Explorando el metabolismo del NAD<sup>+</sup> de parásito protozoos: En busca de blancos terapéuticos promisorios para el tratamiento de enfermedades infecciosas de alta incidencia en la salud pública”.

Al Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica-LIBBIQ por abrirme sus puertas, por proporcionarme los equipos, reactivos y asesoría que llegué a necesitar. A la profesora María Helena Ramírez por su dirección, por su esfuerzo en mantener una excelente calidad docente ante toda circunstancia, por los pertinentes aportes que ayudaron a enriquecer este trabajo, y más importante, por inculcar el indagar y siempre ver más allá en cualquier situación. Al profesor Luis Ernesto Contreras por su invaluable colaboración en el planteamiento y análisis de los experimentos, al igual que por las nutridas discusiones en que muchas ideas fueron concretadas.

A Rosalba Guzmán, quien facilitó el funcionamiento del grupo de investigación y estuvo al frente de las labores administrativas; a la doctora Magda Alvarado por sus recomendaciones durante la ejecución de esta investigación; y también, a todos los

miembros del LIBBIQ con los que tuve la oportunidad de compartir durante este tiempo, por los aprendizajes conjuntos, y por el apoyo recibido.

Agradezco a mis padres Yolanda y Luis Alberto, a mis abuelos Ana Cecilia y Miguel Ángel, y a mis hermanos Ángela, Oscar, Luis Carlos y Diego por brindarme absolutamente todo, y por siempre ayudarme a encontrar el bienestar, son la raíz de quien soy y de todo lo que he conseguido, este trabajo también es de ustedes. También a Juan Camilo por su amistad.

A Jeraldyn le manifiesto, con mi más profundo cariño y amor, el agradecimiento por estar conmigo en este proceso, por el apoyo incondicional prestado, por la paciencia y los consejos brindados, por ayudarme a encontrar motivación e inspiración en los momentos críticos, por ser mi compañera y la persona con quien he ido materializando grandes logros. Es un gusto inmenso recorrer el sendero de conocimiento, del aprendizaje y del crecimiento personal con una mujer tan valiosa y llena de atributos excepcionales.

Por último, a todas las situaciones que me han traído hasta este punto, y a las herramientas que me permiten interpretar y comprender mi entorno.

## Resumen

### EVALUACIÓN DE UN CANDIDATO A TRANSPORTADOR DE NAD<sup>+</sup> EN EL PARÁSITO PROTOZOARIO *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* causa la enfermedad de Chagas, patología distribuida globalmente y carente de tratamientos efectivos, lo que hace pertinente la búsqueda de estrategias alternas de control. La dinámica del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>) es determinante en la homeostasis celular, y, las proteínas que participan en ella son promisorios blancos farmacológicos. La síntesis del NAD<sup>+</sup> es citosólica en *T. cruzi*, por lo que un sistema intracelular de distribución debe existir; proteínas de la Familia de Transportadores Mitocondriales (MCF) cumplen esta función en eucariotas, y se espera que el parásito cuente con homólogos capaces de movilizar al dinucleótido.

Tres secuencias candidato a transportador de NAD<sup>+</sup> de *T. cruzi* fueron caracterizadas; el estudio *in silico* de las proteínas TcNdt1 y TcNdt2 mostró que estructuralmente conservan características de la MCF, y por *docking* molecular se determinó que están dotadas de elementos capaces de interactuar específicamente con el dinucleótido. Por su parte, el candidato TcNdt3 es una proteína atípica de la MCF con una duplicación de sus elementos estructurales. En los 3 candidatos se predice una localización mitocondrial o glicosomal, al igual que la presencia sitios blanco de modificaciones postraduccionales.

Ensayos de complementación realizados con las cepas  $\Delta ndt1$  y  $\Delta ndt2$  de *Saccharomyces cerevisiae* mostraron que TcNdt1 y TcNdt2 reestablecen el crecimiento rezagado de los mutantes en medio no fermentable, comprobando su actividad transportadora de NAD<sup>+</sup>. De forma complementaria, se desarrolló el sistema de expresión MISTIC que media la inserción de proteínas en membranas de *E. coli*, y se adelantaron ensayos piloto de transporte del dinucleótido.

Empleando un antígeno recombinante generado en *E. coli* se produjeron IgY que permitieron la detección por inmunofluorescencia de la TcNdt2 endógena sobre epimastigotes de *T. cruzi*, indicando que presenta localización posiblemente glicosomal asociada a tráfico vesicular. Adicionalmente, se evaluó la expresión de un fragmento de la RVG del virus de la rabia en *S. cerevisiae*, donde fue posible obtener un patrón de reconocimiento diferencial en la inmunodetección, el cual es atribuible a la expresión de la recombinante en el modelo eucariota.

Los resultados obtenidos en este estudio constituyen un aporte importante para entender la simplificación en el metabolismo del NAD<sup>+</sup> en parásitos intracelulares, y sus relaciones con el hospedero.

**Palabras clave:** membrana, intracelular, bioinformática, proteínas recombinantes, ensayos de complementación, anticuerpos.

## Abstract

### EVALUATION OF A NAD<sup>+</sup> CARRIER CANDIDATE IN THE PROTOZOAN PARASITE *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease, a disease that has a worldwide distribution and lacks effective treatments, making it pertinent to look for alternate control strategies. The nicotinamide-adenine nucleotide (NAD<sup>+</sup>) dynamics determines cell homeostasis, and the proteins involved in it are interesting pharmacological targets. NAD<sup>+</sup> synthesis is cytosolic in *T. cruzi*, and therefore, an intracellular distribution system should exist; proteins belonging to the Mitochondrial Carrier Family (MCF) fulfill this role in eukaryotes, and it is expected that the parasite has MCF homologues able to transport the dinucleotide.

Three NAD<sup>+</sup> carrier candidate sequences from *T. cruzi* were studied; *in silico* analysis of the *TcNdt1* and *TcNdt2* protein showed that typical structural features from the MCF are conserved in these proteins, and, through molecular docking, it was found that they are both endowed with structural elements able to interact specifically with the dinucleotide. On the other hand, the *TcNdt3* candidate is an atypical MCF protein that shows a complete duplication of its structural elements. The 3 candidate sequences are predicted to have a mitochondrial or glycosomal localization, and throughout the *TcNdt1*, *TcNdt2* and *TcNdt3* sequences post-translational modification sites are predicted.

Complementation assays carried out with the *Saccharomyces cerevisiae* mutant strains  $\Delta ndt1$  and  $\Delta ndt2$ , showed that the *TcNdt1* and *TcNdt2* sequences reestablish yeast cell growth on a non-fermentable media, supporting that the *T. cruzi* proteins are functional NAD<sup>+</sup> carriers. As a complementary approach, the MISTIC expression system, that mediates recombinant protein insertion in *E. coli* membranes, was developed, and pilot dinucleotide transport assays were performed.

Using a recombinant antigen produced in *E. coli*, specific IgY against *TcNdt2* were raised, which allowed for the endogenous carrier recognition through immunofluorescence on *T. cruzi* epimastigotes, showing that the NAD<sup>+</sup> carrier has a glycosomal localization, linked to the vesicular transport. Further, the expression of a recombinant fragment derived from the rabies virus RVG protein was evaluated in *S. cerevisiae*, and at the immunodetection a differential recognition pattern was obtained, which can be attributed to the recombinant protein production in the eukaryotic system.

The results obtained in this study make for an important contribution for the understanding of the NAD<sup>+</sup> metabolism simplification that occurred in the intracellular parasites, and for the understanding of the host-parasite interactions.

**Keywords:** membrane, intracellular, bioinformatics, recombinant proteins, complementation assays, antibodies.



# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Marco teórico</b> .....	<b>3</b>
1.1 El modelo de estudio: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
1.1.1 Morfología.....	4
1.1.2 Ciclo de vida.....	5
1.2 El NAD <sup>+</sup> : una molécula esencial para la supervivencia celular.....	6
1.2.1 Síntesis del NAD <sup>+</sup> .....	6
1.2.2 Proteínas transportadoras de NAD <sup>+</sup> y de sus precursores.....	8
1.3 Familia de transportadores mitocondriales (MCF).....	9
1.3.1 Características generales y mecanismo de transporte.....	9
1.3.2 Transportadores de NAD <sup>+</sup> y su rol en la función celular.....	12
1.3.3 Localización de proteínas de la MCF.....	14
1.4 Estrategias implementadas en el estudio de proteínas transportadoras de nucleótidos.....	16
1.5 Panorama de los MCs en trypanosomátidos.....	17
1.6 Expresión de la glicoproteína del virus de la rabia (RVG) en el sistema eucariota <i>S. cerevisiae</i> .....	18
<b>2. Preguntas de investigación</b> .....	<b>21</b>
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>23</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>25</b>
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
4.3 Objetivos adicionales.....	25
<b>5. Metodología</b> .....	<b>27</b>
5.1 Aproximación <i>in silico</i> .....	27
5.2 Aproximación experimental.....	28
5.2.1 Diseño de <i>primers</i> para amplificar fragmentos de interés.....	29
5.2.2 Diseño de un sistema que permita determinar la funcionalidad de las proteínas candidato a transportador de NAD <sup>+</sup> <i>TcNdt2</i> y <i>TcNdt3</i> empleando transportadores previamente identificados.....	29
5.2.3 Obtención de la proteína candidato a transportador de NAD <sup>+</sup> <i>TcNdt2</i> mediante la tecnología de proteínas recombinantes en el sistema heterólogo <i>E. coli</i> .....	37
5.2.4 Determinación de la presencia del candidato a transportador de NAD <sup>+</sup> <i>TcNdt2</i> en <i>T. cruzi</i> haciendo uso de herramientas inmunológicas.....	39

5.3	Expresión de la RVG en el sistema heterólogo eucariota <i>S. cerevisiae</i> .....	43
<b>6.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>46</b>
	Aproximación <i>in silico</i> .....	46
6.1	Los candidatos <i>TcNdt1</i> , <i>TcNdt2</i> y <i>TcNdt3</i> presentan características de la MCF en su estructura primaria .....	46
6.2	Se predice una localización mitocondrial o glicosomal para los candidatos <i>TcNdt1</i> , <i>TcNdt2</i> y <i>TcNdt3</i> .....	49
6.3	<i>TcNdt1</i> y <i>TcNdt2</i> presentan estructuras secundaria y terciaria propias de proteínas de la MCF .....	51
6.4	Las secuencias candidato <i>TcNdt1</i> , <i>TcNdt2</i> y <i>TcNdt3</i> presentan sitios blanco de posibles modificaciones postraduccionales .....	56
	Aproximación experimental .....	58
6.5	<i>TcNdt1</i> y <i>TcNdt2</i> son transportadores de NAD <sup>+</sup> : evaluación funcional mediante ensayos de complementación en mutantes de <i>S. cerevisiae</i> .....	58
6.5.1	Generación de los vectores recombinantes pYES2- <i>TcNdt1</i> y pYES2- <i>TcNdt259</i>	
6.5.2	<i>TcNdt1</i> y <i>TcNdt2</i> son transportadores de NAD <sup>+</sup> debido a que rescatan el crecimiento de los mutantes $\Delta ndt1$ y $\Delta ndt2$ de <i>S. cerevisiae</i> .....	60
6.6	Desarrollo de un sistema de expresión de <i>TcNdt1</i> y <i>TcNdt2</i> en membranas de <i>E. coli</i> para su estudio funcional empleando la proteína MISTIC .....	65
6.6.1	Generación de los plásmidos de expresión pET28-MISTIC.....	65
6.6.2	Establecimiento de condiciones de expresión de las proteínas MISTIC- Ndt recombinantes en <i>E. coli</i> .....	67
6.6.3	Ensayos piloto de transporte de NAD <sup>+</sup> de las proteínas recombinantes Ndt empleando alcohol deshidrogenasa (ADH).....	71
6.7	La proteína <i>TcNdt2</i> se expresa empleando el vector recombinante pETSUMO- <i>TcNdt2</i> en el sistema <i>E. coli</i> .....	73
6.7.1	Construcción del vector de expresión pETSUMO- <i>TcNdt2</i> .....	73
6.7.2	Expresión de la proteína recombinante 6xHis-SUMO- <i>TcNdt2</i> .....	74
6.8	Una herramienta inmunológica desarrollada en modelo aviar permite determinar que <i>TcNdt2</i> es una proteína mitocondrial de <i>T. cruzi</i> .....	75
6.8.1	Obtención del antígeno requerido mediante expresión a gran escala de 6xHis-SUMO- <i>TcNdt2</i> .....	75
6.8.2	IgY $\alpha$ -6xHis-SUMO- <i>TcNdt2</i> provenientes de suero y yemas de huevo reconocen específicamente al antígeno recombinante .....	77
6.8.3	Detección de la proteína endógena mediante <i>western blot</i> e inmunofluorescencia .....	81
6.9	Aproximación a la expresión del ED de la RVG en el sistema eucariota <i>S. cerevisiae</i> .....	85
6.9.1	Construcción del vector recombinante pYES2-RVG.....	85
6.9.2	Evaluación de la expresión del ED de la RVG recombinante en <i>S. cerevisiae</i> INVSc1 .....	87
<b>7.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>89</b>
7.1	Conclusiones .....	89
7.2	Perspectivas .....	90
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>99</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>FIGURA 1. A, COMPONENTES CELULARES DE <i>T. CRUZI</i> Y ESTADIOS MORFOLÓGICOS</b> .....	6
<b>FIGURA 2. ESTRUCTURA Y SÍNTESIS DEL NAD<sup>+</sup></b> .....	7
<b>FIGURA 3. DINÁMICAS DE TRANSPORTE DEL NAD<sup>+</sup> EN ORGANISMOS PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS</b> .....	9
<b>FIGURA 4. ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS DE LA MCF</b> .....	10
<b>FIGURA 5. MECANISMO DE TRANSPORTE POR ANTIPOORTE DE PROTEÍNAS DE LA MCF, EJEMPLO DEL TRANSPORTADOR AAC DE <i>S. CEREVISIAE</i>.</b> .....	11
<b>FIGURA 6. IMPORTE Y LOCALIZACIÓN DE TRANSPORTADORES DE LA MCF Y OTRAS PROTEÍNAS EN MEMBRANAS</b> .....	15
<b>FIGURA 7. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA RABIA</b> .....	19
<b>FIGURA 8. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS DE TRANSPORTADORES DE NAD<sup>+</sup> Y DE LOS CANDIDATOS <i>TCNDT1</i> Y <i>TCNDT2</i></b> .....	48
<b>FIGURA 9. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS DE TRANSPORTADORES DE NAD<sup>+</sup>, PROTEÍNAS DE LA MCF PEROXISOMALES Y DE LOS CANDIDATOS <i>TCNDT1</i> Y <i>TCNDT2</i></b> .....	50
<b>FIGURA 10. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TOPOLOGÍA DE LOS CANDIDATOS A TRANSPORTADOR DE NAD<sup>+</sup> <i>TCNDT1</i>, <i>TCNDT2</i>, Y <i>TCNDT3</i></b> .....	51
<b>FIGURA 11. MODELOS DE ESTRUCTURA TERCIARIA DE <i>TCNDT1</i>, <i>TCNDT2</i> Y <i>TCNDT3</i></b> .....	52
<b>FIGURA 12. PREDICCIÓN DE INTERACCIONES IMPLICADAS EN EL MECANISMO DE TRANSPORTE DEL NAD<sup>+</sup> DE <i>TCNDT1</i> Y <i>TCNDT2</i></b> .....	55
<b>FIGURA 13. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES PREDICHAS PARA LOS CANDIDATOS <i>TCNDT1</i>, <i>TCNDT2</i> Y <i>TCNDT3</i></b> .....	57
<b>FIGURA 14. GENERACIÓN DEL PYES2-<i>TCNDT1</i> MEDIANTE SUB-CLONACIÓN</b> .....	59
<b>FIGURA 15. GENERACIÓN DEL PYES2-<i>TCNDT2</i> MEDIANTE SUB-CLONACIÓN</b> .....	60
<b>FIGURA 16. EVALUACIÓN DE TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS <math>\Delta</math><i>NDT1</i> Y <math>\Delta</math><i>NDT2</i> DE <i>S. CEREVISIAE</i></b> .....	62
<b>FIGURA 17. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN CON EL MUTANTE <math>\Delta</math><i>NDT1</i> DE <i>S. CEREVISIAE</i></b> .....	63
<b>FIGURA 18. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN CON EL MUTANTE <math>\Delta</math><i>NDT2</i> DE <i>S. CEREVISIAE</i></b> .....	64
<b>FIGURA 19. GENERACIÓN DE LOS PET28-MISTIC RECOMBINANTES MEDIANTE SUB-CLONACIÓN</b> .....	66
<b>FIGURA 20. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MISTIC-<i>TCNDT1</i>, MISTIC-<i>TCNDT2</i>, MISTIC- <math>\Delta</math><i>NDT2</i>, MISTIC-<math>\Delta</math><i>NDT1</i> Y MISTIC-<math>\Delta</math><i>NDT2</i></b> .....	68
<b>FIGURA 21. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MISTIC-<i>TCNDT1</i> Y MISTIC-<i>TCNDT2</i> EN LAS CEPAS BL21 Y CODONPLUS DE <i>E. COLI</i></b> .....	69
<b>FIGURA 22. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE IPTG EN LA EXPRESIÓN DE MISTIC-<i>TCNDT2</i></b> .....	70
<b>FIGURA 23. ENSAYO PRELIMINAR DE TRANSPORTE INDIRECTO DE NAD<sup>+</sup> CON LA ADH</b> .....	72
<b>FIGURA 24. OBTENCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN PETSUMO-<i>TCNDT2</i></b> .....	74

---

<b>FIGURA 25.</b> EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 6XHis-SUMO-TCNDT2 (48 kDa) EN EL SISTEMA HETERÓLOGO <i>E. COLI</i> .....	75
<b>FIGURA 26.</b> EXPRESIÓN A GRAN ESCALA Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE 6XHis-SUMO-TCNDT2 .....	76
<b>FIGURA 27.</b> CARACTERIZACIÓN DE LOS SUEROS A-6XHis-SUMO-TCNDT2 PROVENIENTES DE SANGRÍAS DE LA GALLINA INOCULADA .....	78
<b>FIGURA 28.</b> PURIFICACIÓN DE IGY Y DETERMINACIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS DE ELISA .....	79
<b>FIGURA 29.</b> MONITOREO DE LA PRODUCCIÓN DE IGY A-6XHis-SUMO-TCNDT2 .....	80
<b>FIGURA 30.</b> EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA TCNDT2 ENDÓGENA EN EXTRACTOS DE PROTEÍNA DE <i>T. CRUZI</i> .....	82
<b>FIGURA 31.</b> INMUNODETECCIÓN DE LA TCNDT2 ENDÓGENA MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i> .....	83
<b>FIGURA 32.</b> INMUNODETECCIÓN DE LA TCNDT2 ENDÓGENA MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL EN EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i> .....	85
<b>FIGURA 33.</b> GENERACIÓN DEL PYES2-RVG MEDIANTE SUB-CLONACIÓN .....	86
<b>FIGURA 34.</b> GENERACIÓN DE TRANSFECTANTES CON PYES2-RVG Y EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE EXPRESIÓN DEL ED (48 kDa) EN <i>S. CEREVISIAE</i> .....	88

## Lista de tablas

	Pág.
<b>TABLA 1.</b> CARACTERÍSTICAS DE <i>PRIMERS</i> DISEÑADOS PARA LA APLICACIÓN DE FRAGMENTOS DE INTERÉS MEDIANTE PCR.....	29
<b>TABLA 2.</b> ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN DISEÑADO PARA LA PRODUCCIÓN DE IGY A-6XHis-SUMO-TCNDT2 EN GALLINA.....	40
<b>TABLA 3.</b> CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CANDIDATOS A TRANSPORTADOR DE NAD <sup>+</sup> TCNDT1, TCNDT2 Y TCNDT3, Y PREDICCIÓN DE DOMINIOS DE PROTEÍNA.....	47
<b>TABLA 4.</b> PREDICCIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS CANDIDATOS TCNDT1, TCNDT2 Y TCNDT3.....	49
<b>TABLA 5.</b> PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS TERCIARIAS DE TCNDT1, TCNDT2 Y TCNDT3 PREDICHAS POR ROBETTA.....	54
<b>TABLA 6.</b> LÍNEAS TRANSFECTANTES DE <i>S. CEREVISIAE</i> GENERADAS MEDIANTE TRANSFECCIÓN CON LOS PLÁSMIDOS PYES2.....	61
<b>TABLA 7.</b> PERFILES DE BANDEO ESPERADOS EN LA EVALUACIÓN POR RESTRICCIÓN PARA LOS PLÁSMIDOS PET28-MISTIC RECOMBINANTES CONSTRUIDOS.....	67

## Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
A	Adenina
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico) sal de diamonio
ATP	Adenosina trifosfato
C	Citosina
cDNA	DNA complementario
C-terminal	Carboxi terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
e.g.	Por ejemplo, del latín <i>Exempli gratia</i>
EC	Código enzimático
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
G	Guanina
gDNA	DNA genómico
gRNA	RNA guía
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	H <sub>2</sub> O destilada desionizada
HRP	Peroxidasa de rábano
IgG	Inmunoglobulina G
IgY	Inmunoglobulina Y
IRAK-1	Quinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1
JAK-2	Janus quinasa 2
kb	Kilo pares de bases de DNA
kcal	Kilocaloria
kDa	KiloDalton
kDNA	DNA de kinetoplasto
LB	Medio Luria Bertani
LiAc	Acetato de litio
M	Molar
mA	Miliamperios

---

Mb	Mega pares de bases de DNA
MCF	<i>Mitochondrial Carrier Family</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
N-terminal	Amino terminal
OD	Densidad óptica
pb	Par de bases de DNA
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenglicol
PTP	Proteína tirosina fosfatasa
RMSD	<i>Root-mean-square deviation of atomic positions</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SHP	<i>Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase</i>
ssDNA	DNA de cadena sencilla
STAT-1	Traductor de la señal y activador de la transcripción 1
SUMO	Modificador pequeño similar a la ubiquitina
T	Timina
T <sub>m</sub>	Temperatura de <i>melting</i>
tRNA	RNA de transferencia
U	Uracilo
U*	Unidades de enzima
$\Delta$	Mutante del gen relacionado



# Introducción

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, y se presenta de manera endémica en 22 países de América (principalmente Latinoamérica), y de manera no endémica en Norteamérica, Europa, Asia y Australia. Para el año 2017 se estimaba en cerca de 10 millones a las personas infectadas con *T. cruzi* en la zona endémica (perteneciendo cerca de 1'000.000 de casos a Colombia) y en 400.000 a aquellas en zonas no endémicas, y se calcula que entre 60 y 80 millones de personas estarían en riesgo de contagio alrededor del mundo, representando este parásito un problema de salud pública global. Esta enfermedad es considerada desatendida, y su incidencia está fuertemente ligada con las condiciones socioeconómicas de las zonas donde se manifiesta, siendo más vulnerables las poblaciones rurales de difícil acceso, que históricamente han sido abandonadas por el estado, y en las que también puede existir conflicto armado; estos contextos se traducen en falta de garantías para el acceso a los servicios de salud<sup>1,2</sup>.

La adquisición del parásito es el primer paso en el desarrollo de la enfermedad de Chagas; de manera natural, sucede tras la picadura de un triatomino de la familia Reduviidae infectado con *T. cruzi*, allí el insecto transfiere los tripomastigotes presentes en los excrementos, y estos posteriormente entran en contacto con el sitio de la picadura, ingresando así al torrente sanguíneo del hospedero. De manera alterna, también puede darse transmisión de manera materno-fetal, por transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos, relaciones sexuales, por accidentes de laboratorio, o de manera oral al comer alimentos contaminados con *T. cruzi*<sup>3</sup>. Una vez circulando en la sangre, los parásitos ingresarán a las células y allí proliferarán progresivamente, infectando principalmente células del corazón, del sistema digestivo y del tejido nervioso.

La patología causada por estos ciclos de infección se desarrolla en dos fases, una aguda o temprana, y una crónica, que dura el resto de la vida del hospedero; de igual manera, puede derivar en las formas indeterminada, cardíaca, digestiva o cardio-digestiva. En sus diferentes formas el progreso de la enfermedad lleva a un continuo deterioro en la calidad de vida hasta causar la muerte del individuo<sup>4</sup>. La diagnosis de la enfermedad resulta ser compleja, requiere de un conjunto de pruebas parasitológicas y serológicas de alto costo que necesitan una infraestructura especializada; adicionalmente, la enfermedad suele ser asintomática hasta llegar a un punto muy avanzado, por lo que muchas personas infectadas no se realizan pruebas para detectar a tiempo el parásito. Por lo anterior, se estima que el 95% de casos de enfermedad de Chagas en fase aguda no son detectados, y que el 50% de los mismos no se detectan en fase crónica<sup>5</sup>.

En cuanto al tratamiento de la enfermedad, actualmente no se cuenta con una cura, cuando es detectada, se emplean los anti-tripanosomales nifurtimox y benzonidazol, medicamentos que tienen una efectividad diferencial entre pacientes (también depende de la variante poblacional de *T. cruzi* infectante). Estos fármacos son requeridos en altas dosis y por períodos prolongados de tiempo, no eliminan por completo los parásitos del hospedero y solo consiguen disminuir la presencia de *T. cruzi* en el torrente sanguíneo. Ambos medicamentos han mostrado ser generadores de importantes efectos secundarios, afectando fuertemente al sistema nervioso, causando dermatitis, desórdenes alimenticios, insomnio, e incluso llegando a ser mutagénicos<sup>6</sup>.

Teniendo en cuenta que las estrategias empleadas hasta el momento consiguen un control limitado sobre el parásito, es válido afirmar que ahondar en la biología de *T. cruzi* impulsaría la búsqueda de nuevas soluciones más adecuadas a esta problemática. En el contexto del metabolismo energético se dan importantes dinámicas que determinan la viabilidad celular, y su estudio se ha constituido en un novedoso y promisorio campo de investigación; este entendimiento da luz sobre cuales elementos son cruciales para la supervivencia del parásito y podrían llegar a ser blancos terapéuticos, impulsando el diseño racional de nuevos tratamientos. En este trabajo se aborda concretamente la búsqueda y la caracterización de transportadores del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>) entre los compartimentos celulares de *T. cruzi*, dinámica que en otros organismos es mediada por proteínas especializadas.

# 1. Marco teórico

*T. cruzi* pertenece al grupo de los protozoarios, organismos que surgieron temprano en la evolución de los eucariotas, y que en la actualidad ocupan innumerables hábitats y han desarrollado estrategias de vida muy diversas<sup>7</sup>. Los protozoarios pueden ser clasificados en organismos de vida libre y de vida parasitaria, y a su vez, los parásitos pueden subdividirse en extracelulares (e.g. *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* y *Trypanosoma brucei*) y en intracelulares (e.g. *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* spp. y *T. cruzi*). A lo largo de su evolución, trypanosomátidos como aquellos de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* han establecido estrechas relaciones con otros organismos presentes en su entorno, llegando a desarrollar un ciclo de vida complejo, en el que se requiere de dos hospederos para poder completarlo, uno artrópodo (que funciona como vector), y otro vertebrado (en donde se completa)<sup>8</sup>.

En los trypanosomátidos se han descrito estrategias que les permiten disminuir la respuesta inmune del hospedero, y a la vez, obtener los recursos necesarios para sobrevivir, a continuación, se mencionan algunas de ellas: (1) *T. brucei* presenta una monocapa de glicoproteína variable de superficie (VSG) implicada en la evasión de las respuestas humoral e innata del sistema inmune; (2) los componentes de membrana de los trypanosomátidos (e.g. metaloproteasas) activan en el hospedero la expresión de genes como *PTP* o *SHP*, capaces de inhibir proteínas como JAK-2 e IRAK-1, implicadas en el procesamiento de factores clave en vías de señalización como STAT1 y NF- $\kappa$ B<sup>9</sup>, disminuyendo así la respuesta ante la invasión de la célula; (3) la formación del fagolisosoma que ocurre durante el ingreso de *Leishmania* spp. a la célula, es un evento que la reprograma para que a dicho compartimento sean enviadas proteínas para ser degradadas, al igual que iones y carbohidratos, garantizando una constante disponibilidad de estas moléculas; (4) para el caso de *T. cruzi*, este ingresa a la célula y permanece al interior de una vacuola parasitófora, allí recibirá estímulos que desencadenarán su salida al citoplasma, en donde tendrá a su disposición los nutrientes y precursores necesarios para sobrevivir<sup>10</sup>.

Dado que dentro del grupo de los protozoarios existe un sinfín de diversidad respecto a la biología y el desarrollo a lo largo del ciclo de vida, y teniendo en cuenta el papel protagónico de *T. cruzi* en este trabajo, a continuación, se hace una revisión más detallada de características como clasificación dentro de los organismos vivos, morfología y ciclo de vida.

## 1.1 El modelo de estudio: *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* es un parásito intracelular obligado, su clasificación sistemática dentro del árbol de la vida se ha hecho a partir de análisis de secuencias del gen 18S del rRNA, ubicándolo dentro del dominio Eukaryota, reino Protozoa, phylum Euglenozoa, clase Kinetoplástida, orden Trypanosomatida, familia Trypanosomatidae y género *Trypanosoma*<sup>11</sup>. Al pertenecer al grupo de los kinetoplástidos, presenta kinetoplasto, glicosomas, flagelos y *trans-splicing*<sup>12</sup>, elementos se detallarán más adelante. Tras la selección en 2005 de la cepa CL-Brener como referencia para la secuenciación del genoma de *T. cruzi*<sup>13</sup>, se determinó que es diploide, cuenta con 110 Mb organizadas en 20 a 46 cromosomas, y 22570 genes son codificados a partir del mismo<sup>14,15</sup>. Poco se conoce acerca de elementos de regulación de la transcripción en este organismo, se ha identificado que sus genes carecen de intrones y que se da *trans-splicing*, mecanismo en el que a múltiples genes que son transcritos simultáneamente se les adiciona una secuencia líder. En cuanto a regulación de la expresión génica, esta es principalmente postranscripcional, donde son importantes el editosoma (que media el proceso de edición) y elementos que aumentan o disminuyen la estabilidad del mRNA<sup>16</sup>.

### 1.1.1 Morfología

De manera general, la morfología del parásito (**Figura 1A**) se caracteriza por la presencia de un flagelo, núcleo central y una única mitocondria que se extiende por toda la célula<sup>17</sup>. En la superficie cuenta con una bicapa lipídica y una capa de microtúbulos subpelículas subyacente, estas dos estructuras están fuertemente asociadas entre sí<sup>18</sup>. A lo largo del cuerpo del parásito la superficie no es homogénea y se identifican tres regiones principales: cuerpo celular, flagelo y bolsillo flagelar. En la base del flagelo se encuentra un complejo de filamentos y proteínas llamado barra paraflagelar, indispensable para la unión del flagelo a la célula y para la movilidad celular<sup>17</sup>; el bolsillo flagelar es una invaginación de la membrana plasmática, es considerado una interfase entre la membrana del cuerpo celular y la membrana del flagelo, es una región especializada donde hay una alta actividad endo y exocítica, y es la única región que carece de capa subpelicular de microtúbulos<sup>18</sup>.

El parásito presenta particularmente organelos como el (1) acidocalcisoma, involucrado en el transporte de protones y calcio, mantenimiento del pH y osmorregulación, allí también se reservan calcio, magnesio, sodio, potasio, zinc, hierro, y fosfatos en forma de pirofosfatos y polifosfatos; (2) reservosoma, organelo de almacenamiento de macromoléculas adquiridas por endocitosis para su posterior uso; (3) citostoma, que participa en la adquisición de nutrientes y moléculas disueltas tanto dentro como fuera de las células hospedadoras, este se encuentra asociado al bolsillo flagelar; y (4) la vacuola contráctil, que participa en la regulación osmótica mediando cambios de volumen de la célula tras estrés osmótico y está involucrado en el tráfico de proteínas que se anclarán a la membrana plasmática<sup>17</sup>.

Los glicosomas son organelos que derivan evolutivamente de los peroxisomas, allí se localizan las enzimas encargadas de realizar los primeros pasos de la vía glucolítica y se llevan a cabo (de manera parcial) otros procesos metabólicos como la ruta de las pentosa fosfato, salvamento de purinas, síntesis de pirimidinas,  $\beta$ -oxidación y protección ante estrés oxidativo. Se ha determinado que el contenido enzimático de estos organelos cambia rápidamente a medida que el parásito avanza en su ciclo de vida, y que hay un recambio entre glicosomas viejos y nuevos cuando las condiciones del medio se alteran, por lo que son claves durante los procesos de infección y le otorgan a las células la capacidad de adaptarse eficientemente a nuevos ambientes. Se ha visto que los glicosomas del parásito en estado procíclico son más complejos y activos metabólicamente que aquellos del estado metacíclico<sup>19</sup>.

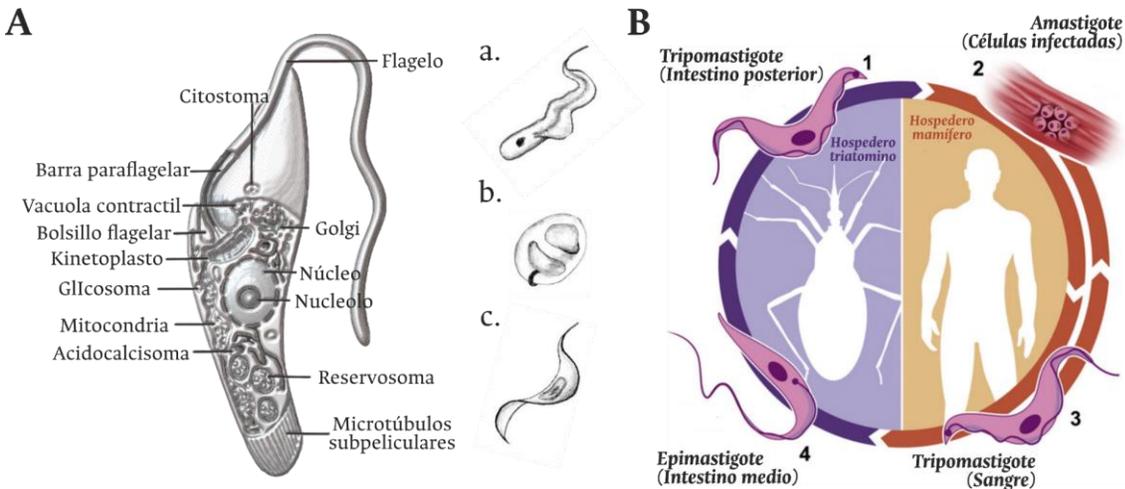
La mitocondria de *T. cruzi* es altamente ramificada, recorre toda la célula y varía su tamaño dependiendo del equilibrio energético y del estadio del ciclo de vida del parásito, siendo más activa en estado procíclico que en estado metacíclico<sup>18</sup>. En su interior se encuentra el kinetoplasto, un agregado alargado y denso de moléculas circulares de kDNA que está asociado a la base del flagelo, el cual representa el 30% del genoma celular y está compuesto por docenas de maxicírculos de ~50000 pb y miles de minicírculos de 600-2500 pb; los primeros codifican para rRNA y proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa, y a partir de los segundos se generan gRNA que participarán en la edición de los transcritos, que consiste en la adición de múltiples unidades de uracilo al mRNA<sup>17</sup>.

### 1.1.2 Ciclo de vida

La reproducción del parásito es clonal y no se conocen en mayor detalle los mecanismos naturales de intercambio genético entre individuos, sin embargo, en cultivos celulares se ha mostrado que la recombinación genética si ocurre<sup>20</sup>. *T. cruzi* es un organismo digenético, requiere de un insecto triatomino (principalmente de los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*) que funciona como vector, y de un mamífero, en el que el ciclo de vida se completa; cambios en la morfología celular se ven a lo largo del mismo. En la forma de amastigote, que es redondeada y pequeña, el flagelo está poco desarrollado, las células son infectivas y tienen la capacidad de reproducirse; en la de epimastigote, en forma de huso, tienen el flagelo lateral desarrollado y son capaces de dividirse en menor medida, pero no son infectivas; y en la de tripomastigote, son de forma alargada y muy delgada, tienen un flagelo lateral bien desarrollado, y son infectivas pero no pueden reproducirse<sup>17</sup> (**Figura 1B**).

Durante la picadura a un mamífero infectado con el parásito, el triatomino adquirirá tripomastigotes que irán a su tracto digestivo, allí se diferenciarán en epimastigotes y amastigotes que se replicarán en el estómago y el intestino, en el paso del recto se da una diferenciación a tripomastigotes que serán expulsados en las heces, e ingresarán por el sitio de la picadura cuando el insecto pique a un nuevo mamífero. En el mamífero los tripomastigotes infectarán inicialmente a los macrófagos, allí se diferenciarán en amastigotes que empezarán a proliferar, una vez la célula está llena de ellos, se da una

diferenciación a tripomastigotes seguida de la lisis celular; en esta última forma, los parásitos irán a infectar nuevas células y quedarán disponibles para ser tomados en un evento de picadura posterior<sup>18</sup> (**Figura 1B**).



**Figura 1. A**, componentes celulares de *T. cruzi* y estadios morfológicos: (a) epimastigote; (b) amastigote; (c) tripomastigote. **B**, ciclo de vida de *T. cruzi*: 1) tripomastigote ingresa al torrente sanguíneo de un humano; 2) invasión de células y proliferación de amastigotes; 3) tripomastigotes libres en sangre; 4) adquisición por parte del triatomino de tripomastigotes del humano infectado y posterior diferenciación a epimastigote. Tomado y adaptado de <sup>16 y 20</sup>.

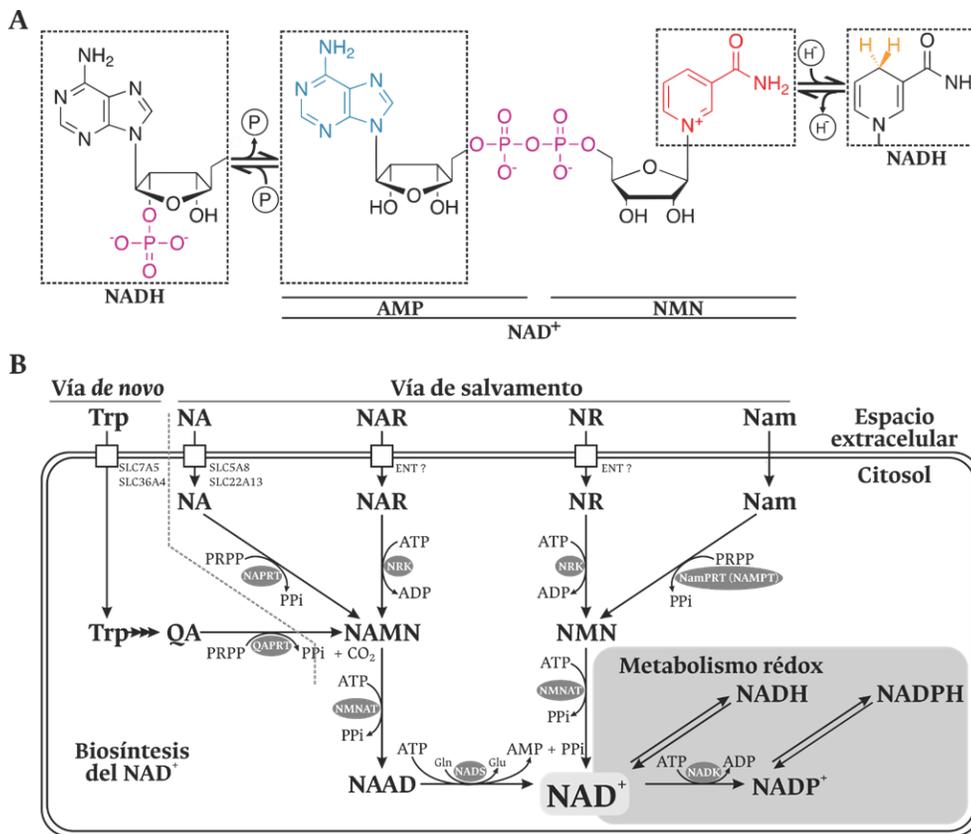
## 1.2 El NAD<sup>+</sup>: una molécula esencial para la supervivencia celular

Los nucleótidos y sus precursores son indispensables para la supervivencia y proliferación de las células, se requieren para la síntesis de DNA y RNA, constituyen una importante fuente de energía química y también pueden funcionar como cofactores en algunas reacciones metabólicas. El NAD<sup>+</sup> y su forma reducida NADH, son fundamentales dentro del metabolismo energético: participan en reacciones de oxidorreducción manteniendo el estado redox de la célula; controlan la expresión génica y la longevidad celular al interactuar con sirtuinas<sup>22</sup>; están implicados en reparación de daños al DNA, apoptosis y participan en dinámicas de organización de la cromatina al ser sustrato de las poli-ADP-ribosil transferasas (PARP)<sup>23</sup>; y además, están implicados en la regeneración de compuestos reductores como la catalasa, el glutatión y la tioredoxina<sup>24</sup>.

### 1.2.1 Síntesis del NAD<sup>+</sup>

La síntesis del NAD<sup>+</sup> puede suceder por las rutas *de novo* y de salvamento (**Figura 2**). En la *de novo*, el triptófano (Trp) es transformado a ácido quinolínico (QA) y, posteriormente,

por la acción de la ácido quinolínico fosforribosil transferasa (QAPRT) es convertido a mononucleótido de ácido nicotínico (NAMN). En la ruta de salvamento, la nicotinamida (Nam) y el ácido nicotínico (NA) son transformados en mononucleótidos de nicotinamida (NMN) y en NAMN, por acción de la nicotinamida fosforribosil transferasa (NamPRT) y de la ácido nicotínico fosforribosil transferasa (NAPRT), respectivamente. La nicotinamida ribósido (NR) y el ácido nicotínico ribósido (NAR) son convertidos en NMN y NAMN, por la acción de la nicotinamida ribósido quinasa (NRK). Las dos rutas convergen en la formación de NAD<sup>+</sup> a partir de NMN, o de dinucleótido de ácido nicotínico (NAAD) a partir de NAMN, por la acción de la NMN adenilil transferasa (NMNAT). Por su parte, el NAAD puede ser convertido en NAD<sup>+</sup> por la acción de la NAD<sup>+</sup> sintetasa (NADS). De igual manera, dentro del metabolismo rédox el NAD<sup>+</sup> puede reducirse a NADH, o, por acción de la NAD<sup>+</sup> quinasa (NADK), convertirse en NADP<sup>+</sup>, que a la vez puede reducirse a NADPH<sup>23</sup>.



**Figura 2.** Estructura y síntesis del NAD<sup>+</sup>. **A**, detalle de la estructura del NAD<sup>+</sup>; se muestra la formación del NADP y el NADH en los recuadros punteados de la izquierda y la derecha, respectivamente; grupos fosfato en morado, adenina en azul, y nicotinamida en rojo. AMP: adenosín monofosfato. **B**, vías de síntesis de NAD<sup>+</sup>, los pasos exclusivos de las vías de novo y salvamento se encuentran separados por la línea punteada. La línea doble representa la membrana plasmática, las flechas negras indican paso a través de esta o reacción enzimática, y las cajas blancas representan la presencia de una proteína transportadora. Tomado y adaptado de <sup>23</sup>.

## 1.2.2 Proteínas transportadoras de NAD<sup>+</sup> y de sus precursores

El mantenimiento de los niveles de NAD<sup>+</sup> y de sus precursores es requerido para la correcta función celular; en el caso de *T. cruzi*, el parásito capta del hospedero dichos precursores, al igual que purinas, pirimidinas, azúcares, agua, aminoácidos, iones y nucleótidos. El proceso de entrada y distribución de moléculas esenciales a los compartimentos de las células es universal, y para llevarlo a cabo, los organismos cuentan con un amplio repertorio de proteínas membranales especializadas denominadas transportadores<sup>25</sup>. Diferentes grupos de transportadores con la capacidad de movilizar tanto nucleótidos como sus precursores han sido identificados, y a continuación, algunos de los más relevantes son revisados.

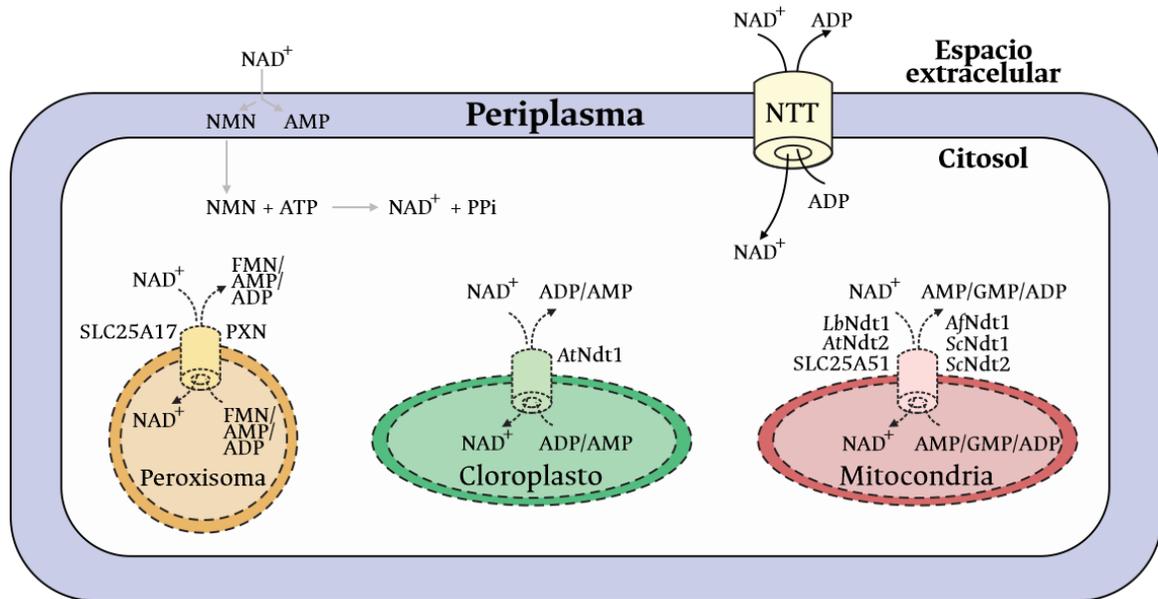
Los transportadores equilibradores de nucleósidos (ENT) y los concentradores de nucleósidos (CNT) son los principales encargados de la toma de nucleobases y nucleósidos a través de membranas biológicas, y han sido identificados tanto en bacterias como en eucariotas superiores<sup>26,27</sup>. Los ENT son transportadores bidireccionales que actúan en favor del gradiente de concentración, mientras que los CNT hacen simporte de su ligando y iones sodio en contra del gradiente de concentración. Hasta el momento en trypanosomátidos no se han reportado CNT, sin embargo, se ha identificado que sus ENT tienen un mecanismo de transporte modificado dependiente de protones y en contra del gradiente de concentración; además, se ha visto que los ENT de organismos parásitos pueden llegar a tener una afinidad hasta 100 veces mayor por su ligando<sup>25</sup>, modulan su funcionalidad y actividad según condiciones externas como el pH, y estudios de mutagénesis han demostrado que son determinantes para el proceso infeccioso y la virulencia<sup>28</sup>.

Los transportadores de nucleótidos unidos a azúcares (NST) son conservados en los eucariotas y se encargan de proveer de estas moléculas a organelos como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, donde son necesarias para la glicosilación. Los NST movilizan nucleótidos difosfato unidos a un azúcar a cambio de nucleótidos monofosfato (e.g. GDP-manosa/GMP) por el mecanismo de antiporte<sup>29</sup>. Debido a que las proteínas de superficie celular son tan importantes para *T. cruzi*, los NST pueden considerarse cruciales para la supervivencia al participar en la glicosilación y exporte de proteínas.

En cuanto a proteínas con la capacidad de translocar al NAD<sup>+</sup> (**Figura 3**), estas pueden encontrarse en organismos procariotas y eucariotas. En bacterias se han descrito dos miembros de la familia transportadora de nucleótidos (NTT) que tienen esta actividad, la primera de ellas es la proteína NTT4 de *Protochlamydia amoebophila*<sup>30</sup>, y la segunda es la proteína Npt1 de *Chlamydia trachomatis*<sup>31</sup>; es resaltable que NTT4 y Npt1 corresponden a los únicos transportadores de NAD<sup>+</sup> que presentan localización en membrana plasmática caracterizados hasta el momento.

Para el caso de organismos eucariotas, las proteínas de la familia de transportadores mitocondriales (MCF (*mitochondrial carrier family*) - 2.A.29 (Transporter Classification Data Base)), también denominada como familia de transportadores de solutos (SLC25)<sup>32</sup>, son

quienes llevan a cabo el transporte del  $\text{NAD}^+$ , al igual que otras moléculas (**Figura 3**). Los transportadores mitocondriales (MCs) están involucrados directamente en el metabolismo energético, siendo los encargados de transportar de manera específica ligandos como ácidos carboxílicos, aminoácidos y nucleótidos a través de compartimentos celulares, sin contar que también funcionan como proteínas desacoplantes<sup>33</sup>. Debido a la relevancia para este trabajo, a continuación, se abordará en detalle características de la MCF como su estructura, función, localización, e importancia en la biología de *T. cruzi*.



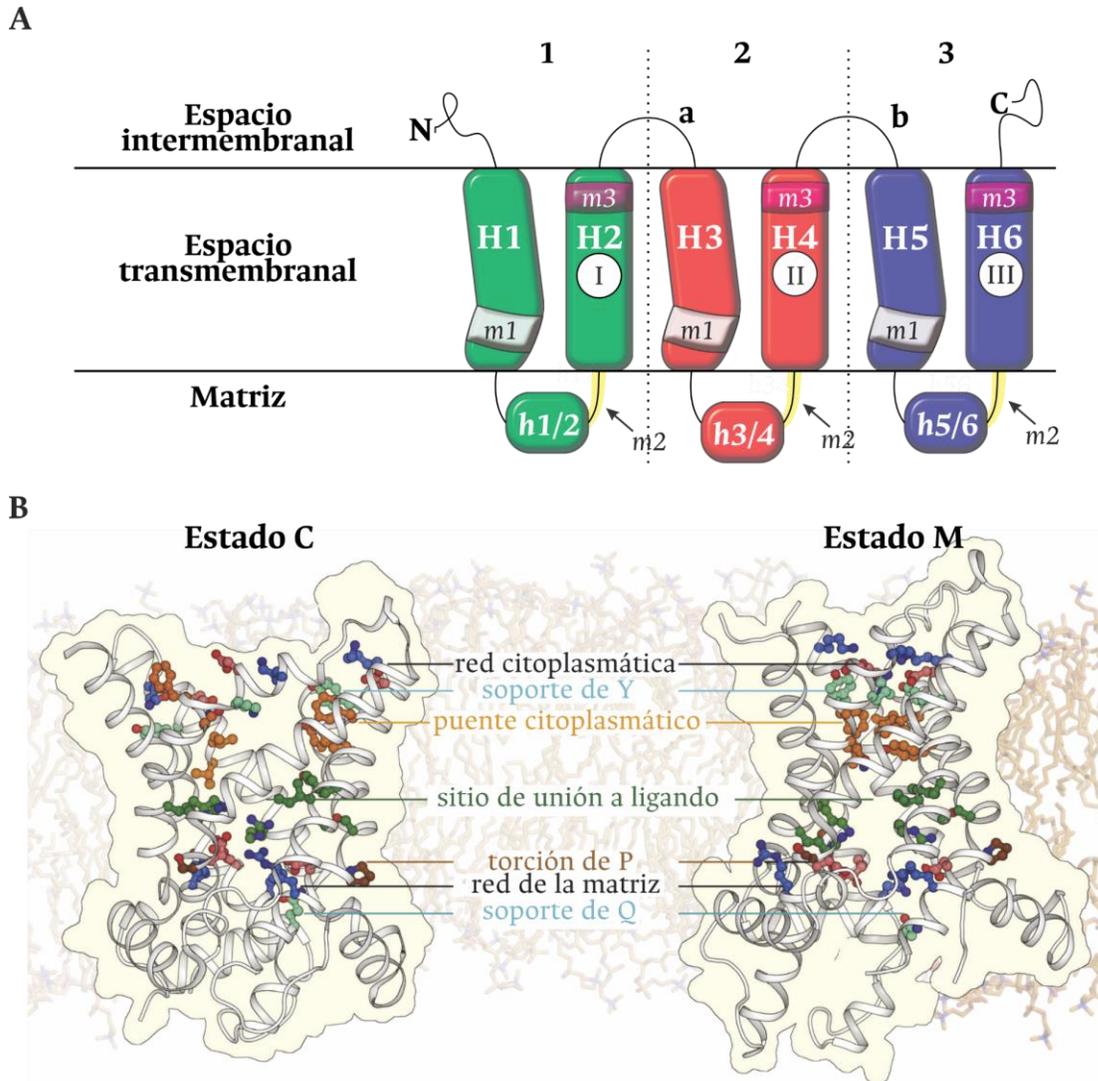
**Figura 3.** Dinámicas de transporte del  $\text{NAD}^+$  en organismos procariontes y eucariotes. Las flechas grises muestran el procesamiento del  $\text{NAD}^+$  en el periplasma de *E. coli*, y la entrada del mononucleótido al citosol; en flechas negras, transporte de  $\text{NAD}^+$  a través de la membrana plasmática de *P. amoebophila* o *C. trachomatis* por medio de los NTT; en flechas punteadas, transporte de  $\text{NAD}^+$  en compartimentos intracelulares de eucariotas, mediado por proteínas de la MCF (SLC25A17, PXN, AtNdt1, AfNdt2, SLC25A51, ScNdt1, ScNdt2, AfNdt1 y LbNdt1). Tomado y modificado de <sup>34</sup>.

## 1.3 Familia de transportadores mitocondriales (MCF)

### 1.3.1 Características generales y mecanismo de transporte

Las proteínas de la MCF son exclusivas de organismos eucariotes, presentan una localización en membranas de cloroplasto, peroxisomas o glicosomas, retículo endoplásmico (ER), y principalmente en mitocondrias, donde son las proteínas mayoritarias de la membrana interna<sup>35</sup>. Son proteínas de cerca de 35 kDa, organizadas estructuralmente en 3 dominios repetitivos, cada uno con plegamiento en forma de dos  $\alpha$ -hélices unidas por una pequeña  $\alpha$ -hélice<sup>36</sup>; por lo anterior, en total poseen 9  $\alpha$ -hélices, 6 transmembrana (H1-H6) y 3 internas (h1/2, h3/4 y h5/6). Sus extremos N y C-terminal se orientan hacia el lado externo del compartimento, y dos loops (a y b) hacen la unión H2-

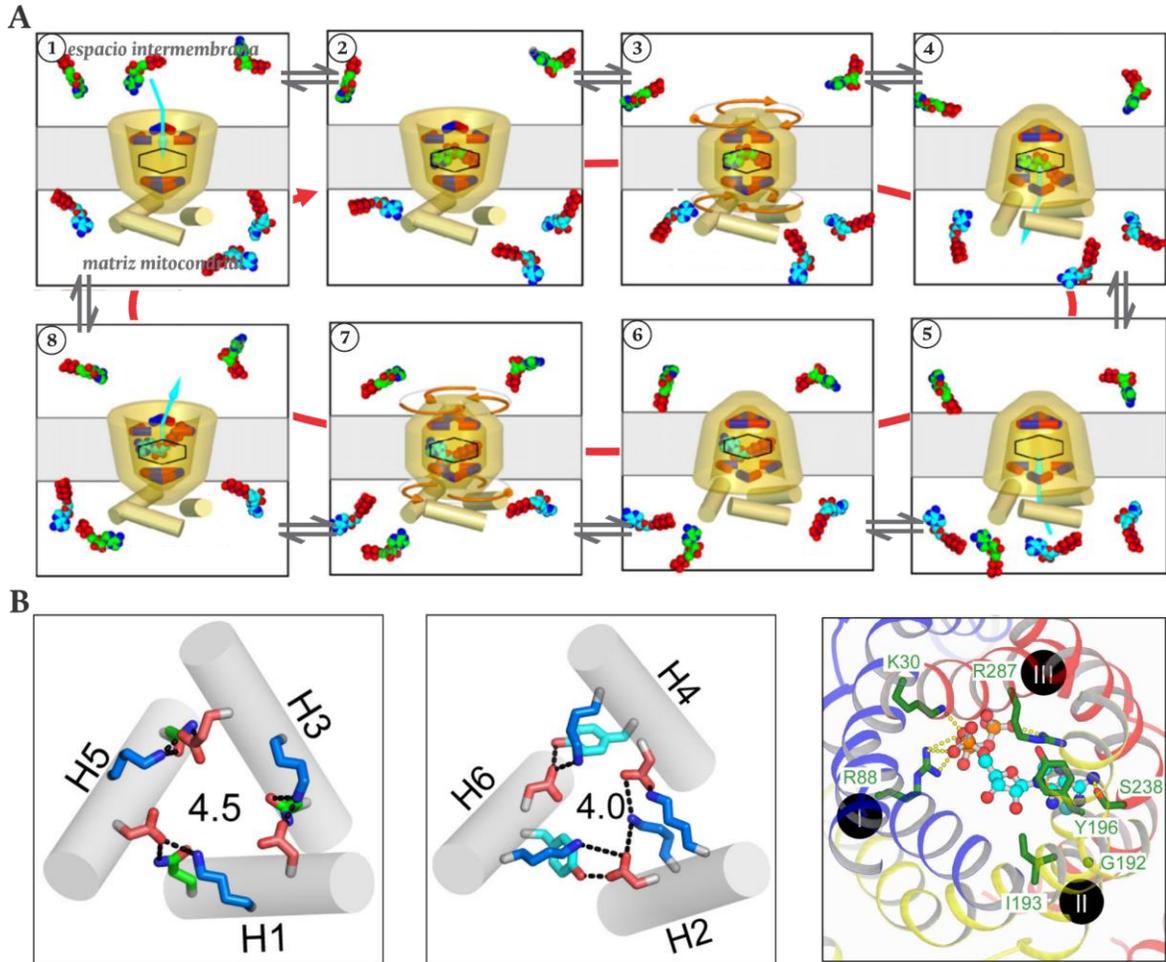
H3 y H4-H5. De forma característica, presentan los motivos PX[D/E]XX[K/R]XXXQ (m1) en la región C-terminal de las hélices H1, H3 y H5; [D/E]GXXXX[W/Y/F][K/R]G (m2) antes de la región N-terminal de las hélices H2, H4 y H6; y (m3), también en la región C-terminal de las hélices par<sup>37</sup> (**Figura 4A**).



**Figura 4.** Estructura de proteínas de la MCF. **A**, estructura secundaria organizada en la membrana interna mitocondrial, a y b, loops; dominios repetitivos 1, 2 y 3 separados por líneas punteadas; H1-H6,  $\alpha$ -hélices transmembrana; h1/2, h3/4 y h5/6, pequeñas  $\alpha$ -hélice; m1, franja gris; m2, franja amarilla; m3, franja morada; I, II y III, sitios de unión a ligando. **B**, estructura terciaria del transportador de ADP/ATP (AAC) de *Saccharomyces cerevisiae* en estado C (izquierda, PDB 4C9G) y en estado M (derecha, PDB 6GCI, cadena A). Tomado y adaptado de <sup>37</sup> y <sup>38</sup>.

Los elementos estructurales de las proteínas de la MCF se organizan tridimensionalmente en forma de barril con un canal central, el cual comunica los compartimentos celulares, y en donde se ubica el sitio de unión a ligando (en la región transmembranal); la

determinación de la estructura cristalográfica del AAC de *S. cerevisiae* (PDB 4C9G), ha permitido proponer 3 sitios de unión a ligando para transportadores de nucleótidos de adenina, estos se encuentran alineados horizontalmente (I-III), y se ubican en H2, H4 y H6, respectivamente (**Figura 4A y 4B**).



**Figura 5.** Mecanismo de transporte por antiporte de proteínas de la MCF, ejemplo del transportador AAC de *S. cerevisiae*. **A**, mecanismo de apertura única del poro central: 1) estado C vacío; 2) estado C unido a ADP (verde, azul y rojo); 3) estado de transición de C a M, ruptura de red de la matriz; 4) formación de la red citoplasmática y liberación del ADP en estado M; 5) estado M vacío; 6) estado M unido a ATP (azul y rojo); 7) estado de transición de M a C, ruptura de la red citoplasmática; 8) formación de la red de la matriz y liberación de ATP en estado C. Residuos negativos y positivos de las redes en rojo y azul, respectivamente. Todas las conformaciones son reversibles, el sentido del transporte está determinado por el gradiente de concentración de los ligandos (flecha roja). **B**, redes de interacción entre residuos que estabilizan los estados C (izquierda) y M (centro); residuos negativos, positivos, polares y aromáticos en rojo, azul, verde y cian, respectivamente. Residuos conservados de los sitios de unión al ligando I, II y III (derecha); molécula de ATP en el sitio de unión representada con esferas. Tomado y adaptado de <sup>38 y 41</sup>.

En cuanto al transporte de ligandos, que puede ser de tipo antiporte, simporte o uniporte<sup>37</sup>, los MCs lo hacen por el mecanismo de apertura única del poro central, en él, el canal se alterna entre el estado C (abierto al espacio intermembrana) y el M (abierto hacia la matriz) al unirse a sus respectivos ligandos (**Figura 4B** y **Figura 5A**). Interacciones electrostáticas entre los residuos del motivo m1 de H1, H3 y H5 forman la red de la matriz, y estabilizan el estado C (**Figura 4B** y **Figura 5B** panel izquierdo); de manera similar, se ha establecido el papel del residuo de prolina de m1, que es generar una torción en la hélice, facilitando la formación de la red<sup>40</sup> (**Figura 4B**). Por su parte, los residuos del motivo m3 de H2, H4 y H6 forman la red citoplasmática y estabilizan el estado M<sup>36,39,41</sup> (**Figura 4B** y **Figura 5B** panel central). Debido al cambio conformacional en simultáneo de las 6  $\alpha$ -hélices transmembrana durante la translocación de ligandos, se considera que los MCs presentan el mecanismo de transporte más dinámico caracterizado hasta el momento<sup>32,41</sup>.

En relación a la interacción con ligandos, a nivel de secuencia, en el sitio I no hay un residuo o motivo conservado; en el sitio II se propone que el motivo G[IVLM] sería determinante de la afinidad a estos nucleótidos, ya que es un lugar donde la adenina puede estabilizarse; por su parte, en el sitio III hay un residuo conservado [K/R], que sería importante para la interacción con grupos fosfato<sup>42</sup> (**Figura 5B** panel derecho).

De manera complementaria, es importante anotar que algunos MCs puede presentar modificaciones postraduccionales (MPT) que llegan a modular su funcionamiento, a continuación, se mencionan algunas de ellas; (1) en los transportadores CIC y de carnitina-acilcarnitina (CACT) de *H. sapiens* se ha reportado que la acetilación mediada por sirtuinas de residuos de lisina en la matriz mitocondrial puede actuar como un interruptor de la actividad transportadora<sup>43</sup>; (2) en el transportador AAC de *S. cerevisiae* una fosforilación en el residuo Y194 es requerida durante el metabolismo oxidativo para la correcta respiración celular, ya que facilitaría una transición más rápida entre estados C y M, y en el transportador de fosfatos (PiC) también se ha detectado esta modificación, sin embargo, aún se desconoce su papel<sup>44</sup>; (3) en los transportadores de ATP/ADP (ANT1) bovino<sup>45</sup> y de NAD<sup>+</sup> (*LbNdt1*) de *Leishmania braziliensis*<sup>46</sup>, se ha reportado la presencia de glicosilaciones, aunque su función no ha sido determinada; por último, (4) se ha visto que la forma activa del transportador de acil (ACP) de *H. sapiens* requiere de la adición de un motivo de fosfopanteteína para su correcto funcionamiento<sup>47</sup>.

### 1.3.2 Transportadores de NAD<sup>+</sup> y su rol en la función celular

Se ha establecido que la proteínas MCF son de gran importancia en la biología de los eucariotas, por una parte, el número de MCs de un organismo puede relacionarse con la complejidad de su metabolismo y maquinaria celular, así, por ejemplo, en *H. sapiens* se reportan al menos 50 miembros de esta familia, en *S. cerevisiae* 35, en *A. thaliana* 58, en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* 37, y en *Glycine max* (soya) 127<sup>36</sup>; por otra parte, son proteínas clave en los compartimentos celulares donde se ubican, ya que son indispensables para mantener los niveles apropiados de sus ligandos.

De las proteínas de la MCF identificadas, 9 corresponden a transportadores de NAD<sup>+</sup> caracterizados (**Figura 3**). En *H. sapiens*, las proteínas mitocondrial SLC25A51/MCART1, y peroxisomal SLC25A17, movilizan FAD, coenzima A y NAD<sup>+</sup>, a cambio de flavín mononucleótido (FMN) o de AMP<sup>33,48</sup>; en *A. thaliana* se han identificado transportadores capaces de tomar NAD<sup>+</sup> en cloroplasto (*At*Ndt1), mitocondria (*At*Ndt2) y peroxisoma (PXN), a cambio de ADP, otros nucleótidos, y precursores de NAD<sup>+</sup> como NAAD, NMN y NAMN<sup>49,50</sup>; en *S. cerevisiae*, los transportadores mitocondriales ScNdt1 y ScNdt2 pueden transportar NAD<sup>+</sup> a cambio de ADP y otros nucleótidos<sup>51</sup>; el transportador *At*Ndt1 de *Aspergillus fumigatus*, es el encargado de mantener el pool mitocondrial de NAD<sup>+</sup><sup>52</sup>; y por último, en nuestro grupo de investigación se determinó que el transportador *Lb*Ndt1 lleva a cabo esta función en la mitocondria de *L. braziliensis*<sup>46</sup>.

El papel de los transportadores de NAD<sup>+</sup> en la biología de los organismos ha sido estudiado recientemente. En *S. cerevisiae* se han generado dos cepas mutantes, una  $\Delta ndt1\Delta ndt2$  sin transportadores de NAD<sup>+</sup> funcionales, y una *ndt1-over* que sobre expresa el transportador ScNdt1; al ser comparadas con una cepa *wild type* (WT), se ha visto que bajo condiciones de crecimiento que favorecen un metabolismo respiratorio, hay diferencias en los niveles de NAD<sup>+</sup> y NADH mitocondrial, siendo mayores en *ndt1-over* y menores en  $\Delta ndt1\Delta ndt2$ , con respecto a la cepa WT.

En la cepa  $\Delta ndt1\Delta ndt2$  también se observa una disminución en el ratio NAD<sup>+</sup>/NADH y los niveles de ATP, sin embargo, la eficiencia de la fosforilación oxidativa y la longevidad celular en esta línea es la más alta, incluso más que en la WT, lo que se atribuye a un ambiente mitocondrial más reductor. Por el contrario, para la cepa *ndt1-over*, el alto contenido de NAD<sup>+</sup> eleva el ratio NAD<sup>+</sup>/NADH, llevando a un ambiente mitocondrial más oxidativo, afectando la producción de ATP, que llega a ser similar a la que consigue la cepa delecional; por último, las células *ndt1-over* presentan la esperanza de vida más baja, lo que se debe a daños mitocondriales tempranos inducidos por estrés oxidativo<sup>53,54</sup>.

Para el caso de plantas, al silenciar el transportador peroxisomal PXN en *A. thaliana* se ve alterada la  $\beta$ -oxidación, por lo que los ácidos grasos reservados en las semillas no pueden ser catabolizados y se dan problemas en la germinación<sup>55</sup>. De igual manera, se ha visto una reducción en la producción de semillas y en la capacidad de germinación en mutantes  $\Delta ndt2$  del transportador mitocondrial, y también, un aumento en la transcripción de genes involucrados en las vías de síntesis *de novo* y de salvamento del NAD<sup>+</sup>, por lo que se propone que el transportador sería importante en la regulación transcripcional de estos genes<sup>56</sup>.

Similar a lo reportado para otras especies, en células humanas los mutantes delecionales del transportador SLC25A51/MCART1 presentan disminución en la tasa consumo de oxígeno, la proliferación celular, el metabolismo de ácidos tricarbóxicos, la actividad de la cadena transportadora de electrones, la toma de NAD<sup>+</sup> en las mitocondrias, y por ende, los niveles de NAD<sup>+</sup> y NADH en este organelo<sup>48,57,58</sup>. En conjunto, estos hallazgos corroboran la importancia de los transportadores de NAD<sup>+</sup> en la homeostasis celular de los

eucariotas, y muestran la pertinencia de ahondar en las dinámicas del flujo del NAD<sup>+</sup> en organismos como *T. cruzi*.

### 1.3.3 Localización de proteínas de la MCF

El correcto funcionamiento celular depende en gran medida de que las proteínas se localicen eficientemente en los compartimentos donde son requeridas, y esto incluye a las proteínas transportadoras, por lo que es necesario profundizar en las dinámicas involucradas en la localización de los MCs. Si bien las proteínas de la MCF se han detectado en diferentes membranas internas, los transportadores de NAD<sup>+</sup> identificados hasta el momento son mitocondriales o peroxisomales, por lo que a continuación, se revisan las principales vías de importe e integración de proteínas a las membranas de estos organelos.

En eucariotas se han descrito al menos cuatro vías de importe de proteínas hacia la mitocondria (**Figura 6A**), en ellas intervienen principalmente los complejos proteicos MIM (complejo de importe mitocondrial), TOM (translocasa de la membrana interna), TIM (translocasa de la membrana interna) y SAM (maquinaria de clasificación y ensamble). La primera es la vía de MIM, implicada en el ensamble del complejo TOM y otras proteínas de paso múltiple, mediando su correcta integración en la membrana externa; estructuralmente, las proteínas reconocidas por MIM son ricas en  $\alpha$ -hélice.

La segunda vía es la de las proteínas con pre-secuencias N-terminales, por la cual se procesan cerca del 70% de proteínas mitocondriales (la mayoría de ellas solubles); las pre-secuencias suelen tener entre 5 a 99 residuos, estar cargadas positivamente por un alto número de aminoácidos básicos, y tener un sitio de clivaje marcado por el motivo RX[YLF][SAT]. Regiones especializadas de Tom20 reconocen la pre-secuencia e inician la internalización, en donde esta es removida y la proteína clivada es dirigida al complejo TIM23 de la membrana interna (especializado en la translocación de proteínas de la matriz y ensamble de algunas proteínas de la membrana interna); en el proceso participa un complejo proteico llamado PAM, y hay gasto de energía en forma de ATP<sup>59</sup>.

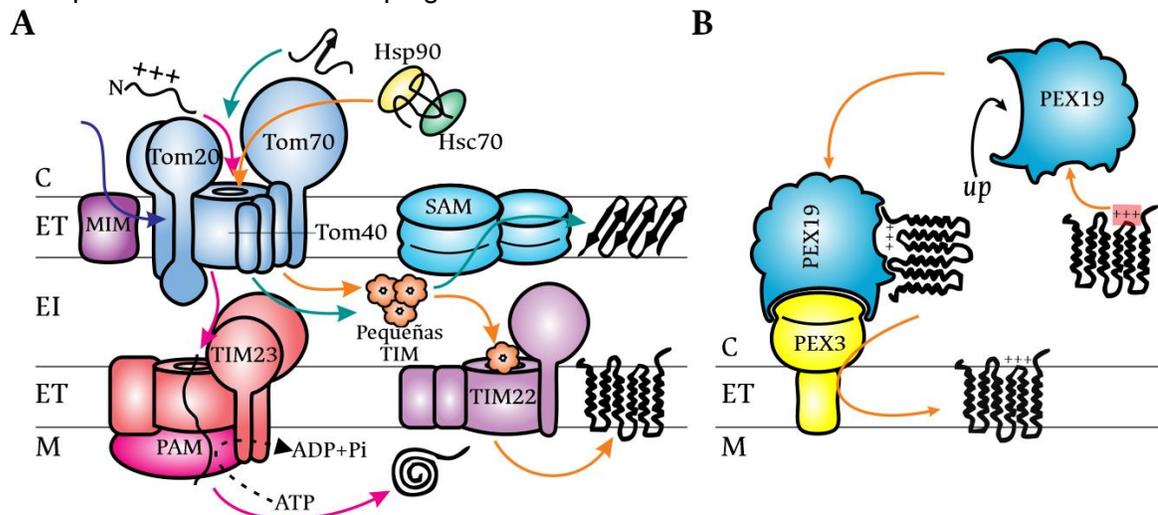
La tercera, es la vía de localización de proteínas de la membrana externa mitocondrial que tienen una conformación de láminas- $\beta$  repetidas; la presencia de una horquilla- $\beta$  hidrofóbica conservada, que interactúa con Tom20, es requerida para la identificación y el posterior ensamble en la membrana, que es llevado a cabo por el complejo SAM. En el proceso también participan chaperonas llamadas pequeñas TIM que están en el espacio intermembranar, ellas estabilizan proteínas ricas en residuos hidrofóbicos cuando se encuentran en el ambiente hidrofílico<sup>59-61</sup>.

La cuarta vía es la empleada por transportadores de la MCF, sintetizados en el citoplasma y translocados a la mitocondria sin ayuda de una pre-secuencia N-terminal; se han propuesto elementos internos de la secuencia los MCs como posibles señales de localización al organelo. Tanto el motivo m1, como la topología que adoptan las proteínas

al estabilizarse con las chaperonas Hsp90 (unión a regiones parcialmente plegadas) y Hsc70 (unión a regiones altamente hidrofóbicas de conformación larga), son indispensables para la interacción con la subunidad Tom70, la cual es específica por los MCs; esta especificidad estaría dada por la presencia de elementos de interacción de las chaperonas con el receptor Tom70, lo que convierte a estas proteínas estabilizantes en unos de los primeros elementos de la vía en determinar la futura localización de los MCs<sup>62</sup>.

Tras el paso por la membrana externa, facilitado por el complejo TOM, la proteína posteriormente es estabilizada en el espacio intermembrana por medio de la unión de unidades de pequeñas TIM, y es transportada finalmente por las chaperonas hasta el complejo TIM22<sup>62</sup>, el cual está encargado del correcto ensamble en la membrana interna.

Para el caso de proteínas de la MCF que tienen localización peroxisomal (**Figura 6B**), se ha determinado que en su secuencia hay una región interna con un alto contenido de aminoácidos básicos agrupados, los cuales son característicos de proteínas de membrana de estos organelos; en el transportador PMP47 de *Candida boidinii* se encontró que el motivo [K/R][K/R][3-7aa][T/S]XX[D/E], denominado mPTS (*membrane peroxisome targeting sequence*), presente entre las  $\alpha$ -hélice H4 y H5 media la interacción del transportador con la peroxina citoplasmática PEX19<sup>63</sup>, la cual ha sido identificada como la encargada de llevar las proteínas membranales a los peroxisomas ya formados (siendo una vía independiente del retículo endoplasmático), una vez allí interactúa con la peroxina de membrana PEX3 que funciona como un receptor y facilita la incorporación del transportador correctamente plegado<sup>64,65</sup>.



**Figura 6.** Importe y localización de transportadores de la MCF y otras proteínas en: **A**, membrana interna de la mitocondria, flecha azul oscuro, vía de MIM; flecha fucsia, vía de proteínas con pre-secuencia N-terminal; flecha aguamarina, vía de proteínas de láminas- $\beta$  de la membrana externa; flecha naranja, vía de proteínas de la MCF; y **B**, membrana peroxisomal, en PEX19 se resaltan los sitios de unión a mPTS y up (unión a PEX3). Proteínas representadas en negro, membranas representadas con doble línea continua; C, citósol; ET, espacio transmembrana; EI, espacio intermembrana; M, matriz. Revisado y adaptado de <sup>60,63,66-68</sup>.

## 1.4 Estrategias implementadas en el estudio de proteínas transportadoras de nucleótidos

La caracterización funcional de estas proteínas se hace de manera conjunta con herramientas bioinformáticas y experimentales. La estrategia convencional consiste inicialmente de una búsqueda en servidores y bases de datos, de elementos presentes en la secuencia de aminoácidos de la proteína de estudio, con el fin de explorar sus relaciones evolutivas, características particulares, también proponer una función específica y rol en la biología celular; seguido de esto, se corrobora mediante ensayos integrales en el laboratorio lo propuesto teóricamente<sup>33,49,51,69,70</sup>. La estrategia experimental más empleada hasta el momento, consiste en la clonación de secuencias candidato en vectores de expresión, que son integrados en sistemas heterólogos de expresión (siendo *Escherichia coli* el predilecto), y con los que se logra obtener una proteína recombinante, la cual posteriormente es purificada y reconstituida en proteoliposomas, permitiendo la evaluación de afinidad por un amplio rango de moléculas<sup>35</sup>.

Si bien esta aproximación ha sido un estándar en el estudio de transportadores, es metodológicamente compleja, requiere infraestructura costosa, y presenta otras desventajas al momento de caracterizar proteínas provenientes de eucariotas, ya que *E. coli* carece de la maquinaria celular adecuada para llevar a cabo la correcta expresión y localización de los transportadores, lo cual también podría comprometer su funcionalidad.

De manera alterna, se ha establecido una metodología en la que se usa la cepa mutante  $\Delta ndt1\Delta ndt2$  de *S. cerevisiae*, la cual al carecer de transportadores funcionales de NAD<sup>+</sup>, presenta crecimiento reducido en medio de cultivo no fermentable, y permite evaluar secuencias candidato por ensayos de complementación. En estos ensayos, células mutantes de *S. cerevisiae* son transfectadas con un vector de expresión pYES2 recombinante (en donde se encuentra clonada la secuencia candidato), y se monitorea el crecimiento de las células en medio fermentable y no fermentable; mediante la comparación del crecimiento con las líneas WT y  $\Delta ndt1\Delta ndt2$ , la funcionalidad del candidato de transportar NAD<sup>+</sup> es confirmada si se observa una recuperación del crecimiento. Esta, a pesar de ser una manera directa de evaluar a los candidatos en un sistema *in vivo*, no permite determinar la eficiencia del transporte o la afinidad al ligando.

Por último, recientemente se ha desarrollado una estrategia novedosa en la que se emplea proteína fusión MISTIC (*Membrane-integrating sequence for translation of integral membrane protein constructs*) proveniente de *Bacillus subtilis*, en ella se aprovecha que MISTIC funciona como una señal para la localización de las proteínas en la membrana plasmática de la bacteria<sup>71,72</sup>; el diseño de un vector de expresión que agrega a MISTIC como una etiqueta N-terminal, permite que en él se clonen secuencias de proteínas transportadoras. Tras incorporar el plásmido recombinante en el sistema *E. coli* e inducir la expresión de la proteína, es posible aislar las membranas de las bacterias, en las que estará integrada la proteína y que servirán para realizar ensayos de transporte.

En este sistema también es posible realizar ensayos de transporte *in vivo* en *E. coli* transformadas con los constructos del transportador en el vector pET28-MISTIC; para ello, se incuban las células en un medio que contenga el ligando a evaluar, y luego, mediante ensayos de detección específicos, se cuantifican los niveles celulares internos de la molécula de interés, donde se espera que la cantidad sea mayor en las líneas que expresan la proteína recombinante. Esta metodología permite la evaluación de la capacidad de transporte de diferentes ligandos, y experimentalmente se considera más sencilla<sup>73</sup>.

## 1.5 Panorama de los MCs en trypanosomátidos

Para trypanosomátidos, específicamente en *T. brucei*, se ha hecho la caracterización del repertorio de transportadores de la MCF, lo que incluye la determinación de la localización subcelular de la mayoría de ellos. Un total de 24 proteínas se identificaron, encontrando que ellas tienen homólogos tanto en *T. cruzi* como en *L. major*<sup>69</sup>. Mediante ensayos de inmunofluorescencia se determinó que la mayoría de estos homólogos son mitocondriales, aunque para el homólogo *TbMCP6* ya se había reportado una localización diferencial, siendo mitocondrial en estado poco infectivo (procíclico) y glicosomal en estado infectivo (metacíclico)<sup>69,74</sup>. Para el caso del homólogo *TbMCP5*, mediante ensayos de complementación con una cepa mutante de *S. cerevisiae* carente de transportadores de ATP/ADP, se demostró su funcionalidad, y, al igual que *TbMCP6*, su ausencia causa inviabilidad en los parásitos<sup>75</sup>. El homólogo *TbMCP14* es un transportador de ácidos carboxílicos que carece del motivo m1 N-terminal, diferenciándolo de sus homólogos de eucariotas superiores, por lo que es propuesto como un blanco farmacológico promisorio; al disminuir su expresión se ve que los parásitos son menos sensibles a los tratamientos con medicamentos anti-tripanosomales, sin embargo, esto también lleva a una disminución en la tasa de crecimiento<sup>76</sup>. Otros transportadores caracterizados han sido el PiC *TbMCP11*, el de ácidos carboxílicos *TbMCP12* y el de hierro *TbMCP17*<sup>77,78</sup>.

En *L. amazonensis* se identificó que la proteína homóloga del transportador *TbMCP17*, denominada LMIT1, también funciona como transportador de hierro en la membrana interna de la mitocondria; de manera interesante, mediante el uso de herramientas bioinformáticas ya se había predicho la función de esta secuencia<sup>69,77</sup>. Este transportador es indispensable tanto para *T. brucei* como para *L. major*, la generación de un doble mutante para este gen no es viable, y al disminuir su expresión se observan defectos en el crecimiento y desarrollo de amastigotes, pérdida considerable de la virulencia, aumento en estrés oxidativo, y cambios en el contenido de hierro mitocondrial<sup>79</sup>.

En lo concerniente a la dinámica del NAD<sup>+</sup>, en *T. cruzi* ha sido identificada una NMNAT citosólica<sup>80,81</sup>, indicando que la síntesis del dinucleótido se da en este compartimento, y que existe un eficiente sistema de transporte que suplementa el NAD<sup>+</sup> requerido al interior de los organelos celulares. Las proteínas de la MCF son las encargadas de movilizar el NAD<sup>+</sup> en eucariotas, y se propone que *T. cruzi* posea al menos una proteína de esta familia con la capacidad de cumplir esta función<sup>36,37</sup>.

Se espera que dentro de los homólogos de la MCF identificados en *T. cruzi* se encuentre una proteína transportadora de NAD<sup>+</sup>. Debido a que los transportadores de NAD<sup>+</sup> ya caracterizados pueden translocar otros nucleótidos<sup>33,49-51</sup>, y teniendo en cuenta que en los parásitos protozoarios la maquinaria celular se ha reducido y vuelto más versátil<sup>25</sup>, es posible que el transportador de NAD<sup>+</sup> de *T. cruzi* tenga una alta afinidad por otros nucleótidos, al igual que la capacidad de movilizarlos más eficientemente. Similar a la mayoría de sus homólogos, es muy probable que esta proteína sea mitocondrial, sin embargo, al ser los glicosomas unos compartimentos celulares dinámicos, tan importantes en la biología de *T. cruzi* y con una alta demanda de NAD<sup>+</sup>, el transportador de esta molécula podría encontrarse también en la membrana de este organelo, presentando un comportamiento de localización diferencial similar al reportado en el homólogo *TbMCP6*.

## 1.6 Expresión de la glicoproteína del virus de la rabia (RVG) en el sistema eucariota *S. cerevisiae*

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el organismo modelo eucariota *S. cerevisiae*, al tener disponible esta plataforma biotecnológica, se planteó un proyecto paralelo a lo propuesto con los transportadores de NAD<sup>+</sup>, en él, se abordó la expresión de un fragmento de la RVG, aplicando la tecnología de las proteínas recombinantes en esta levadura. A continuación, se presenta una breve revisión teórica y la justificación de este problema de investigación.

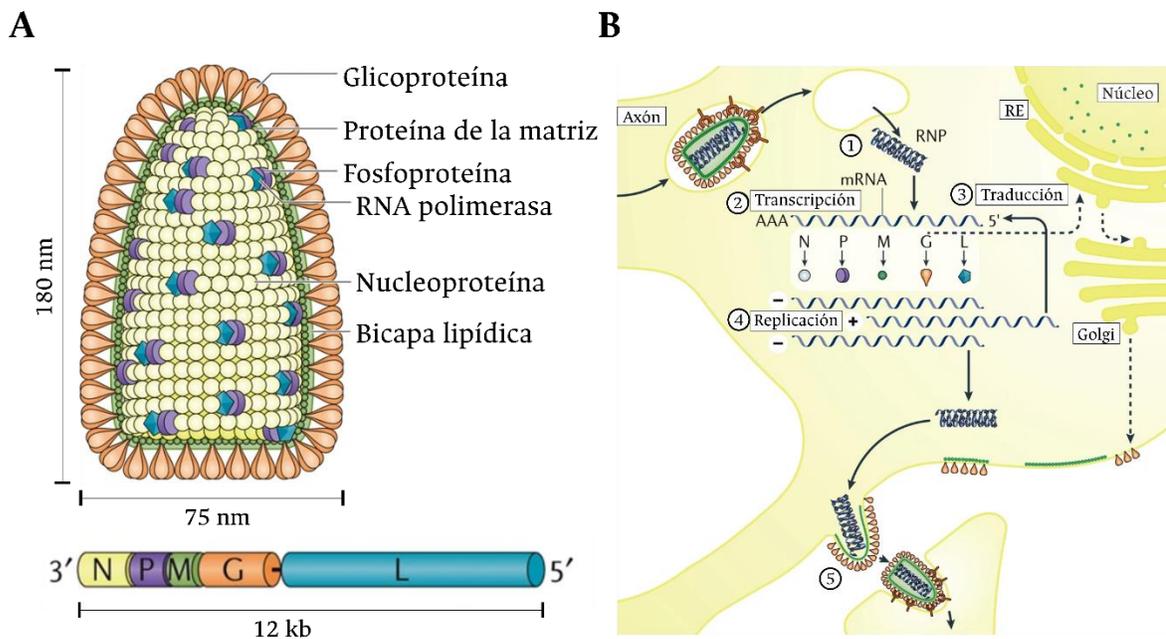
La enfermedad de la rabia causada por rhabdovirus del género *Lyssavirus* es considerada una zoonosis cosmopolita, ya que se ha reportado en todos los continentes, excepto la Antártica; se cree que esta se originó hace miles de años en el viejo mundo, después de que virus presentes en murciélagos hematófagos adquirieron la capacidad de infectar también a múltiples especies de carnívoros y primates, convirtiéndose en el lyssavirus con el mayor rango de hospederos reportado hasta el momento<sup>82</sup>.

Estructuralmente, el virus de la rabia tiene una forma de bala característica, midiendo 75 nm de diámetro y 180 nm de largo, su superficie está cubierta de homotrimeros de RVG denominados peplómeros, los cuales toman forma de espiga y son el principal determinante antigénico del virus. Su genoma de 12 kb además de codificar para la RVG, es la plantilla para una nucleoproteína (N), una fosfoproteína (P), una proteína de matriz (M), y una RNA polimerasa (L). El genoma está unido con N y P para formar una ribonucleoproteína (RNP), y a su vez está fuertemente ligado con el complejo RNA polimerasa formado por L y P; la hélice formada por la RNP está encapsulada por M, que a su vez interactúa con la bicapa lipídica<sup>83</sup> (Figura 7A).

La forma más común de transmisión del virus es a través del contacto de tejidos con saliva de un animal infectado, una vez esto sucede, el virus llega las uniones neuromusculares e ingresa a las neuronas. Tras su entrada, los viriones viajan de las dendritas al soma, donde se libera a la RNP y luego el RNA es transcrito y traducido en múltiples copias de las

proteínas virales; tras sucesivos ciclos de transcripción la proteína L cambia su función de transcriptasa a replicasa para generar copias del genoma viral; finalmente, la RVG y la proteína M se oligomerizan en la membrana plasmática del hospedero y encapsulan a las nuevas RNP generadas, permitiendo la liberación del virus al medio extracelular y la progresión de la infección del sistema nervioso<sup>83,84</sup> (Figura 7B).

Debido a un marcado neurotropismo, una vez el virus ingresa al hospedero inicia una infección sistemática de las células nerviosas, afectando primero al sistema nervioso periférico y posteriormente al central. Por lo anterior, los primeros síntomas incluyen fiebre y dolor de cabeza, y a medida que progresa la infección, empiezan a aparecer los cambios bruscos en el comportamiento, alucinaciones, agresividad e hidrofobia característicos de esta patología; en paralelo los individuos afectados desarrollan encefalitis o meningitis, causando parálisis, estado de coma y la muerte. Una vez los síntomas se manifiestan, la enfermedad progresa rápidamente, sin embargo, su tiempo de incubación es típicamente de 1 a 3 meses. Esta enfermedad se considera casi invariablemente fatal, aunque en algunos casos los hospederos sobreviven con graves secuelas de parálisis<sup>85,86</sup>.



**Figura 7.** Estructura y mecanismo de replicación del virus de la rabia. **A**, arriba, organización estructural de los componentes del virión; abajo, organización del genoma de RNA del virus; y **B**, replicación de viriones al interior de las neuronas, se muestra desde la llegada al soma de una neurona: 1) liberación de la RNP al citoplasma; 2) producción de mRNA codificantes para proteínas virales llevada a cabo por las proteínas L y P; 3) las proteínas son traducidas en ribosomas libres en el citoplasma, a excepción de la RVG que es procesada por la vía del ER y Golgi; 4) la proteína M cambia la función del complejo L y P a replicasa, y esta genera copias del genoma completo. El complejo RNP empieza a formarse; 5) las proteínas M y RVG empiezan a asociarse en la membrana plasmática de la célula hospedera, seguido de esto se asocian con la RNP y se da la generación de nuevos viriones que son liberados para continuar la infección del sistema nervioso. Tomado y adaptado de <sup>83</sup>.

Se estima que cerca de 3300 millones de personas están en riesgo de contagio alrededor del mundo, y por lo menos 60000 muertes humanas se reportan anualmente por este virus, principalmente en países en desarrollo de Asia y África. De igual manera se cree en algunos países la incidencia de esta enfermedad puede ser incluso 15 veces mayor a la reportada<sup>85</sup>. A pesar del panorama mundial, en Colombia se han hecho importantes avances en la eliminación de esta enfermedad, en el período 2000-2017 se identificaron 38 casos de rabia humana, para los años 2018 y 2019 no se reportó ninguno, y en 2019 solo se reportaron 3 casos de rabia en animales domésticos; la disminución en los casos se debe a la vigilancia integral de la rabia adelantada en el país y a campañas masivas de vacunación para perros, gatos, y animales de producción del sector agropecuario<sup>87,88</sup>.

El sostenimiento y mejora de estos índices están ligados a la disponibilidad de grandes cantidades de dosis de la vacuna contra la rabia. Para garantizar la disponibilidad de dosis de vacuna para perros y gatos, en Colombia se emplean células Vero infectadas con virus de la cepa Pasteur (VP), permitiendo cultivos en masa en fermentadores que luego son inactivados y purificados por ultracentrifugación; el producto final consiste en una suspensión enriquecida en la RVG<sup>89,90</sup>. Si bien la metodología llevada a cabo en el país para obtener una vacuna ha mostrado ser efectiva, el proceso de producción es costoso debido a los insumos e infraestructura requeridos, por lo que el desarrollo de estrategias alternas que optimicen el uso de recursos se convierte en un objetivo para los productores.

La generación de una RVG recombinante se constituye como una opción al modelo de producción del antígeno manejado en el país, permitiendo la optimización de la producción de la vacuna contra la rabia. Un factor determinante al momento de abordar esta estrategia es la elección del sistema de expresión heterólogo, pues características de la proteína como su estructura, oligomerización y posibles modificaciones postraduccionales, pueden verse comprometidas si el sistema no es capaz de procesarla correctamente. La RVG es una proteína de cerca de 65 kDa, está compuesta por 524 residuos y se organiza en 4 dominios denominados de péptido señal (SP), una secuencia N-terminal clivable; de transmembrana (TM); dominio citoplasmático (CD); y el ectodominio (ED), región compuesta de 439 residuos expuesta en la superficie del virión, y a través de la cual los peplómeros se estabilizan<sup>91</sup>. Por último, la RVG es blanco de glicosilaciones, modificaciones que son importantes para la antigenicidad.

Teniendo en cuenta este contexto, es de resaltar que *S. cerevisiae* se usa ampliamente como sistema de expresión heterólogo en procesos productivos a gran escala, y su maquinaria celular permite obtener proteína correctamente plegada y con modificaciones postraduccionales; la utilidad de *S. cerevisiae* en la producción de vacunas se refleja en que ha sido empleada en la generación de antígenos de hepatitis B, hantavirus y variantes del virus del papiloma humano (VPH)<sup>92</sup>. Por lo anterior, y considerando que se cuenta con acceso a la secuencia del ED de la RVG, se propone la clonación de esta en el vector de expresión pYES2 de *S. cerevisiae*, con el fin de obtener un insumo con el potencial de ser implementado en el proceso productivo de la vacuna de la rabia en Colombia.

## 2. Preguntas de investigación

Estudiar proteínas candidato a ser transportadores del NAD<sup>+</sup> en *T. cruzi* requiere de una aproximación en que se integren las particularidades de la biología del parásito, y el conocimiento construido acerca de los elementos que participan en el transporte de moléculas. Teniendo en cuenta que la homeóstasis del NAD<sup>+</sup> es vital, y que *T. cruzi* posee una única NMNAT citosólica<sup>80,81</sup>, debe existir un sistema de transporte que movilice esta molécula a lo largo de sus diferentes compartimentos subcelulares, sin embargo, hasta el momento este no ha sido identificado. De manera interesante, en otros organismos eucariotas se ha determinado que proteínas pertenecientes a la MCF son pieza clave de dichos sistemas<sup>33,49–51</sup>.

Las proteínas de la MCF son características de organismos eucariotas, e incluso se relacionan con la aparición de la mitocondria y el aumento en la complejidad metabólica, estas han sido encontradas en gran diversidad de grupos, yendo desde protozoarios, hasta los más derivados, como mamíferos y plantas superiores<sup>36</sup>. Al analizar las secuencias de estos transportadores en varios organismos, se ha encontrado que hay una agrupación según la afinidad por ligandos, y no por grupos biológicos (e.g. plantas, hongos, animales), lo que indica que la diversificación en la afinidad ocurrió antes de que se diera la radiación de los grupos eucariotas. Por lo anterior, es de esperar que todos los eucariotas posean proteínas de la MCF capaces de movilizar sus ligandos característicos<sup>37</sup>.

Hasta el momento 24 secuencias dentro del genoma de *T. cruzi* se han identificado como correspondientes a proteínas de la MCF<sup>69</sup>, y 3 de ellas han sido propuestas como candidatos a transportador de NAD<sup>+</sup> por el LIBBIQ. A pesar de que las predicciones hechas con herramientas bioinformáticas permiten una aproximación a la posible función de estas proteínas, los análisis *in silico* tienen un alcance limitado<sup>42,93</sup>. Una exploración más profunda de la estructura de los candidatos con herramientas bioinformáticas en búsqueda, no solo de motivos característicos de la MCF, sino también de aquellos que posiblemente podrían estar presentes e involucrados en afinidad a un ligando determinado, permitiría inferir el papel de elementos estructurales presentes en los transportadores.

Abordar experimentalmente el estudio de los candidatos a transportador de NAD<sup>+</sup> sería una forma directa de evaluar su actividad. La estrategia metodológica más común para esto involucra ensayos de transporte con proteoliposomas, sin embargo, su construcción es compleja, se requiere de manejo de elementos radiactivos en los ensayos de transporte, lo que implica poseer una infraestructura especializada y, aún con elementos de seguridad, pueden representar riesgos a la salud; en este sentido, para este trabajo se propone llevar

a cabo ensayos de complementación con cepas mutantes de *S. cerevisiae*, alternativa más segura y económica.

Los transportadores de la MCF se distribuyen en muchas de las membranas biológicas presentes en las células eucariotas, determinar la localización subcelular de las proteínas candidato permitiría identificar su rol en la biología de *T. cruzi*; en *T. brucei* se reportó que un homólogo de la MCF se ubica diferencialmente en la mitocondria y los glicosomas dependiendo del estadio en que se encuentre<sup>76</sup>, un comportamiento similar podría observarse en las proteínas candidato. Para abordar la determinación de la localización, la microscopía de fluorescencia se presenta como excelente herramienta, pues ha sido ampliamente utilizada en el estudio de diversidad de proteínas en diferentes organismos.

Con lo desarrollado hasta el momento, se plantean las siguientes preguntas de investigación para este trabajo:

- ¿Qué similitudes y diferencias presentarán las secuencias identificadas como candidatos a transportador de NAD<sup>+</sup> en *T. cruzi* con respecto a otros miembros de esta familia ya caracterizados como transportadores de esta molécula?
- ¿Alguna de las secuencias candidato identificadas para *T. cruzi* tendrá la función de transportador de NAD<sup>+</sup>?
- ¿Cuál es la ubicación subcelular de las proteínas candidato a transportador de NAD<sup>+</sup> en *T. cruzi*? ¿Mostrará esta proteína una localización diferencial en compartimentos dependiendo del estadio de *T. cruzi*?

### **3.Hipótesis**

Por lo menos una proteína perteneciente a la MCF, con la capacidad de transportar  $\text{NAD}^+$  y/u otros nucleótidos hacia el interior de organelos como la mitocondria o los glicosomas, debe existir en el parásito protozoario *T. cruzi*.



## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Estudiar un posible transportador de NAD<sup>+</sup> en el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar por lo menos una de las secuencias candidato a transportador de NAD<sup>+</sup> en el parásito protozoario *T. cruzi* mediante el uso de herramientas bioinformáticas.
- Obtener la proteína candidato a transportador de NAD<sup>+</sup> a partir de proteínas recombinantes en el sistema heterólogo *Escherichia coli*.
- Diseñar un sistema que permita determinar la funcionalidad de la proteína candidato a transportador de NAD<sup>+</sup>, empleando transportadores previamente identificados.
- Evaluar la funcionalidad de la proteína candidato a transportador de NAD<sup>+</sup>.
- Determinar la presencia del candidato a transportador de NAD<sup>+</sup> en el parásito haciendo uso de herramientas inmunológicas.

### 4.3 Objetivos adicionales

Durante el desarrollo de esta tesis, se estableció un proyecto paralelo enfocado al uso de levaduras como sistema de expresión de un fragmento de la RVG. El objetivo central de este acercamiento es expresar el ectodominio (ED) de la RVG como una recombinante en este sistema eucariota *S. cerevisiae*.

Para cumplir con el mismo, se formularon los siguientes objetivos específicos:

- Clonar la secuencia del ED de la RVG en el vector de expresión de *S. cerevisiae* pYES2.

- Obtener células de *S. cerevisiae* transfectadas con el vector de expresión recombinante pYES2-RVG.
- Evaluar la expresión de la RVG recombinante en el sistema heterólogo *S. cerevisiae*

## 5. Metodología

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos para este trabajo, se diseñó la siguiente metodología integrando elementos de bioinformática, biología celular y molecular, y bioquímica; se presenta dividida en aproximación *in silico* y aproximación experimental.

### 5.1 Aproximación *in silico*

Para estudiar a *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3* a nivel bioinformático, se emplearon herramientas y servidores en línea que permitieron ahondar en sus particularidades, pasando por la identificación de elementos característicos de estas proteínas a nivel de secuencia primaria, la predicción de ubicación subcelular, la modelación de estructuras secundaria y terciaria, la simulación de la interacción con el ligando de interés, y la determinación de posibles sitios blanco de modificaciones postraduccionales; en este apartado se presenta con detalle los procedimientos llevados a cabo.

- **Análisis de estructura primaria de los candidatos**

Las secuencias de aminoácidos de los transportadores de NAD<sup>+</sup> *AfNdt1* (NP\_566102.1), *AfNdt2* (NP\_001321077.1), *PXN* (NP\_181526.1), *ScNdt1* (NP\_012260.1), *ScNdt2* (NP\_010910.1), *SLC25A17* (NP\_001269655.1), *SLC25A51* (NP\_219480.1), *AfNdt1* (XP\_752148.1) y *LbNdt1* (XP\_001568430.1); al igual que de los transportadores *CbPMP47* (AAC49383.1), *AfPNC1* (NP\_566251.1), *AfPNC2* (NP\_198104.1) y *TbMCP6* (XP\_844316.1), se obtuvieron de la página del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o de la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org>). Se hicieron alineamientos de secuencias, empleando el software MEGA-X 10.1.7, y los algoritmos MUSCLE y CLUSTALW para analizar y visualizar las secuencias<sup>94</sup>.

- **Predicción de dominios de proteína a partir de la secuencia de aminoácidos**

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3* se sometieron a las herramientas de predicción del servidor InterPro<sup>95</sup> y a la herramienta HMMER del EMBL-EBI<sup>96</sup>, para determinar los posibles dominios de proteína presentes en los candidatos.

- **Predicción de ubicación subcelular de los candidatos**

Las secuencias de aminoácidos de los candidatos se sometieron a los servidores Euk-PLoc 2.0<sup>97,97,98</sup> iLoc-Animal<sup>99</sup>, MultiLoc2<sup>100</sup> y DeepLoc-1.0<sup>101</sup>, con el fin de tener un acercamiento a la función biológica de estos mediante la predicción de su ubicación subcelular.

- **Predicción de la estructura secundaria de los candidatos y**

Se trabajó con el servidor PHYRE<sup>2</sup><sup>102</sup> para obtener un modelo del plegamiento de las proteínas candidato *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3* a nivel de estructura secundaria.

- **Predicción de la estructura terciaria de los candidatos**

Las secuencias de aminoácidos de los candidatos se enviaron al servidor ROBETTA para obtener modelos tridimensionales de las proteínas; para generar los modelos en los estados C y M de *TcNdt1* y *TcNdt2* se empleó el algoritmo de modelación comparativa (CM)<sup>103</sup>, y a las estructuras 4C9G y 6GCI del PDB como plantillas, respectivamente. La secuencia *TcNdt3* fue modelada empleando el algoritmo *RoseTTA fold*<sup>104</sup>. Los modelos fueron visualizados con el software ChimeraX 1.2.5<sup>105</sup>, y se validaron mediante plot de Ramachandran (ChimeraX), y hallando Z-score y RMS-Z-score en el servidor PROVE<sup>106</sup>.

- **Predicción de interacción proteína-ligando para los candidatos *TcNdt1* y *TcNdt2* mediante *docking* molecular**

Los modelos en estado C de *TcNdt1* y *TcNdt2* fueron preparados en AutoDockTools 1.5.6<sup>107</sup>, y la estructura tridimensional del NAD<sup>+</sup> (PubChem) fue preparada en PyMOL2 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC.) y AutoDockTools 1.5.6. Las condiciones de búsqueda de sitios de unión en el sistema proteína-ligando fueron establecidas en AutoDockTools 1.5.6 y el *docking* molecular fue realizado en AutoDock Vina<sup>108</sup>; la predicción de interacciones se hizo con el servidor PLIP<sup>109</sup> y la visualización se llevó a cabo en ChimeraX 1.2.5.

- **Predicción de modificaciones postraduccionales de los candidatos**

Se emplearon los servidores NetPhos 3.1 Server<sup>110,111</sup>, NetAcet 1.0 Server<sup>112</sup>; NetOGlyc 4.0 Server<sup>113</sup> y NetNGlyc 1.0 Server<sup>114</sup>, para obtener un panorama general de las posibles modificaciones postraduccionales de las que podrían ser objeto los candidatos.

## 5.2 Aproximación experimental

La caracterización funcional se adelantó con las secuencias *TcNdt1* y *TcNdt2*, y para ello se diseñó una metodología que integra múltiples herramientas experimentales de biología molecular, microbiología y bioquímica. Inicialmente se diseñaron *primers* para la amplificación de insertos de interés y se construyeron plásmidos de expresión. Se confirmó la actividad transportadora de NAD<sup>+</sup> por complementación de levaduras mutantes y se produjeron los insumos para el uso de la proteína MISTIC (alternativa en la caracterización

funcional de transportadores) en bacterias. Se expresaron diferentes proteínas recombinantes en el sistema *E. coli*, y una de ellas se empleó en la producción de IgY para el reconocimiento y determinación de localización de la *TcNdt2* endógena, lo cual se consiguió por inmunofluorescencia. A continuación, se presenta a mayor detalle la estrategia mencionada.

### 5.2.1 Diseño de *primers* para amplificar fragmentos de interés

Se diseñaron *primers* para amplificar los fragmentos de interés (**Tabla 1**), teniendo en cuenta recomendaciones de longitud (18-30 pb), contenido de GC (40-60%), y Tm (52-58°C)<sup>115</sup>. Adicional a las bases específicas para las secuencias (indicadas en mayúsculas), sitios de restricción específicos fueron incorporados para cada set de *primers* (minúsculas); a medida que se avance, se especificará el set de *primers* empleado en cada caso.

**Tabla 1.** Características de *primers* diseñados para la aplicación de fragmentos de interés mediante PCR.

No. set	Nombre	Enzima de restricción	Secuencia	Características		
				Long. (pb)	%GC	Tm (°C)
1	TcTNTBd_pYES	BamHI	ggatcc.ATG.GTT.TCA.GTG.AGG.ACG	24	54,2	59,4
	TcTNTBr_pYES	EcoRI	gaattc.CTA.TAA.GCG.ATG.CAT.AAA.ATA.C	28	32,1	52,8
2	TcNdt3_d_pYES	BamHI	ggatcc.ATG.TCC.ACC.ACA.GCT.GGA.A	25	56,0	62,8
	TcNdt3_r_pYES	EcoRI	gaattc.TTA.ATC.GGC.CTC.AGA.GAC.CGC	27	51,9	60,9
3	TcTNTBd_MISTIC	BamHI	ggatcc.ATG.GTT.TCA.GTG.AGG.ACG	24	54,2	59,4
	TcTNTBr_MISTIC	HindIII	aagctt.TAA.GCG.ATG.CAT.AAA.ATA.C	25	32,0	52,5
4	TcNdt3_MISTICd	BamHI	ggatcc.ATG.TCC.ACC.ACA.GCT.GGA	24	58,3	62,9
	TcNdt3_MISTICr	HindIII	aagctt.ATC.GGC.CTC.AGA.GAC.CGC	25	58,3	62,8
5	AtNdt2f_MISTIC	BamHI	ggatcc.ATG.ATT.GAA.CAT.GGG.AAC	24	45,8	56,1
	AtNdt2r_MISTIC	SalI	gtcgac.TTT.GCT.TCC.AAG.AGG.GAT	24	50,0	59,0
6	ScNdt1f_MISTIC	BamHI	ggatcc.ATG.ACA.CAG.ACT.GAT	21	47,6	615,0
	ScNdt1r_MISTIC	HindIII	aagctt.AAT.TAC.CAT.AGT.GCT.AAT	24	29,2	29,2
7	ScNdt2f_MISTIC	BamHI	ggatcc.ATG.AAT.AAT.GGA.GAC	21	42,9	58,1
	ScNdt2r_MISTIC	HindIII	aagctt.TTG.AAA.AAA.AGT.AGT.TAA.A	25	54,7	54,7
8	pYES2_GlicRab_d	HindIII	aagctt.ATG.AAG.TTC.CCG.ATT.TAC	24	37,6	53,2
	pYES2_GlicRab_r	EcoRI	gaattc.CTAGTA.TTTACC.CCAATT.CG	26	38,5	53,6

### 5.2.2 Diseño de un sistema que permita determinar la funcionalidad de las proteínas candidato a transportador de NAD<sup>+</sup> *TcNdt2* y *TcNdt3* empleando transportadores previamente identificados

A lo largo del desarrollo de esta tesis de maestría se contó con la posibilidad de trabajar con 2 sistemas que permitieron abordar el estudio funcional de candidatos a transportador de NAD<sup>+</sup>, y de igual manera, con ellos se manejaron 2 enfoques metodológicos: (1) ensayos de complementación con células mutantes de *S. cerevisiae* y, (2) generación de los insumos para evaluación de la capacidad de transporte mediante uso de la proteína fusión MISTIC de *B. subtilis*. A continuación, se detalla cada una de estas aproximaciones.

### **Estrategia de ensayos de complementación**

- **Clonación de los candidatos *TcNdt1* y *TcNdt2* en el vector pGEM-T-Easy**

Las secuencias *TcNdt1* y *TcNdt2* fueron amplificadas por PCR con Taq polimerasa a partir de gDNA de *T. cruzi* CLBrenner, en termociclador Veriti Applied Biosystems, y haciendo uso de los Set de *primers* No. 2 y 1 (**Tabla 1**), respectivamente. Las reacciones se hicieron a un volumen de 15  $\mu$ L, constando de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, buffer 10X de PCR (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, primers directo y reverso 0,2 $\mu$ M, dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 0,2 mM, y Taq polimerasa (0,5U). Se empleó 1,0  $\mu$ L de gDNA a 200 ng/ $\mu$ L como plantilla (como control negativo se empleó H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>). Para la amplificación se hizo un paso inicial de desnaturalización a 94°C/10 minutos seguido de 25 ciclos de amplificación con pasos de desnaturalización 94°C/30 segundos, *annealing* 54°C (*TcNdt1*) o 56°C (*TcNdt2*)/1 minuto y extensión 72°C/1 minuto; se programó un último ciclo con pasos de extensión de 72°C/10 minutos y *hold* a 4°C. Con los productos de la reacción se hizo electroforesis en gel de agarosa 1,0 % en buffer TBE 0,5X, esta se corrió a 100V/55 minutos y se hizo tinción con bromuro de etidio<sup>116</sup>. La documentación se hizo en un analizador de imágenes Imager® Gel Doc™ XR, con el software Quantity One Basic 4.6.3 de BIORAD™. Cuando fue necesario, los productos de PCR fueron purificados de banda empleando el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System<sup>117</sup>.

Tras la obtención de los fragmentos de interés, se hizo la clonación en el vector de mantenimiento pGEM-T-Easy/TA siguiendo las indicaciones del fabricante (1,0  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 3,0  $\mu$ L de producto de PCR, 1,0  $\mu$ L del vector (50 ng/  $\mu$ L), 5,0  $\mu$ L de buffer 2X de ligasa T4 (Tris-HCl pH 7,8 60mM; MgCl<sub>2</sub> 20mM; DTT 20mM; ATP 2mM; PEG8000 10%) y 1,0  $\mu$ L de ligasa T4 (4,0U))<sup>118</sup>. Se manejó una relación 1:3 vector:inserto; la reacción se incubó a 16°C/3 horas, luego se inactivó la ligasa a 65°C/20 minutos, y posteriormente se dejó a 4°C/*overnight*.

- **Transformación de células *E. coli* por choque térmico**

Se transformaron células *E. coli* TOP10 con los vectores provenientes de la ligación por choque térmico<sup>119</sup>; tras la transformación y recuperación de las células, estas se platearon en cajas de Petri con LB-Agar (Peptona 10 g/L; Extracto de levadura 5 g/L; NaCl 10 g/L, Agar 15g/L) y ampicilina 100  $\mu$ g/mL, IPTG 100mM y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) 50 $\mu$ g/mL, preparado en dimetilformamida 100%<sup>118</sup> para dejarlas a 37°C/*overnight*. Las colonias obtenidas se evaluaron por PCR con las condiciones establecidas previamente; el DNA plantilla para se obtuvo resuspendiendo la colonia a evaluar en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> y lisándola durante 10 minutos en H<sub>2</sub>O a 95°C. Los productos de la PCR de colonia se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,0% en buffer TBE 0,5X, esta se corrió a 100V/55 minutos y se hizo tinción con bromuro de etidio.

- **Extracción de plásmidos recombinantes por lisis alcalina**

Se hizo un inóculo líquido de 10 mL de medio LB con antibiótico para cada una de las colonias positivas seleccionadas, y se dejaron creciendo a 37°C/*overnight* con agitación.

Se empleó el método de extracción de plásmido por lisis alcalina, para ello inicialmente se centrifugó el inóculo líquido a 6000rpm/15 minutos en una centrífuga Thermo Scientific Megafuge 16R, el sobrenadante fue descartado y se sometió al pellet al siguiente tratamiento: se resuspendió en 300  $\mu$ L de la solución de lisis I (Glucosa 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8,0 y EDTA 2,5mM pH 8,0) y se incubó con agitación constante a 4°C/5 minutos; luego se agregaron 300  $\mu$ L de solución de lisis II (NaOH 0,2N y SDS 1% p/v), se mezcló por inversión y se incubó a 4°C/5 minutos; y posteriormente se agregaron 300 $\mu$ L de solución de lisis III (buffer acetato 3M pH 4,8), se mezcló por inversión y se incubó a 4°C/5 minutos; se centrifugó a 12000rpm/15 minutos y el sobrenadante fue tratado con RNasa (10ng/mL) a 37°C/30 minutos.

Se precipitó el DNA plasmídico agregando 2,5 volúmenes de Etanol (EtOH) absoluto y 1/10 volúmenes de solución de lisis III, se mezcló por inversión y se incubó a -20°C/20 minutos. A continuación se centrifugó a 12000rpm/15 minutos/4°C y el pellet obtenido se lavó repetidamente con Etanol (EtOH) 70%; tras retirar el EtOH y permitir que este se evaporara el DNA plasmídico se resuspendió en H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub><sup>119</sup>.

Los plásmidos extraídos fueron visualizados en gel de agarosa 1,0% en TBE 0,5X con tinción de bromuro de etidio. Se hizo PCR de plásmido para corroborar la presencia de los insertos siguiendo las especificaciones establecidas para el candidato<sup>120</sup>.

- **Liberación de los insertos *TcNdt1* y *TcNdt2*, y linealización de pYES2 empleando las enzimas de restricción BamHI y EcoRI**

Se hizo una doble digestión enzimática con las enzimas BamHI y EcoRI de los plásmidos pGEM-T-*TcNdt1*, pGEM-T-*TcNdt2* y pYES2 (vacío), con el fin de liberar los insertos *TcNdt1* *TcNdt2* y de generar extremos cohesivos que permitieran la correcta ligación en el vector de expresión de *S. cerevisiae*; inicialmente se hizo digestión con la enzima BamHI siguiendo las especificaciones del manual para doble digestión (1,0  $\mu$ L de enzima (10U/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L de Buffer BamHI 10X (100mM Tris-HCl pH 8,0, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 0,02% Tritón X-100, 0,1 mg/mL BSA), 1,0  $\mu$ L de plásmido, y se llevó a volumen final de 10,0  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>), la reacción se incubó a 37°C/*overnight*. Al siguiente día se suplementó la reacción con 1,0  $\mu$ L de Buffer BamHI 10X, y se le agregaron 2,0  $\mu$ L de la enzima EcoRI (10U/ $\mu$ L), se incubó a 37°C/*overnight*. La doble digestión se monitoreó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,0% para comprobar la obtención de los productos esperados, y tras conseguirlo, se procedió a purificar de banda a los insertos *TcNdt1* y *TcNdt2*, mientras que en el caso del pYES2, se inactivaron las enzimas de la reacción a 80°C/20 minutos.

- **Clonación de los candidatos *TcNdt1* y *TcNdt2* en el vector de expresión pYES2**

Con los productos de la digestión, se llevó a cabo la ligación de los insertos *TcNdt1* y *TcNdt2* en el vector pYES2 (4,0  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>; 1,0  $\mu$ L de buffer de ligasa T4 10X; 3,0  $\mu$ L de inserto, 1,0  $\mu$ L de vector; y 1,0  $\mu$ L de T4 ligasa (4,0U)), las reacciones se incubaron a 16°C/3 horas, luego se inactivó la ligasa a 65°C/20 minutos, y posteriormente se dejó a 4°C/*overnight*. Con los productos de ligación se transformaron células *E. coli* TOP10, se

rastrear las transformante por PCR de colonia, y de aquellas positivas se hizo extracción de plásmido por lisis alcalina. Se hizo PCR de plásmido para corroborar la presencia del inserto.

- **Corroboración de la identidad de los plásmidos pYES2-*TcNdt1* y pYES2-*TcNdt2* mediante digestión enzimática**

Con el fin de corroborar la identidad del plásmido recombinante pYES2-*TcNdt1*, este se sometió a digestión enzimática con EcoRV<sup>121</sup> (1,0 µL de enzima EcoRV (10U/µL), 1,0 µL de Buffer R 10X (Tris-HCl 100mM (pH 8,5), MgCl<sub>2</sub> 100mM, KCl 1,0M, BSA 1,0 mg/mL), 1,0 µL de plásmido y 7,0 µL H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>), y la reacción se incubó a 37°C/*overnight*. Para el caso de pYES2-*TcNdt2*, se hizo digestión enzimática con NheI<sup>122</sup> (1,0 µL de enzima NheI (10U/µL), 1,0 µL de Buffer Tango 10X (Tris-Acetato 330mM pH 7,9, Acetato de magnesio 100mM, Acetato de potasio 66mM y BSA 1 mg/mL), 1,0 µL de plásmido y 7,0 µL H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>), y la reacción se incubó a 37°C/30 minutos. En ambos experimentos se evaluó el resultado mediante electroforesis en gel de agarosa 1,0% en TBE 0,5X (90V/75 minutos) y se visualizó con bromuro de etidio<sup>116</sup>.

- **Generación de células *S. cerevisiae* competentes y transfección por choque térmico**

Células de *S. cerevisiae* de las cepas **INVSc1** (MATa his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52, Thermo), **Δndt1** (BY4742; MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YIL006w::kanMX4, Euroscarf), y **Δndt2** (BY4741; MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YEL006w::kanMX4, Euroscarf), fueron transfectadas por el método de LiAc/ssDNA/PEG3350<sup>123</sup> con los plásmidos pYES2-vacío, pYES2-*AtNdt2* (generado en un trabajo paralelo<sup>46</sup>), pYES2-*TcNdt1* y pYES2-*TcNdt2*. En cada caso, se hizo un inóculo de células de *S. cerevisiae* de la cepa requerida en 10 mL de medio YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L y glucosa 20 g/L) y se dejaron creciendo en agitación a 30°C/*overnight*. Al siguiente día se determinó OD<sub>600nm</sub> del inóculo, con este se llevaron 25 mL de YPD a una OD<sub>600nm</sub> de 0,4 y se dejaron creciendo a 30°C/3 horas. Las células se centrifugaron a 2500rpm/5 minutos y se resuspendieron en 20 mL de TE 1X (Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1mM); se volvió a centrifugar a 2500rpm/5 minutos, se resuspendieron las células en 2 mL de LiAc 1X (LiAc 100mM pH 7,5)/TE 0,5X y se incubaron a temperatura ambiente/10 minutos. En cada transformación se empleó 1,0 µg de plásmido y 100 µg de ssDNA de esperma de salmón, que se mezclaron con 100 µL de suspensión de células y 700 µL de LiAc 1X/PEG3350 40% /TE 1X; la solución se incubó a 30°C/30 minutos. Seguido se agregaron 88 µL de DMSO y se hizo choque térmico a 42°C/7 minutos. Se hizo una corta centrifugación por *spin* de las células y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de TE 1X, el paso de *spin* se repitió y las células se resuspendieron en 100 µL de TE 1X; este volumen final fue plateado en cajas de medio sintético completo sin uracilo (SC(-U), Thermo) (base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos 6,7 g/L, suplemento sintético para levaduras sin uracilo 1,9 g/L, glucosa 2%, agar 2%) y se dejaron en crecimiento a 30°C por dos días hasta obtener colonias de al menos 1,0 mm de diámetro.

Las colonias obtenidas fueron evaluadas por PCR de colonia siguiendo los parámetros previamente descritos para *E. coli*, con la modificación de que el DNA plantilla se obtuvo resuspendiendo una mínima cantidad de células de las colonias en H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, estas se congelaron a -80°C/15 minutos y luego se calentaron a 94°C/15 minutos, y esto se hizo dos veces. Por último, de las colonias positivas se hicieron criopreservados en glicerol 15% (v/v) que fueron almacenados a -80°C.

- **Ensayos de complementación empleando líneas transfectantes de *S. cerevisiae***

A partir de los criopreservados almacenados, se hicieron estriados en cajas de medio SC(-U) de las cepas INVSc1+pYES2-vacío,  $\Delta ndt1$ +pYES2-vacío,  $\Delta ndt1$ +pYES2-TcNdt1,  $\Delta ndt1$ +pYES2-TcNdt2,  $\Delta ndt2$ +pYES2-vacío,  $\Delta ndt2$ +pYES2-TcNdt1,  $\Delta ndt2$ +pYES2-TcNdt2; una vez se obtuvieron colonias, estas se inocularon en 5,0 mL de medio líquido SC(-U) con rafinosa 1% y se permitió su crecimiento en agitación a 30°C por 3 días. A partir de estos inóculos se tomó la cantidad de células requeridas para alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0,4, se realizó cambio a medio de inducción SC(-U) con galactosa 2% y rafinosa 1%, y se permitió la expresión de la proteína a 30°C por 18 horas. Las células se diluyeron nuevamente en medio de inducción a una OD<sub>600nm</sub> de 0,2, y a partir de esta suspensión se prepararon 6 diluciones seriadas desde una OD<sub>600nm</sub> de  $2,0 \times 10^{-2}$  hasta  $2,0 \times 10^{-7}$ . Gotas de 2,0  $\mu$ L de cada dilución fueron dispuestas de manera horizontal tanto en cajas de SC(-U) con glucosa 2% como de SC(-U) con glicerol 2%; se permitió el crecimiento a 30°C, y se monitoreó cada 24 horas hasta el punto de crecimiento óptimo; por último, se hizo registro fotográfico de las cajas de Petri<sup>124</sup>.

### **Estrategia con proteína fusión MISTIC**

- **Extracción de gDNA de *S. cerevisiae* de la cepa INVSc1**

Con el fin de contar con el material genético plantilla para amplificar las secuencias ScNdt1 y ScNdt2, se extrajo gDNA de células de *S. cerevisiae* de la cepa INVSc1 de la siguiente manera. Se tomaron 2,0 mL de cultivo de levaduras en medio YPD a OD<sub>600nm</sub> de 1,0, se centrifugaron a 6000 rpm/5 minutos y se lavaron con el mismo volumen de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Se volvió a centrifugar a 6000 rpm/5 minutos y se resuspendió en 1,0 mL de LiAc 200mM - SDS 1%, las células se incubaron a 4°C/10 minutos y luego a 75°C/10 minutos; se centrifugó a 3000 rpm/1 minuto, se descartó el pellet, y el sobrenadante fue tratado con RNase a 37°C/30 minutos. Seguido se hizo precipitación con 2,5 volúmenes de EtOH absoluto a -20°C/5 minutos, se centrifugó a 16000g/5 minutos, y el pellet se lavó EtOH al 70% 2 veces; el EtOH fue retirado y el producto final fue resuspendido en 100,0  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

- **Clonación de TcNdt1, TcNdt2, A#Ndt2, ScNdt1 y ScNdt2 en el vector pGEM-T-Easy**

Las secuencias TcNdt1, TcNdt2, A#Ndt2, ScNdt1 y ScNdt2 se amplificaron mediante PCR usando los Set de *primers* 3 al 7 (**Tabla 1**); las temperaturas de *annealing* empleadas fueron de 56, 56, 62, 54 y 48°C, respectivamente. Para todas las secuencias se empleó gDNA como plantilla, a excepción del transportador de *A. thaliana* que se amplificó a partir del pYES2-A#Ndt2. Las reacciones se hicieron con Taq polimerasa en termociclador Veriti Applied Biosystems, siguiendo los mismos parámetros de volumen y concentración de los

reactivos ya descritas. Para la amplificación se hizo un paso inicial de desnaturalización a 94°C/10 minutos seguido de 30 ciclos de amplificación con pasos de desnaturalización 94°C/30 segundos, *annealing* por 1 minuto y extensión 72°C/1 minuto; se programó un último ciclo con pasos de extensión de 72°C/10 minutos y *hold* a 4°C. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

Tras la obtención de los fragmentos de interés, se hizo la clonación en el vector de mantenimiento pGEM-T-Easy/TA siguiendo las indicaciones del fabricante (4,0 µL H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 3,0 µL de producto de PCR, 1,0 µL del vector (50 ng/µL), 1,0 µL de buffer 10X de ligasa T4 (Tris-HCl 400 mM, pH 7,8; MgCl<sub>2</sub> 100 mM; DTT 100 mM; ATP 5 mM) y 1,0 µL de ligasa T4 (4,0U))<sup>118</sup>. La reacción se incubó a 16°C/3 horas, luego a 65°C/20 minutos, y finalmente a 4°C/*overnight*.

- **Obtención de los plásmidos recombinantes pGEM-T**

Se transformaron células *E. coli* TOP10 por choque térmico con los productos de ligación siguiendo los parámetros ya descritos; tras rastrear las colonias obtenidas, se dejaron inóculos líquidos de aquellas positivas y se hizo extracción de los plásmidos por lisis alcalina; se hizo PCR de los plásmidos para confirmar la presencia de la secuencia de interés en los vectores construidos.

- **Liberación de los insertos y linealización de pET28-MISTIC mediante digestión con enzimas de restricción**

Para cada constructo se hizo una doble digestión enzimática sobre el vector recombinante pGEM-T usando a BamHI, EcoRI, Sall y HindIII (el par de enzimas empleado en la liberación del inserto se especifica en cada caso en la **Tabla 1**), y asimismo, el vector pET28-MISTIC (que otorga las etiquetas MISTIC (N-terminal) y 6xHis (C-terminal); donado por el Dr. Wolfram Antonini del Laboratorio Friedrich Miescher, miembro de la Sociedad Max Planck – Tübingen, Alemania) fue digerido con el correspondiente par de enzimas para poder recibir las secuencias liberadas del plásmido donante. En todos los casos la doble digestión inició con la enzima BamHI, siguiendo las especificaciones del manual (1,0 µL de enzima (10U/µL), 1,0 µL de Buffer BamHI 10X, plásmido, y se llevó a volumen final de 10,0 µL con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>), y las reacciones se incubaron a 37°C/*overnight*. Al siguiente día se suplementó cada reacción con 1,0 µL de Buffer BamHI 10X, se le agregaron 2,0 µL de la segunda enzima correspondiente (10U/µL), y se incubó a 37°C/*overnight*. La doble digestión en cada caso se monitoreó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,0% para comprobar la obtención de los productos esperados, y tras conseguirlo, se procedió a purificar de banda los insertos, y a inactivar las enzimas a 80°C/20 minutos en las reacciones del vector pET28-MISTIC.

- **Clonación de TcNdt1, TcNdt2, ArNdt2, ScNdt1 y ScNdt2 en el vector de expresión pET28-MISTIC**

Con los productos de las digestiones se llevó a cabo la ligación de cada una de las secuencias transportadoras en el vector pET28-MISTIC (1,0 µL de buffer de ligasa T4 10X;

3,0 - 5,0  $\mu\text{L}$  de inserto, 1,0  $\mu\text{L}$  de vector, 1,0  $\mu\text{L}$  de T4 ligasa (4,0U), y se llevó a volumen final de 10,0  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ , esta reacción se incubó a  $16^\circ\text{C}/3$  horas, seguido de un paso a  $65^\circ\text{C}/20$  minutos, y por último se dejó a  $4^\circ\text{C}/\text{overnight}$ . Con los productos de ligación se transformaron células *E. coli* TOP10, se rastrearon transformantes por PCR de colonia y de aquellas positivas se hizo extracción de plásmido por lisis alcalina. Se hizo PCR de plásmido para corroborar la presencia de los insertos.

- **Corroboración de la identidad de los plásmidos pET28-MISTIC recombinantes mediante digestión enzimática con BamHI**

Con el fin de corroborar la identidad de los plásmidos pET28-MISTIC en donde se clonó a los transportadores *TcNdt1*, *TcNdt2*, *AfNdt2*, *ScNdt1* y *ScNdt2*, se realizó digestión enzimática con las enzimas BamHI, HindIII, NheI, KpnI y EcoRV, siguiendo los parámetros descritos en el apartado anterior; en la **Tabla 7** se especifica el set de enzimas empleado en cada caso. Las reacciones se incubaron a  $37^\circ\text{C}/\text{overnight}$ , se hizo electroforesis de los productos de la reacción en gel de agarosa 1,0% en TBE 0,5X (90V/75 minutos) y se visualizaron con bromuro de etidio.

- **Expresión de las proteínas *TcNdt1*, *TcNdt2*, *AfNdt2*, *ScNdt1* y *ScNdt2* unidas a la proteína fusión MISTIC**

Para conseguir la expresión de las proteínas recombinantes MISTIC-transportador, se emplearon los 5 plásmidos construidos en la transformación de células *E. coli* BL21 (DE3), y con las transformantes se hicieron inóculos de 5 mL de LB con kanamicina, que se dejaron creciendo a  $37^\circ\text{C}/\text{overnight}$  con agitación constante. Al día siguiente se hizo una dilución 1:50 en medio LB y con kanamicina, y se permitió su crecimiento hasta una  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  de 0,5. La inducción de la expresión se hizo con IPTG 1mM a  $37^\circ\text{C}$  con agitación constante, y muestras a distintos tiempos de inducción se colectaron por centrifugación a 6000rpm/10 minutos/ $4^\circ\text{C}$ ; el pellet bacteriano se conservó a  $-20^\circ\text{C}$  para ser procesado.

De manera particular, para conseguir la expresión de la proteína MISTIC-*TcNdt2*-6xHis, se evaluó tanto el efecto de emplear la cepa BL21-CodonPlus (CodonPlus), como el efecto de la temperatura y la concentración de IPTG sobre el proceso de inducción. En la evaluación del cambio de cepa, células BL21 y CodonPlus fueron transformadas con pET28-MISTIC-*TcNdt1* y pET28-MISTIC-*TcNdt2*, y se llevó a cabo la inducción con IPTG 1mM a  $37^\circ\text{C}$ . Para la evaluación de temperatura e IPTG, células *E. coli* BL21 se transformaron con pET28-MISTIC-*TcNdt2* y se hizo el mismo procedimiento para inducir hasta tener a las células en  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  de 0,5; en este punto el cultivo se dividió en los siguientes tratamientos, 2 temperaturas (25 y  $37^\circ\text{C}$ ), y 5 concentraciones de IPTG (0,1-0,5-1,0-2,0 y 3,0 mM), para un total de 10 muestras diferentes. Estas inducciones se hicieron *overnight* y se evaluó en extractos totales de proteína.

En la obtención de extractos totales de proteína, las células se resuspendieron en buffer de carga 1X (Tris 0,083M, SDS 1,74%, Glicerol 15%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5,5% y azul de bromofenol 0,002%), y se desnaturalizaron a  $94^\circ\text{C}/15$  minutos. Para la obtención de fracciones insolubles de proteína, se hizo lisis celular con buffer de lisis ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100mM,

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM, NaCl 400mM, KCl 100mM, Imidazol 10mM, Tritón X-100 2% (v/v), Glicerol 20% (v/v); se agregaron 5,0 mL de buffer por cada 1,0 g de pellet obtenido, coctel inhibidor de proteasas 1:400 y se dejaron las células en agitación constante a 4°C/1 hora, seguido de esto se sonicaron a 50% de amplitud 15 segundos/pulso y 15 segundos/reposo durante 3 minutos. El lisado se centrifugó a 12000rpm/20 minutos/4°C y se conservaron las fracciones insolubles a -20°C, las cuales se resuspendieron en buffer de carga 1X, y se desnaturalizaron a 94°C/15 minutos. Para el análisis de los extractos proteicos se hizo un SDS-PAGE discontinuo (110V/1h) utilizando un gel concentrador de 3,9% y un separador de 12% (%T); para la visualización del gel se hizo tinción con Azul de Coomassie R-250<sup>125</sup>

- **Detección de las proteínas recombinantes mediante *western blot***

Para confirmar la obtención de las proteínas recombinantes se realizaron ensayos de inmunodetección a los extractos de proteína; se hizo una separación por SDS-PAGE seguida de una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa con buffer de transferencia (Tris 25mM, Glicina 192mM y Metanol 10%, pH 8,3) a 200mA/2 horas. Se hizo tinción con rojo Ponceau S y se marcaron los marcadores de peso, posteriormente se retiró la tinción con H<sub>2</sub>O. La membrana se bloqueó con TBS-T Leche 5% (Tris-HCl 20mM pH 7,5, NaCl 150mM y Tween-20 0,1%) con agitación constante por 2h. Seguido, se incorporó el anticuerpo primario  $\alpha$ -6xHis-*mouse* en dilución 1:5000 preparado en TBS-T, dejando en agitación constante junto con la membrana e incubando por 1h. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario  $\alpha$ -*mouse* acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:10000 preparado en TBS-T y se dejó en agitación constante durante 1h. Se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T entre cada uno de los pasos mencionados. Por último, se reveló la membrana empleando sustratos cromogénicos, se prepararon 16,5  $\mu$ L NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride, S380C, Promega (50mg/mL en 70% dimetilformamida)) y 16,5  $\mu$ L NBCIP (5-Bromo- 4-Chloro- 3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt, S381C Promega (50mg/mL en 100% dimetilformamida)) en 4mL Buffer sustrato de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100mM pH 9,0, NaCl 150 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM), se introdujo la membrana, se dejó reaccionar hasta ver la aparición de señales correspondientes a proteínas y la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> y secado<sup>126</sup>.

- **Ensayos piloto de transporte de NAD<sup>+</sup> en células *E. coli* con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH)**

Células *E. coli* BL21-CodonPlus fueron transformadas con los plásmidos pET28-MISTIC vacío (CodonPlus-MISTIC) y pET28-MISTIC-ScNdt1 (CodonPlus-ScNdt1), y adicionalmente se manejaron células no transformadas (CodonPlus-NT). Con las células se llevó a cabo el protocolo de inducción con IPTG, siguiendo las condiciones establecidas previamente, y se permitió la expresión de proteína a 37°C por 2 horas. Una vez cumplido este tiempo, para los tratamientos CodonPlus-NT, CodonPlus-MISTIC y CodonPlus-ScNdt1, las células fueron colectadas y lavadas 2 veces con PBS 1X (centrifugando a 6000rpm/10 minutos); seguido se resuspendieron en el mismo volumen de PBS 1X, y se dividió en 2 tubos diferentes. Uno de los tubos se incubó con NAD<sup>+</sup> 1mM a 25°C durante 1 hora con agitación constante, mientras que al otro no se le suministró NAD<sup>+</sup>. Cumplido este

tiempo, las células se colectaron y se lavaron 3 veces con PBS 1X; tras el último lavado, se descartó el PBS sobrenadante, y el pellet celular fue tratado con HCl 0,3 M (7mL/g de células) y se incubó a 80°C/10 minutos, para extraer el NAD<sup>+</sup> intracelular. Posteriormente se neutralizó con NaOH 0,35M y se centrifugó a 12000rpm/10 minutos, el sobrenadante fue colectado y almacenado a -80°C hasta su uso.

Para determinar si la expresión del transportador de NAD<sup>+</sup> incrementa los niveles intracelulares del dinucleótido con respecto a los tratamientos control en *E. coli*, los extractos obtenidos fueron empleados como sustrato para la reacción de la alcohol deshidrogenasa (ADH, EC 1.1.1.1), que a partir del NAD<sup>+</sup> produce NADH, molécula cuantificable mediante espectrofotometría (absorbe a 340nm). Cada reacción se hizo a temperatura ambiente en un volumen de 1,0 mL; se agregaron 440,0 µL de buffer pirofosfatos (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>•10H<sub>2</sub>O) 100mM (suplementado con semicarbazida 5mg/mL, pH 8,8); 32,0 µL de EtOH absoluto, 526,0 µL de extracto de NAD<sup>+</sup>, y 2,0 µL (2,0U/µL) de ADH. Antes de agregar la ADH, las reacciones fueron blanqueadas en el espectrofotómetro, y tras proporcionar la enzima, se registró la formación del NADH a 340 nm/700 segundos<sup>127</sup>.

### **5.2.3 Obtención de la proteína candidato a transportador de NAD<sup>+</sup> TcNdt2 mediante la tecnología de proteínas recombinantes en el sistema heterólogo *E. coli***

- **Amplificación del candidato TcNdt2 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La secuencia del candidato TcNdt2 fue amplificada a partir de gDNA de *T. cruzi* CLBrenner por PCR con Taq polimerasa en termociclador Veriti Applied Biosystems, haciendo uso del Set No. 1 de *primers* de la **Tabla 1**. Las reacciones se hicieron siguiendo los mismos parámetros de volumen y concentración de los reactivos previamente descritas. Se hizo un paso inicial de desnaturalización a 94°C/10 minutos seguido de 25 ciclos de amplificación con pasos de desnaturalización 94°C/30 segundos, *annealing* 56°C/1 minuto, y extensión 72°C/1 minuto; se programó un último ciclo con pasos de extensión de 72°C/10 minutos y *hold* a 4°C. Con los productos de la reacción se hizo electroforesis en gel de agarosa 1,0 % en buffer TBE 0,5X, esta se corrió a 100V/55 minutos y se hizo tinción con bromuro de etidio<sup>116</sup>.

- **Clonación del candidato TcNdt2 en el vector de expresión pETSUMO**

La secuencia TcNdt2 fue clonada en el vector de expresión pETSUMO T/A mediante ligación directa siguiendo las recomendaciones del manual provisto por el fabricante (4,0 µL H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 3,0 µL de producto de PCR con Taq polimerasa purificado de banda, 1,0 µL del vector (25 ng/µL), 1,0 µL de buffer de ligasa T4 10X (Tris-HCl, pH 7,5 60mM; MgCl<sub>2</sub> 60mM; NaCl 50mM; albúmina de suero bovino (BSA) 1 mg/mL; β-mercaptoetanol 70mM; ATP 1mM; DTT 20mM; espermidina 10mM), y 1,0 µL de T4 ligasa (4,0 unidades Weiss/µL)). Se manejó una relación 1:3 vector:inserto; la reacción se incubó a 16°C/3 horas, luego se inactivó la ligasa a 65°C/20 minutos, y posteriormente se dejó a 4°C/*overnight*<sup>128</sup>.

- **Transformación de células *E. coli* de cepa de mantenimiento**

Se transformaron células *E. coli* TOP10 con el vector recombinante pETSUMO-*TcNdt2* por choque térmico<sup>119</sup>; tras la transformación y recuperación de las células, estas se platearon en cajas de Petri con LB-Agar (Peptona 10 g/L; Extracto de levadura 5 g/L; NaCl 10 g/L, Agar 15g/L) y kanamicina 50 µg/mL para dejarlas a 37°C/*overnight*. Las colonias obtenidas se evaluaron por PCR de colonia con las condiciones establecidas previamente para la amplificación del candidato; el DNA plantilla para la PCR se obtuvo resuspendiendo la colonia a evaluar en 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> y lisándola durante 10 minutos en H<sub>2</sub>O a punto de ebullición. Los productos de la PCR de colonia se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,0% en buffer TBE 0,5X, esta se corrió a 100V/55 minutos y se hizo tinción con bromuro de etidio. A partir de colonias positivas se dejaron inóculos líquidos, con los que posteriormente se llevó a cabo la extracción del pETSUMO-*TcNdt2*

- **Corroboración de la identidad del plásmido extraído por digestión con la enzima de restricción *EcoRI***

Con el fin de corroborar la identidad del plásmido recombinante pETSUMO-*TcNdt2* se realizó digestión enzimática con la enzima *EcoRI*<sup>129</sup> siguiendo las especificaciones del manual (1,0 µl (10U/µL) de enzima, 1,0 µL de Buffer *EcoRI* 10X (50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl, 0,02% Tritón X-100, 0,1 mg/mL BSA), 2,0 µL de cada plásmido y 6,0 µL H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>), la mezcla se incubó a 37°C/*overnight*. Se hizo electroforesis del producto de la digestión en gel de agarosa 1,0% en TBE 0,5X (90V/75 minutos) y se visualizó con bromuro de etidio<sup>116</sup>.

- **Expresión de la proteína recombinante 6xHis-SUMO-*TcNdt2* en el sistema heterólogo *E. coli***

Para obtener la proteína recombinante 6xHis-SUMO-*TcNdt2* se transformaron células *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido extraído, siguiendo los parámetros descritos anteriormente. Tras la obtención de colonias, se hizo un inóculo de 7 mL LB y kanamicina, y se dejó creciendo a 37°C/*overnight* con agitación constante. Al día siguiente se hizo una dilución 1:50 del inóculo en medio LB y kanamicina, y se permitió su crecimiento hasta una OD<sub>600nm</sub>=0.5. Se indujo la expresión con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1mM y se colectaron muestras a las 0 horas , 4 horas y *overnight* de las bacterias; por centrifugación a 6000rpm/10 minutos/4°C se obtuvo el pellet bacteriano y se conservó a -20°C<sup>128</sup>. Las muestras se resuspendieron en buffer de carga 1X (Tris 0,083M, SDS 1,74%, Glicerol 15%, β-mercaptoetanol 5,5% y azul de bromofenol 0,002%), y se desnaturalizaron a 94°C/15 minutos. Se hizo un SDS-PAGE discontinuo (110V/1h) utilizando un gel concentrador de 3,9% y un separador de 12% (%T); Para la visualización del gel se hizo tinción con Azul de Coomassie R-250<sup>125</sup>. La inmunodetección de la proteína recombinante se hizo mediante *western blot*, siguiendo las condiciones descritas; como anticuerpo primario se empleó α-6xHis-*mouse* en dilución 1:5000, y como anticuerpo secundario se usó α-*mouse* acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:10000.

## 5.2.4 Determinación de la presencia del candidato a transportador de NAD<sup>+</sup> TcNdt2 en *T. cruzi* haciendo uso de herramientas inmunológicas

- **Obtención de la proteína recombinante 6xHis-SUMO-TcNdt2 para purificación**

Se hizo una inducción de expresión de la proteína 6xHis-SUMO-TcNdt2 a gran escala en 1,0 L de medio LB, siguiendo las condiciones de previamente establecidas, recolectando la totalidad de las células tras 4 horas de inducción. Las células se centrifugaron a 6.000rpm/15 minutos/4°C y se hizo la lisis celular con buffer de lisis (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM, NaCl 400mM, KCl 100mM, Imidazol 10mM, Tritón X-100 2% (v/v), Glicerol 20% (v/v)); se agregaron 5,0 mL de buffer por cada 1,0 g de pellet obtenido, coctel inhibidor de proteasas 1:400 y se dejaron las células en agitación constante a 4°C/1 hora, seguido de esto se sonicaron a 50% de amplitud con ciclos de 15 segundos/pulso y 15 segundos/reposo durante 3 minutos. El lisado se centrifugó a 12000rpm/20 minutos/4°C y se evaluó la presencia de la proteína en las fracciones soluble e insoluble<sup>130</sup>.

Se tomó la fracción insoluble de la lisis con la proteína de interés y se hizo la purificación de la misma a partir de cuerpos de inclusión, para ello se hizo una resuspensión en buffer de lavado 1 (100 mM Tris-HCl pH 7.0, 5mM EDTA, 5 mM DTT, 2M de urea, 2% v/v Tritón X-100) seguido de la homogenización y centrifugación a 12000rpm/30 minutos/4°C, repitiendo este paso 3 veces. Después se resuspendió el pellet en buffer de lavado 2 (100 mM Tris H-Cl pH 7.0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT), se homogeneizó y centrifugó a 12.000rpm/30 minutos/4°C. El pellet se resuspendió en buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 8M cloruro de guanidino), y se centrifugó a 14.000rpm/1h/4°C, se hizo diálisis del sobrenadante durante 24h/4°C en 2L de buffer de diálisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM de NaCl). El producto de la diálisis se centrifugó a 12000rpm/30 minutos/4°C y se recolectó el pellet para almacenarlo a - 20°C<sup>131</sup>.

- **Purificación de la proteína 6xHis-SUMO-TcNdt2 por SDS-PAGE preparativo**

La proteína obtenida tras la purificación a partir de cuerpos de inclusión se resuspendió en buffer de carga 1X y se hizo SDS-PAGE preparativo (10% (%T); 16,0cm X 19,0cm) a 220V/2 horas. Se cargó marcador preteñido (Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180kDa) en ambos extremos del gel con el fin de identificar la proteína de interés según su peso, una vez identificada la zona de interés se cortaron tres bandas de 0,5cm de ancho: una superior, una media y una inferior; las bandas de gel se trituraron y se hicieron eluciones sucesivas con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> a 37°C/*overnight*. Por último, se determinó la concentración de los productos obtenidos en la elución por el método de Bradford<sup>131</sup>.

- **Inmunización de gallinas para la producción de anticuerpos**

Con el fin de obtener IgY  $\alpha$ -6xHis-SUMO-TcNdt2 se inocularon gallinas Hy-Line Brown de 56 semanas de edad siguiendo el esquema de inoculación de la **Tabla 2**. En todas las ocasiones se inyectó 300  $\mu$ L de una solución 1:1 (v/v) de adyuvante de Freund (completo (C) o incompleto (I)) y antígeno o PBS 1X.

**Tabla 2.** Esquema de inmunización diseñado para la producción de IgY  $\alpha$ -6xHis-SUMO-TcNdt2 en gallina.

Esquema de inmunización								
-	Gallina control (PBS 1X)				Gallina TcNdt2			
Inoculación	1	2	3	4	1	2	3	4
Día	0	15	22	29	0	15	22	29
Adyuvante de Freund	C	I	I	I	C	I	I	I
Antígeno ( $\mu$ g)	0	0	0	0	~150	~150	~150	~150
Volumen ( $\mu$ L)	300	300	300	300	300	300	300	300

- **Obtención y evaluación de sueros de gallina**

Se tomaron muestras de sangre de las gallinas antes de iniciar la inmunización, antes de realizar cada inoculación y 15 días después de la última inyección, para un total de 5 sangrías de ~4,0 mL. Las muestras se tomaron con jeringa de 5,0mL en tubos con anticoagulante, se incubaron a 37°C/30 minutos y luego se centrifugaron a 5000g/10 minutos/4°C. Se caracterizaron los anticuerpos de suero mediante *western blot*, analizando la capacidad de detección de la proteína por parte de los diferentes sueros colectados, determinando la mínima cantidad de proteína reconocible manejando una dilución de 1:5000, y la máxima dilución de anticuerpo capaz de reconocer dicha mínima cantidad de proteína. Los *western blot* se llevaron a cabo siguiendo la misma metodología descrita previamente, pero cambiando el anticuerpo primario por los sueros obtenidos, y el anticuerpo secundario por el  $\alpha$ -*chicken* acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:10000.

- **Purificación a pequeña escala de IgY  $\alpha$ -6xHis-SUMO-TcNdt2 de yema de huevo**

Durante los 36 días del esquema de inoculación se recolectaron 33 huevos, de cada uno de ellos se obtuvo una fracción proteica enriquecida en IgY de la siguiente manera: se separaron la clara y la yema, esta última fue transferida a un tubo Falcon de 50 mL y fue resuspendida en 2 volúmenes de PBS 1X, obteniendo al final cerca de 50 mL de fracción de proteínas totales. Se tomó una alícuota de 1 mL de cada uno de los huevos y se hizo una primera precipitación adicionando PEG6000 a una concentración de 3,5% (%m/v), se incubó en hielo con agitación constante durante 10min y luego se centrifugó a 12000rpm/20 minutos/4°C. Se recuperó la fracción sobrenadante y se hizo una nueva precipitación con PEG6000 al 8,5%, se siguió el mismo procedimiento previo de incubación en hielo y centrifugación, pero en este paso se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en el mismo volumen inicial de PBS 1X. Esta última fracción volvió a precipitarse con PEG6000 al 12% siguiendo la misma incubación en hielo y centrifugación, este último pellet fue resuspendido en 400  $\mu$ L de PBS 1X, se realizó cuantificación midiendo la OD<sub>280nm</sub> y se almacenó a -20°C<sup>132,133</sup>.

El proceso de purificación de las IgY obtenidas fue monitoreado mediante SDS-PAGE. Con el fin de minimizar la presencia de lípidos, los mismos fueron removidos mediante

sucesivas precipitaciones con acetona hasta obtener una fracción de color blanco; en cada precipitación se agregaron 2 volúmenes de acetona a la fracción de proteínas totales, se hizo vórtex y se dejaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm/10 minutos y el pellet se resuspendió en PBS 1X, manteniendo el mismo volumen inicial de la alícuota<sup>134</sup>. Para la obtención de las muestras se tomaron alícuotas de cada una de las fracciones resultantes de los diferentes pasos de precipitación con PEG6000, las muestras correspondientes a pellets fueron resuspendidas en buffer de carga 1X (Tris 0,083M, SDS 1,74%, Glicerol 15%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5,5% y azul de bromofenol 0,002%) y aquellas correspondientes a sobrenadantes fueron llevadas a concentración 1X con buffer de carga 6X, estas fueron homogeneizadas por vórtex y se desnaturalizaron incubando a  $94^{\circ}\text{C}/15$  minutos<sup>125</sup>.

- **Determinación de la capacidad de reconocimiento del antígeno por parte de las IgY de huevo**

Se hizo un ELISA preliminar para encontrar las condiciones óptimas de reconocimiento del antígeno por parte de las IgY purificadas, para ello se evaluaron 3 concentraciones de antígeno (250ng/mL, 500ng/mL y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) preparado en buffer carbonatos 0,1M pH 9,6 y 3 diluciones de anticuerpo (1:500, 1:1000 y 1:2000); se escogió el huevo #30 para garantizar la presencia de IgY específicas por el antígeno, ya que se esperaba que para ese día hubiera un alto contenido de anticuerpos específicos<sup>135</sup>.

Se inmovilizó el antígeno en la placa de ELISA sembrando 100  $\mu\text{L}$  de antígeno en cada pozo e incubando durante  $37^{\circ}\text{C}/1$  hora, posteriormente se hizo un bloqueo con PBS-Leche 5% a  $37^{\circ}\text{C}/2$  horas. Después se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo primario y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}/2$  horas, seguido de esto, se agregó el anticuerpo secundario  $\alpha$ -chicken-HRP, preparado en PBS 1X en dilución 1:10000, y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}/2$  horas. Finalmente, se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de sustrato ABTS preparado en buffer citrato 100 mM pH 5,0 a cada pozo y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}/1$  hora para permitir el revelado. La reacción se detuvo agregando 20  $\mu\text{L}$  de SDS 1%. Entre cada paso se realizaron 3 lavados con PBS 1X, y la lectura de la placa se hizo midiendo la  $\text{OD}_{405\text{nm}}$ <sup>135</sup>.

Tras determinar las condiciones óptimas de reconocimiento con el huevo #30 se procedió a hacer un ELISA con las fracciones de IgY de todos los huevos obtenidos siguiendo la misma metodología ya descrita, esto con el fin de identificar aquellos con el contenido más alto de anticuerpos específicos; se seleccionaron los 6 huevos con mayor reconocimiento y se procedió a hacer la purificación de las IgY a partir de la totalidad del volumen de proteínas totales colectado previamente, y para ello se siguió el mismo protocolo de precipitaciones con PEG6000<sup>131,135</sup>.

- **Purificación de anticuerpos por afinidad a antígeno**

Se hizo un SDS-PAGE y una transferencia a membrana de nitrocelulosa de 0,5 mg de la proteína recombinante 6xHis-SUMO-*TcNdt2*, la membrana fue teñida con Rojo Ponceau S para poder identificar y cortar la región de la membrana en donde se encontraba la proteína de interés, y se hicieron lavados con TBST para retirar la tinción; después se incubó 10

minutos en una solución de glicina 100 mM, pH 2,5. Se lavó la membrana con TBST/10 minutos para luego hacer bloqueo con TBST Leche 5%/2 horas, y seguido se lavó con TBST para retirar la leche. La membrana se cortó en trozos, se sumergió en 750 µL de suero obtenido (en paralelo se siguió este proceso con 500 µL de IgY provenientes de huevo) y se incubó a temperatura ambiente/*overnight* con agitación constante. Se retiró el sobrenadante por pipeteo y se hicieron tres lavados con TBST/10 minutos. Para eluir las IgY se incubó la membrana con 100 µL de glicina 100 mM, pH 2,5 por 3 minutos con agitación constante, y seguido de esto se hizo un paso de neutralización con 15 µL de solución Tris-HCl 2M, pH 8,5; el proceso se repitió 3 veces hasta llegar a un volumen final de eluido de 300 µL<sup>131</sup>.

- **Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi***

El cultivo celular de epimastigotes de *T. cruzi* CLBrener se mantuvo a 26°C en medio Schneider (Sigma) pH 7,2 suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (v/v) en frascos T25 sin agitación, y realizando cambio de medio cada 3 días<sup>136</sup>.

- **Reconocimiento del candidato *TcNdt2* en extractos celulares de *T. cruzi***

Para la obtención de extractos proteicos celulares se recolectaron los parásitos del cultivo por centrifugación a 6500rpm/4°C/10 minutos, se hicieron 3 pasos de lavado con PBS 1X y centrifugación a 6500rpm/4°C/10 minutos, tras hacer el último se descartó el sobrenadante y los parásitos se resuspendieron en 300µL de buffer de lisis (PBS 0,1X, Tritón X-100 0,1% (v/v) y coctel de inhibidores de proteasas (1:400) empleando un homogeneizador. Los parásitos se incubaron a 4°C/40 minutos con agitación constante y posteriormente se centrifugó a 12000rpm/20 minutos; el sobrenadante y el pellet correspondieron a las fracciones de proteínas soluble e insoluble, respectivamente.

Los extractos fueron monitoreados por SDS-PAGE y se hizo la inmunodetección de la proteína endógena mediante *western blot*. Como anticuerpo primario se emplearon IgY purificadas por afinidad a antígeno, y se estandarizaron las diluciones óptimas de reconocimiento para estas; como anticuerpo secundario se empleó el  $\alpha$ -*chicken* acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:10000.

- **Determinación de la localización subcelular del candidato *TcNdt2* en *T. cruzi***

Se recolectaron parásitos provenientes de 1 mL de cultivo fresco centrifugando a 5000rpm/5 minutos/4°C, se lavaron 2 veces con PBS 1X, y se incubaron en 300 µL de PBS 1X/Glucosa 1%/MitoTracker™ 1µM a 25°C/40 minutos. Cerca de 1x10<sup>5</sup> parásitos fueron aplicados sobre láminas con poli-L-lisina, y el montaje se dejó secar a temperatura ambiente; seguido se hizo un paso de fijación con paraformaldehído (PFA) 4% (v/v) en PBS 1X a temperatura ambiente/10 minutos. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se bloqueó con PBS 1X/BSA 3%/Tritón X-100 0,5% por 1 hora/37°C. La solución de bloqueo se retiró lavando 3 veces con PBS 1X y se procedió a la incubación con diferentes anticuerpos primarios preparados en PBS 1X : IgG  $\alpha$ -*Tubulin* (1:1000), IgY  $\alpha$ -6xHis-SUMO-*TcNdt2* purificados provenientes de suero (1:250) e IgY de suero no relacionado (SNR)

provenientes de la gallina control; se permitió la interacción de los anticuerpos *overnight*/4°C. El anticuerpo primario se retiró y se hicieron 3 lavados con PBS 1X; seguido se incubó en oscuridad por 1 hora/37°C con los anticuerpos secundarios  $\alpha$ -mouse-ALEXA488 o  $\alpha$ -chicken-ALEXA488 (según correspondiera) preparados en PBS 1X, y diluidos 1:1000. Se hicieron 3 lavados con solución de bloqueo y se hizo la marcación del DNA incubando en oscuridad por 5 minutos a temperatura ambiente con 25  $\mu$ L DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (1  $\mu$ g/mL); el DAPI se removió lavando 2 veces con PBS 1X y 1 vez con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Por último, a los pozos se les aplicó 5  $\mu$ L de Fluoromount-G™, y se puso cubreobjetos sobre el montaje; la laminilla se fijó aplicando una pequeña cantidad de esmalte transparente en los bordes.

Para el caso de la microscopía de fluorescencia, la inmunofluorescencia fue observada y registrada empleando microscopio EVOS M5000 (Thermo), y en el caso de la microscopía confocal, se contrató el servicio del centro MicroCore de la Universidad de los Andes, donde se empleó microscopio confocal.

### 5.3 Expresión de la RVG en el sistema heterólogo eucariota *S. cerevisiae*

Para cumplir con el objetivo adicional propuesto de evaluar a *S. cerevisiae* como un sistema alternativo para la expresión del ED de la RVG, se desarrolló la siguiente metodología; el plásmido pYES2-RVG se hizo siguiendo la misma estrategia de subclonación mencionada para los pYES2-*TcNdt1* y *TcNdt2*.

- **Clonación del ED de la RVG en el vector pGEM-T-Easy**

La secuencia codificante para el ED (132pb) de la RVG fue amplificada a partir del vector pET30-RVG (suministrado por la empresa Vecol) mediante PCR con Taq polimerasa en termociclador Veriti Applied Biosystems y usando el Set No. 8 de *primers* de la **Tabla 1**. Las reacciones se hicieron siguiendo los mismos parámetros de volumen y concentración de los reactivos previamente descritas y se empleó 1,0  $\mu$ L de DNA plasmídico como plantilla<sup>137</sup>. Para la amplificación se hizo un paso inicial de desnaturalización a 94°C/10 minutos seguido de 25 ciclos de amplificación con pasos de desnaturalización 94°C/30 segundos, *annealing* 50°C/1 minutos y extensión 72°C/1,5 minutos; se programó un último ciclo con pasos de extensión de 72°C/10 minutos y *hold* a 4°C. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa siguiendo los parámetros previamente descritos.

Tras la obtención del fragmento de interés amplificado, el producto fue purificado de banda, y este se clonó en el vector de mantenimiento pGEM-T-Easy/TA siguiendo las indicaciones del ligación ya descritas para este sistema (4,0  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 3,0  $\mu$ L de producto de PCR, 1,0  $\mu$ L del vector, 1,0  $\mu$ L de buffer 10X de ligasa T4 y 1,0  $\mu$ L de ligasa T4)<sup>118</sup>. La reacción se incubó a 16°C/3 horas, se hizo un paso de inactivación de la enzima T4 a 65°C/20 minutos, y posteriormente se dejó la reacción a 4°C/*overnight*<sup>128</sup>. Células *E. coli* TOP10 fueron transformadas por choque térmico con este producto de ligación, y tras rastrear las

transformantes obtenidas, se dejó inóculo líquido de aquellas positivas y se hizo extracción de plásmido por lisis alcalina; se hizo PCR de plásmido para confirmar la presencia de la secuencia de interés en el vector.

- **Liberación del inserto RVG y linealización de pYES2 mediante digestión enzimática con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI**

Se hizo una doble digestión enzimática con las enzimas HindIII y EcoRI de los plásmidos pGEM-T-RVG y pYES2 (vacío), con el fin de liberar el inserto de la RVG y de generar extremos cohesivos que permitieran la correcta ligación en el vector de expresión de *S. cerevisiae*; pYES2 (vacío) y pGEM-T-RVG fueron digeridos inicialmente con la enzima HindIII siguiendo las especificaciones del manual para doble digestión (1,0 µL de enzima (10U/µL), 1,0 µL de Buffer R 10X (Tris-HCl 100mM pH 8,5), MgCl<sub>2</sub> 100mM, KCl 1M y BSA 1mg/mL, plásmido, y se llevó a volumen final de 10 µL con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>), la reacción se incubó a 37°C/*overnight*. Al siguiente día se suplementó la reacción con 1,0 µL de Buffer R 10X y se le agregaron 2,0 µL de la enzima EcoRI (10U/µL), incubando a 37°C/*overnight*. La doble digestión se monitoreó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,0% para comprobar la obtención de los productos esperados, se procedió a purificar de banda al fragmento del ED de la RVG, y a inactivar las enzimas en la reacción del vector pYES2 a 80°C/20 minutos.

- **Clonación del ED de la RVG en el vector de expresión pYES2**

Los fragmentos obtenidos fueron usados para la ligación del ED de la RVG en el vector pYES2 (4,0 µL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>; 1,0 µL de buffer de ligasa T4 10X; 3,0 µL de inserto, 1,0 µL de vector y 1,0 µL de T4 ligasa (4,0U)), la reacción se incubó a 16°C/3 horas, se hizo un paso de inactivación de la enzima T4 a 65°C/20 minutos, y posteriormente se dejó la reacción a 4°C/*overnight*. Con el producto de ligación se transformaron células *E. coli* TOP10, se rastrearon las colonias por PCR, y de aquellas positivas se hizo extracción de plásmido por lisis alcalina. Se hizo PCR de plásmido para corroborar la presencia del inserto.

- **Corroboración de la identidad del plásmido pYES2-RVG mediante digestión enzimática con las enzimas BamHI y HindIII**

Con el fin de corroborar la identidad del plásmido recombinante pYES2-RVG, se realizó una doble digestión enzimática con las enzimas BamHI y HindIII<sup>138,139</sup> (1,0 µL de enzima BamHI (10U/µL), 1,0 µL de Buffer BamHI 10X (100mM Tris-HCl pH 8,0, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 0,02% Tritón X-100, 0,1 mg/mL BSA), 2,0 µL de plásmido y 6,0 µL H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>), la reacción se incubó a 37°C/*overnight*; al siguiente día se suplementó con 1,0 µL de Buffer BamHI 10X y se agregaron 2,0 µL de la enzima HindIII (10U/µL), la reacción se dejó incubando 37°C/*overnight*. Se hizo electroforesis del producto de la digestión en gel de agarosa 1,0% en TBE 0,5X (90V/75 minutos) y se visualizó con bromuro de etidio<sup>116</sup>.

- **Obtención de células de *S. cerevisiae* INVSc1 transfectantes**

Siguiendo la misma metodología empleada para la obtención de transfectantes para los ensayos de complementación, se produjeron células competentes de *S. cerevisiae* INVSc1, siguiendo el método de LiAc/ssDNA/PEG3350 y choque térmico a 42°C/7 minutos; dos líneas transfectantes se produjeron usando 1,0 µg de los plásmidos pYES2-RVG y pYES2-vacío. Las células fueron plateadas en medio selectivo SC(-U) y se dejaron en crecimiento a 30°C por dos días hasta tener colonias de al menos 1,0 mm de diámetro; las células transfectantes se evaluaron por PCR de colonia, se seleccionaron aquellas positivas, y se hicieron criopreservados en glicerol 15% (v/v) almacenados a -80°C

- **Expresión del ED de la RVG recombinante en *S. cerevisiae* e inmunodetección**

Se inocularon células de *S. cerevisiae* INVSc1 transfectadas con los vectores pYES2-RVG y pYES2-vacío en medio líquido SC(-U) y se dejaron creciendo a 30°C/overnight con agitación constante. Al día siguiente se llevaron a una OD<sub>600nm</sub> de 0,4 y se hizo cambio a medio de inducción SC(-U) con rafinosa 1% y galactosa 2%; las células se incubaron a 30°C en agitación constante para permitir la expresión de la proteína. Se colectaron muestras de células en los tiempos de 0 horas, 2 horas, 4 horas, 6 horas y *overnight* de inducción, las células se centrifugaron a 3000g/5 minutos/4°C y los pellets fueron almacenados a -20°C, hasta ser procesados. Para la obtención de extractos de proteína, los pellets celulares se incubaron en LiAc 1,0 M/5 minutos/4°C, se centrifugó y retiró el sobrenadante, y luego se trataron con NaOH 0,4 M/5 minutos/4°C<sup>140</sup>; tras estos lavados se resuspendieron en buffer de lisis de levaduras (fosfato de sodio 50mM pH 7,4, glicerol 5%, EDTA 1% y coctel inhibidor de proteasas 1:200) y se les hizo lisis por sonicación a 100% de amplitud, 30 segundos/pulso y 30 segundos/reposo. Las fracciones soluble e insoluble se separaron por centrifugación a 12000rpm/20 minutos, se les agregó buffer de carga de proteína 6X y 1X, respectivamente, y se desnaturalizaron a 94°C/15 minutos.

El análisis de los extractos proteicos se hizo mediante SDS-PAGE discontinuo, y la inmunodetección de la RVG recombinante se hizo mediante *western blot* siguiendo los parámetros descritos previamente; como anticuerpo primario se emplearon IgY α-RVG (dilución 1:3500) producidos en el LIBBIQ a partir de inoculación con RVG nativa (proporcionada por Vecol), y como anticuerpo secundario se usó α-chicken acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:10000

## 6. Resultados y discusión

Las dinámicas de síntesis de moléculas de importancia biológica son indispensables para la supervivencia celular, al igual que los procesos de captación y movilización a nivel de membranas citoplasmáticas y de compartimentos internos; estos últimos son adelantados por proteínas transportadoras, y para efectos de este trabajo, se resalta el papel de algunos miembros de la MCF, encargados de la movilización del NAD<sup>+</sup> en organismos eucariotas, llevando el dinucleótido hacia organelos como mitocondrias, peroxisomas (glicosomas para trypanosomátidos) y cloroplastos<sup>141</sup>.

En nuestro grupo de investigación se identificó que la síntesis del NAD<sup>+</sup> en *T. cruzi* ocurre en el citosol, catalizada por la única NMNAT del parásito<sup>80,136</sup>, y ello llevó a generar la hipótesis de que un eficiente sistema de distribución del dinucleótido existe en el parásito; por ende, en este trabajo se optó por estudiar a los candidatos a transportador del dinucleótido de *T. cruzi* TcNdt1, TcNdt2 y TcNdt3, identificados en un trabajo desarrollado anteriormente<sup>142</sup>. A continuación, se presenta el primer apartado correspondiente a la caracterización *in silico* de los 3 candidatos.

### Aproximación *in silico*

#### 6.1 Los candidatos TcNdt1, TcNdt2 y TcNdt3 presentan características de la MCF en su estructura primaria

En un trabajo previo adelantado en nuestro grupo se identificaron las secuencias correspondientes a los candidatos a transportador de NAD<sup>+</sup> TcNdt1, TcNdt2 y TcNdt3, a partir de una secuencia consenso que se generó empleando como plantilla a las secuencias de aminoácidos de los transportadores de NAD<sup>+</sup> AtNdt2 y ScNdt1<sup>142</sup>; haciendo uso de la herramienta BLAST de la base de datos TriTrypDB se hizo una búsqueda en los genomas de referencia *Trypanosoma cruzi* CLBrener Esmeraldo-like, *Trypanosoma cruzi* CLBrener Non-Esmeraldo-like, *Trypanosoma cruzi* Dm28c, *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/1, *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/1-2012, *Trypanosoma cruzi* cruzi strain Dm28c, *Trypanosoma cruzi* marinkellei strain B7 y *Trypanosoma cruzi* strain CLBrener. De las secuencias obtenidas se seleccionaron los candidatos teniendo en cuenta los porcentajes de cobertura e identidad (superiores a 80 y 25%, respectivamente) y el valor-e (inferior a  $1 \times 10^{-3}$ )<sup>143</sup> (Tabla 3).

Los dos servidores empleados en la predicción de dominios de proteína ubicaron a los candidatos como miembros de la MCF (**Tabla 3**). Los candidatos *TcNdt1* y *TcNdt2* presentan características típicas de la familia, como lo son una secuencia de cerca de 300 residuos, un peso aproximado de 35 kDa y 3 repeticiones del dominio transmembranal. Por su parte, en el candidato *TcNdt3* se observa lo que parece ser una duplicación en la longitud de la secuencia de DNA, en la cantidad de aminoácidos y en el número de repeticiones del dominio transmembranal.

Continuando con la caracterización *in silico* de los candidatos, se hizo un alineamiento múltiple de secuencias junto con las de los transportadores de NAD<sup>+</sup> SLC25A51, SLC25A17, *AfNdt1*, *AfNdt2*, PXN, *ScNdt1*, *ScNdt2*, *AfNdt1* y *LbNdt1*. En el alineamiento se observa la presencia de los motivos característicos de proteínas de la MCF (m1, m2 y m3) en los candidatos a transportador de NAD<sup>+</sup> de *T. cruzi*, al igual que los residuos implicados en la interacción con el ligando (**Figura 8**).

**Tabla 3.** Características generales de los candidatos a transportador de NAD<sup>+</sup> *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3*, y predicción de dominios de proteína.

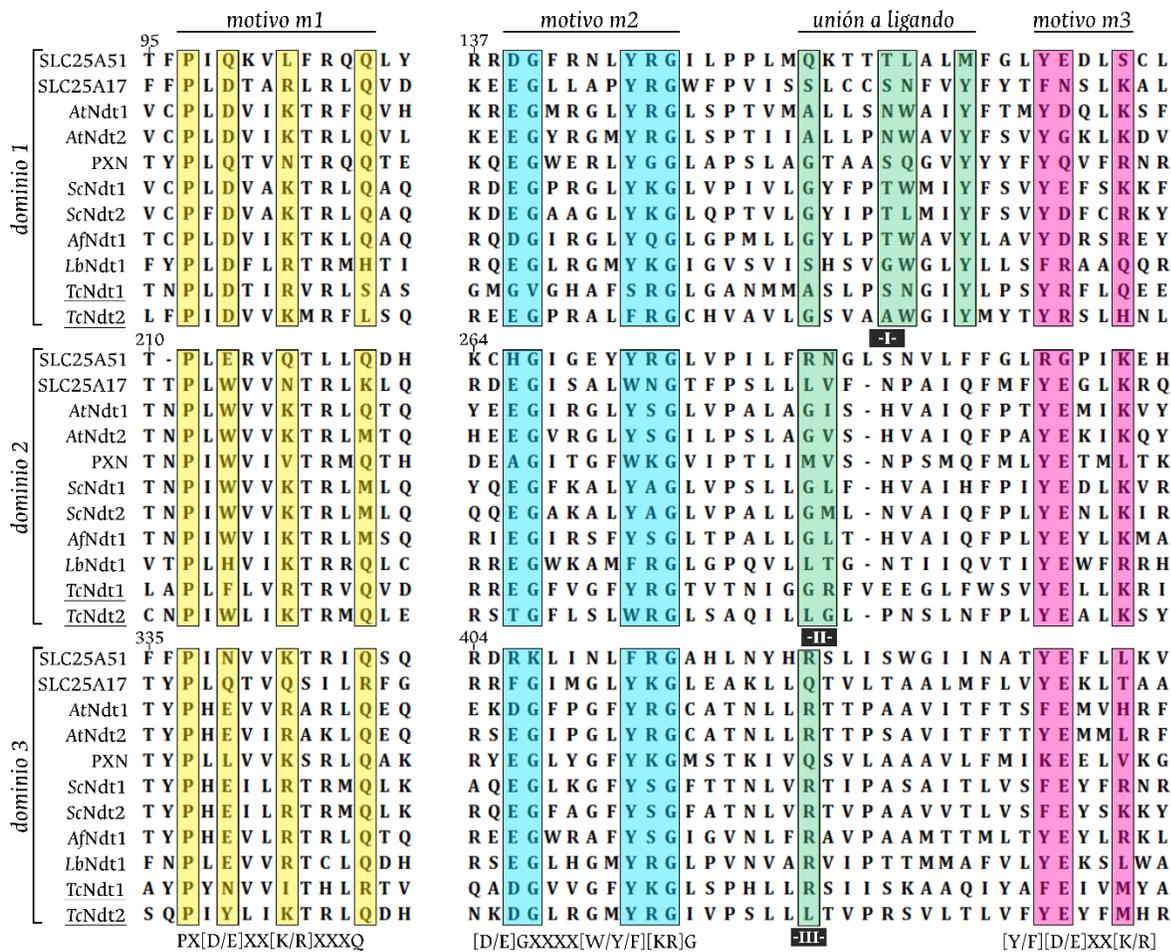
		<b>TcNdt1</b>	<b>TcNdt2</b>	<b>TcNdt3</b>	
<b>Característica</b>	<b>Código de acceso/ID</b>	ADWP02012505.1 EKG06478.1	ADWP02013987.1 EKG04746.1	ADWP02017444.1 EKG01520.1	
	<b>% de cobertura</b>	91	95	91	
	<b>% de identidad</b>	29	37	33	
	<b>Valor-e</b>	1x10 <sup>-24</sup>	4x10 <sup>-48</sup>	2x10 <sup>-12</sup>	
	<b>Tamaño del gen (pb)</b>	972	954	2121	
	<b>Aminoácidos (aa)</b>	324	318	707	
	<b>Peso molecular (kDa)</b>	35,64	34,98	77,78	
<b>Predicción de dominios</b>	<b>Inter Pro</b>	<b>Familia (ID)</b>	Mitochondrial carrier (IPR002067)	Mitochondrial carrier (IPR002067)	Mitochondrial carrier (IPR002067)
		<b>Repeticiones</b>	3	3	6
	<b>EMBL-EBI</b>	<b>Familia (Accesión)</b>	Mitochondrial carrier (PF00153.26)	Mitochondrial carrier (PF00153.26)	Mitochondrial carrier (PF00153.26)
		<b>Repeticiones</b>	3	3	6

Los residuos característicos de los motivos no se encuentran completamente conservados, y se presentan variaciones en que incluso aparecen residuos de distinta naturaleza (m1 en dominios 1 y 2), lo cual podría atribuirse a cambios debidos a divergencia evolutiva entre los grupos representados (plantas, hongos, mamíferos y protozoarios); aunque no se observa un patrón claro en este sentido, todas las secuencias, a excepción de los candidatos *TcNdt1* y *TcNdt2*, ya han sido validadas experimentalmente.

De manera similar, los residuos cargados de los motivos m1 y m3, cuya interacción se ha reportado estabiliza los estados C y M, respectivamente, no son conservados en todos los dominios de *TcNdt1* y *TcNdt2*, afectando la formación de los 3 puentes salinos descritos para otros transportadores de nucleótidos<sup>32</sup>, lo cual se observa en otros transportadores

de NAD<sup>+</sup> ya caracterizados<sup>33,57</sup>, por lo que no serían un factor indispensable para poder llevar a cabo el transporte de este dinucleótido.

En cuanto a los residuos de interacción con el ligando, en el sitio I se evidencia que el residuo más conservado es tirosina, pues está presente en casi todas las secuencias, con excepción de SLC25A51, donde lo sustituye metionina. En el sitio II, la presencia del motivo G[IVLM] es importante para la unión a nucleótidos de adenina (allí parece se estabiliza la purina por interacciones hidrofóbicas<sup>42</sup>), no obstante, en el candidato *TcNdt2* la glicina es sustituida por otro residuo hidrofóbico, similar a lo observado en los transportadores PXN y SLC25A17 caracterizados experimentalmente<sup>33,50</sup>. En SLC25A51 y *TcNdt1* el motivo G[IVLM] muestra una modificación importante ([RN] y [GR], respectivamente), pero es de resaltar que se encuentran residuos hidrofóbicos flanqueando a derecha e izquierda, que podrían estabilizar la estructura.



**Figura 8.** Alineamiento múltiple de secuencias de transportadores de NAD<sup>+</sup> y de los candidatos *TcNdt1* y *TcNdt2* (subrayados). Residuos conservados de los motivos m1 (amarillo), m2 (azul) y m3 (magenta); secuencias motivo mostradas en la parte inferior. Residuos de los sitios de unión a ligando I, II y III en verde. Posiciones en el alineamiento señaladas con números en la parte superior al inicio de cada segmento. Alineamiento con algoritmo MUSCLE y visualizado en MEGA-X 10.1.7; detalles agregados manualmente.

Por último, en el sitio III la presencia de un residuo básico es importante para la estabilización de grupos fosfato del ligando, lo cual no se conserva en *TcNdt2* (que presenta una leucina), al igual que en PXN y SLC25A17 (transportadores que poseen un residuo de glutamina en esta posición), sugiriendo que esta característica no es indispensable para el proceso de transporte de NAD<sup>+</sup>. Para ahondar en este aspecto, se hizo un análisis de las interacciones que tendría el NAD<sup>+</sup> con los residuos de estas posiciones mediante *docking* molecular, estos resultados se muestran más adelante en el análisis de la estructura terciaria.

Es importante mencionar que en un primer alineamiento se incluyeron los 3 candidatos de *T. cruzi*, sin embargo, la presencia de la secuencia *TcNdt3* causa que las regiones conservadas no se alineen correctamente y no permite la visualización de los motivos. Adicionalmente, se identificó que este candidato presenta una inserción de cerca de 100 residuos que interrumpe la hélice H6, lo que comprometería su actividad; esto, sumado a su inusual tamaño, llevó a excluir a *TcNdt3* de los alineamientos múltiples, pero no de los demás análisis.

## 6.2 Se predice una localización mitocondrial o glicosomal para los candidatos *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3*

Los servidores empleados en la predicción de la localización subcelular de las proteínas mostraron de manera consistente una distribución bien sea en mitocondria o en glicosomas (**Tabla 4**) para los candidatos, con excepción de MultiLoc2, que arrojó ubicaciones en cloroplasto y núcleo para los candidatos *TcNdt1* y *TcNdt2*, respectivamente; una ubicación nuclear es descartada puesto que hasta el momento no se han encontrado proteínas de la MCF que se localicen en este organelo, mientras que una predicción de localización en cloroplasto daría cuenta de la homología previamente reportada entre proteínas de la maquinaria celular de plantas y los trypanosomátidos<sup>144</sup>.

**Tabla 4.** Predicción de la localización subcelular de los candidatos *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3*.

	<i>TcNdt1</i>	<i>TcNdt2</i>	<i>TcNdt3</i>	<i>TbMCP6</i>
<b>Euk-mPLOC 2.0</b>	Glicosoma	Glicosoma	Glicosoma	Glicosoma
<b>iLoc-Animal</b>	Mitocondria	Mitocondria	Mitocondria	Mitocondria
<b>MultiLoc2</b>	Cloroplasto*	Nuclear	Glicosoma	Glicosoma
<b>DeepLoc-1.0</b>	Mitocondria	Mitocondria	Mitocondria	Mitocondria

Es interesante el hecho que diferentes servidores predicen una localización redundante para los candidatos *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3*, bien sea en mitocondria o en glicosomas, esto podría atribuirse a la existencia de un sistema alternante de transportadores de NAD<sup>+</sup> asociado al metabolismo del dinucleótido, a la disponibilidad de los ligandos, o al estadio

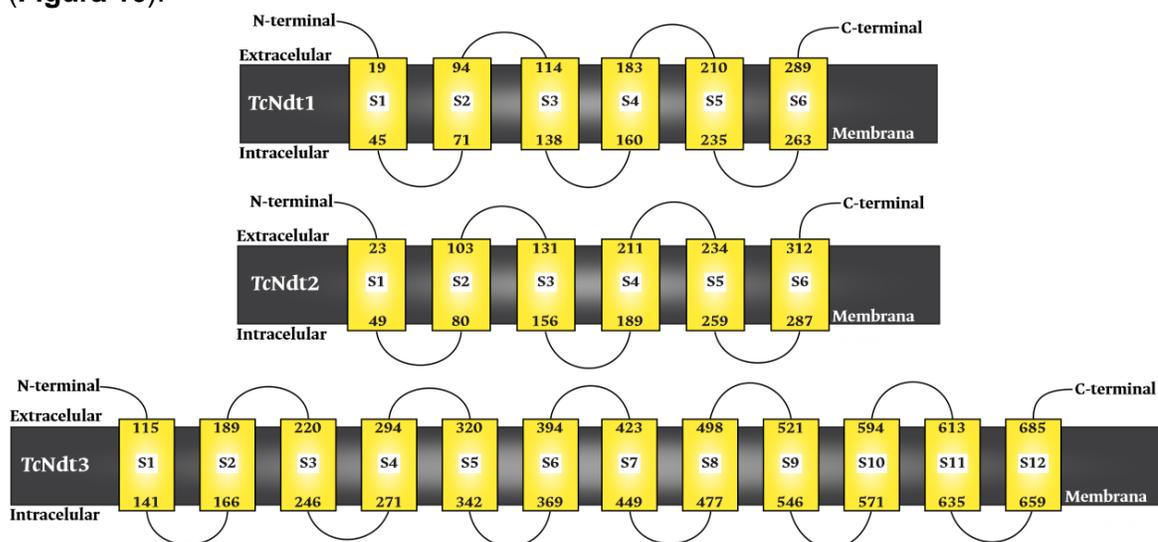


Con relación a los candidatos estudiados, *TcNdt1* presenta dos residuos básicos y el residuo [T/S], por lo que puede sugerirse una localización glicosomal, al igual que lo observado en la proteína *TcMCP6*<sup>74</sup>, con la cual comparte estas características, mientras que *TcNdt2* carece de esta señal. De esta forma puede sugerirse que *TcNdt1* sería el encargado de suplir de NAD<sup>+</sup> a los glicosomas y *TcNdt2* a la mitocondria de *T. cruzi*.

Si bien esta hipótesis se hace a la luz de los elementos contenidos en esta región de las proteínas, es importante mencionar que algunos autores han concluido que la mPTS no es suficiente para explicar la localización peroxisomal de proteínas de la MCF, y que elementos contenidos entre las hélices H1 y H2, al igual que la hidrofobicidad de estas proteínas, también serían determinantes, aunque no a nivel de secuencia primaria, sino a nivel de conformación tridimensional<sup>145,146</sup>; a pesar de que esto ya se sabe, hasta el momento no se dilucidado a fondo el fenómeno.

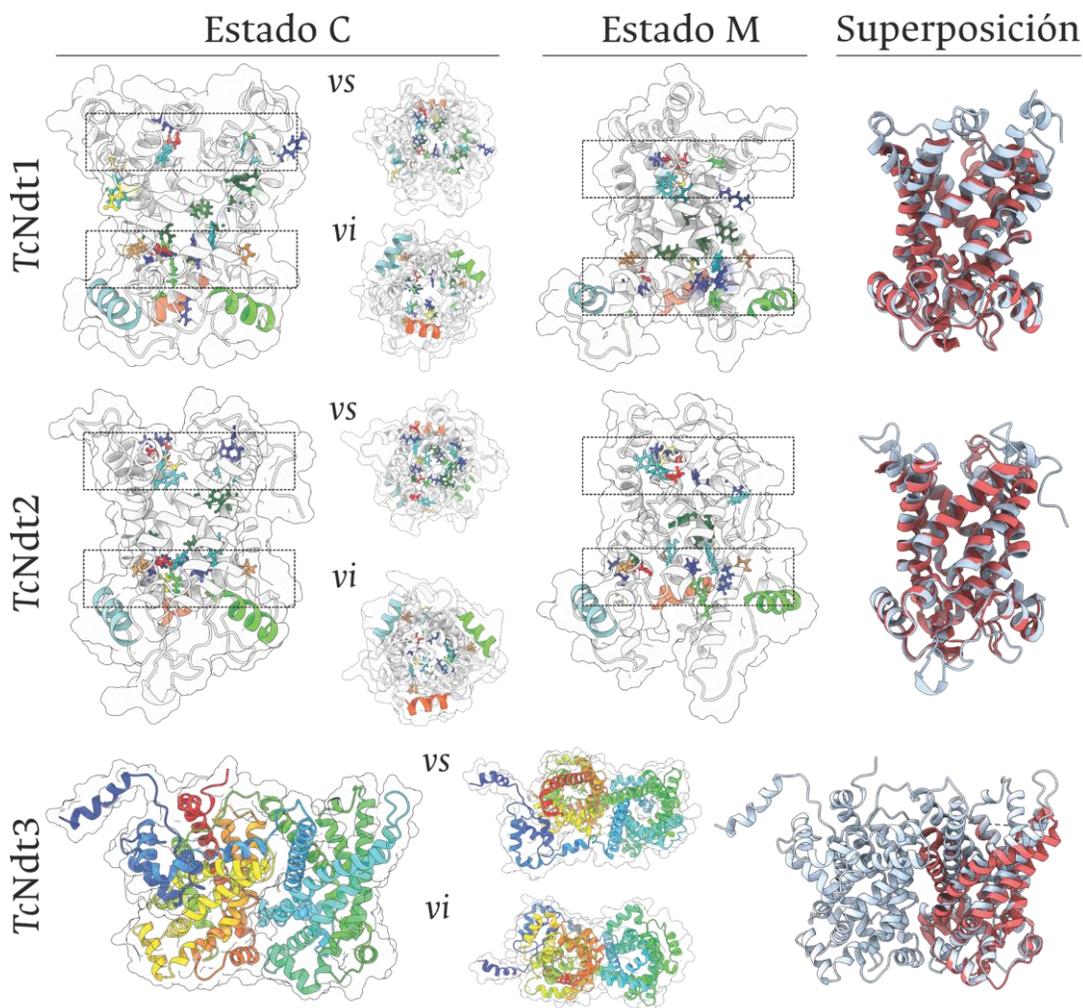
### 6.3 *TcNdt1* y *TcNdt2* presentan estructuras secundaria y terciaria propias de proteínas de la MCF

El servidor PHYRE<sup>2</sup> empleado para la predicción de la estructura secundaria de los candidatos *TcNdt1* y *TcNdt2* arroja un modelo con una topología de 6  $\alpha$ -hélice transmembrana, y los extremos N y C-terminal orientados hacia la región extracelular (intermembranal para proteínas mitocondriales), característica de transportadores de la MCF<sup>32</sup>. Para *TcNdt3* el servidor predice una topología de 12  $\alpha$ -hélice transmembrana, consistente con la duplicación de los elementos estructurales previamente mencionada (Figura 10).



**Figura 10.** Predicción de la estructura secundaria y topología de los candidatos a transportador de NAD<sup>+</sup> *TcNdt1* (arriba), *TcNdt2* (centro) y *TcNdt3* (abajo). Membrana representada por rectángulo gris;  $\alpha$ -hélice transmembrana representadas por rectángulos amarillos y numeradas de S1 a S6, o S1 a S12, según corresponda. Residuos de inicio y fin de  $\alpha$ -hélice indicados en números. Modelos obtenidos con el servidor PHYRE<sup>2</sup> y modificados para mejor visualización.

Continuando con la caracterización bioinformática, las secuencias candidato fueron sometidas al servidor ROBETTA y mediante el algoritmo de CM se obtuvieron los modelos en estados C y M de *TcNdt1* y *TcNdt2*; para *TcNdt3* no fue posible obtener unos modelos consistentes mediante esta metodología, por lo que se empleó el algoritmo de *RoseTTA fold* que generó un único modelo en estado C (**Figura 11**). La validación de las estructuras predichas se llevó a cabo mediante *plot* de Ramachandran y superposición con la estructura cristalográfica del transportador AAC de *S. cerevisiae* (**Tabla 5**).



**Figura 11.** Modelos de estructura terciaria de *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3*. Vista superior (vs) y vista inferior (vi) en estado C. ***TcNdt1*** y ***TcNdt2***:  $\alpha$ -hélices h1/2, h3/4 y h5/6 en cintas color azul, verde y naranja, respectivamente; residuos de las redes citoplasmática y de la matriz indicados en las cajas punteadas y representados en barras y esferas (residuos básicos (azul), ácidos (rojo), aromáticos (cian), polares (verde claro) e hidrofóbicos (amarillo)); sitios I, II y III en barras y esferas verde oscuro. ***TcNdt3***: modelo de cintas en patrón de arcoíris (N-terminal (azul) y C-terminal (rojo)). Superposición de los candidatos en estado C (azul claro) con el AAC (PDB 4C9G, rojo). Visualización en ChimeraX 1.2.5.

A nivel de estructura terciaria, en los modelos obtenidos para *TcNdt1* y *TcNdt2* se observan las características conservadas de proteínas de la MCF, tales como la forma de barril, el

canal central (en vista superior), la distribución espacial de los residuos que forman la red citoplasmática, la red de la matriz y el sitio de unión, al igual que las  $\alpha$ -hélice h1/2, h3/4 y h5/6. Es también de resaltar que los modelos en estado M generados mediante el algoritmo CM permiten una aproximación a los cambios conformacionales que se asemejan a los ya descritos en el transportador de ADP/ATP (AAC), y que sucederían durante el proceso de transporte del  $\text{NAD}^+$ , en el que se abre y cierra el canal alternadamente hacia los compartimentos comunicados por los transportadores<sup>32</sup>. En estos candidatos, la superposición realizada con el transportador AAC muestra también la alta similitud entre la estructura cristalográfica y las predicciones bioinformáticas<sup>36</sup>.

Para el candidato *TcNdt3* el algoritmo *RoseTTa fold* generó un modelo de estructura terciaria coherente, lo que respalda que este novedoso método es una valiosa herramienta al momento de estudiar proteínas difíciles de trabajar a nivel computacional y experimental<sup>104</sup>. La proteína muestra una conformación de dos barriles contiguos alineados que mantienen la forma general de proteínas de la MCF, lo cual se visualiza parcialmente en la superposición, sin embargo, en el modelo no fue posible identificar los residuos conservados que tridimensionalmente forman las redes y el sitio de unión; adicionalmente, teniendo en cuenta la proximidad que tienen los dos barriles, sería improbable que la proteína fuera activa, ya que habría un impedimento para que se dieran los cambios conformacionales requeridos para el proceso de transporte.

Las múltiples características atípicas encontradas a lo largo de los diferentes análisis bioinformáticos realizados en el candidato *TcNdt3*, indican que la proteína no sería un posible transportador de  $\text{NAD}^+$ , no obstante, en la familia de transportadores tipo ABC (*ATP-binding cassettes*) se ha identificado que la proteína MRP1/ABCC1 presenta una duplicación de los dominios de transporte, y que la misma media la resistencia a medicamentos antitumorales<sup>147</sup>; este antecedente lleva a que no se descarte que la secuencia de *T. cruzi* corresponda a una proteína funcional, pero que tenga un papel novedoso hasta el momento no reportado para proteínas pertenecientes a la MCF.

A nivel de validación de los modelos, los dos algoritmos fueron capaces de predecir una distribución coherente de los aminoácidos, lo que se refleja en los valores obtenidos en los parámetros del *plot* de Ramachandran, donde se espera que en la región favorecida se ubiquen alrededor del 98%, y que en las regiones permitida y no favorecida, se ubiquen los restantes<sup>148</sup>; lo mismo se cumple para el Z-score y el RMS-Z-score, que deben ser cercanos a 0 y 1,0, respectivamente. De igual manera, los valores calculados de RMSD en la superposición respaldan la semejanza estructural apreciada cualitativamente en la **Figura 11**.

Con el fin de ahondar en el rol funcional de los elementos estructurales identificados en los modelos de *TcNdt1* y *TcNdt2*, se analizó la formación de las redes de la matriz y del citoplasma que se constituye en los estados C y M, y también se llevó a cabo *docking* molecular empleando AutoDock Vina para predecir la unión del  $\text{NAD}^+$  al canal en el estado C (**Figura 12**). En el caso de la red de la matriz, para ambos candidatos se ve que existe una interacción entre un residuo cargado negativamente de la H1 y uno cargado

positivamente de la H3; por su parte, la red citoplasmática se estabiliza por una interacción similar entre las H4 y H6 para *TcNdt1*, y entre H2 y H4 para *TcNdt2*.

**Tabla 5.** Parámetros de validación de las estructuras terciarias de *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3* predichas por ROBETTA.

Método de validación		<i>TcNdt1</i>	<i>TcNdt2</i>	<i>TcNdt3</i>
Ramachandran plot	Residuos en regiones favorecidas (%)	99,3	97,9	97,7
	Residuos en regiones permitidas (%)	0,7	1,7	1,6
	Residuos en regiones no permitidas (%)	0,0	0,4	0,7
	Z-score	0,11	0,15	0,18
	RMS-Z-score	1,4	1,36	1,44
Superposición	Residuos alineados	118	210	176
	RMSD (Å)	1,132	1,039	1,127

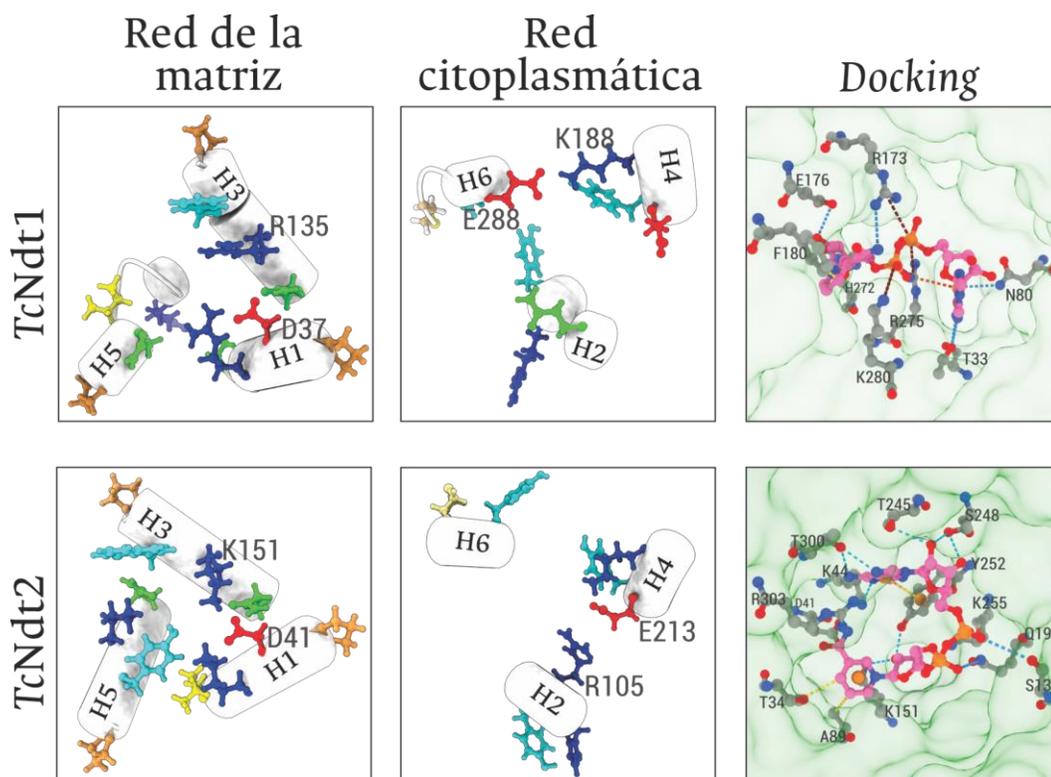
En la formación de las redes de la matriz y citoplasmática, a diferencia de los 3 puentes salinos descritos en la estructura cristalográfica del AAC, en *TcNdt1* y *TcNdt2* solo se estaría dando 1; si bien esta característica podría llevar a inferir que se encuentra comprometida la funcionalidad de las proteínas candidato, más bien se atribuye a una modificación presente en algunos transportadores de NAD<sup>+</sup>, ya que el análisis bioinformático de la estructura del SLC25A51 de *H. sapiens* mostró que solo se forma 1 puente salino entre las hélices H3 y H5 (estabilizando el estado C) y 1 entre las hélices H4 y H6 (estabilizando el estado M)<sup>141</sup>.

Los modelos de acople del NAD<sup>+</sup> en el sitio de unión permiten visualizar los complejos proteína-ligando que se forman en la parte más interna del canal, concretamente en la región intermedia entre los sitios de formación de las redes de la matriz y citoplasmática. La energía de unión encontrada fue de -9,1 kcal/mol y de -9,6 kcal/mol para *TcNdt1* y *TcNdt2*, respectivamente; estos valores son similares a los encontrados para el transportador de NAD<sup>+</sup> SLC25A51 de *H. sapiens* mediante *docking* (-9,9 kcal/mol), cuya actividad transportadora se corroboró experimentalmente<sup>141</sup>.

Si bien mediante alineamiento múltiple de secuencias se habían determinado los residuos de los sitios I, II y III que interactuarían con el NAD<sup>+</sup> para *TcNdt1* (aminoácidos 83,87,88,91, 172,173 y 275) y *TcNdt2* (aminoácidos 92,96,97,100,201,202 y 299), el *docking* muestra que sería necesario que participaran residuos ubicados en las 6 hélices transmembrana, lo cual podría deberse a que este ligando es uno de los más grandes en ser movilizados por proteínas de la MCF<sup>42</sup>; también cabe anotar que en el caso de *TcNdt1* solo los residuos

173 y 275 de los sitios de unión determinados previamente participan en la unión al  $\text{NAD}^+$ , mientras que en *TcNdt2* ninguno de ellos lo hace.

En *TcNdt1*, los 8 residuos encontrados en el *docking* estabilizarían al  $\text{NAD}^+$  mediante 1 interacción hidrofóbica, 7 puentes de hidrógeno, 1 interacción  $\pi$  y 4 puentes salinos, mientras que en *TcNdt2*, se encuentra que son 12 los residuos involucrados, y ellos formarían 2 interacciones hidrofóbicas, 12 puentes de hidrógeno y 2 interacciones  $\pi$  con el ligando. Teniendo en cuenta que la energía de unión encontrada en ambos candidatos es similar, podría decirse que en el caso de *TcNdt1* la formación de puentes salinos con el ligando compensa un menor número de interacciones, y de manera contraria, la ausencia de puentes salinos entre el  $\text{NAD}^+$  y *TcNdt2* se compensa con una mayor cantidad de puentes de hidrógeno. Estos resultados en conjunto indican que *TcNdt1* y *TcNdt2* se encuentran dotados de elementos estructurales adecuados para llevar a cabo la función de transporte del  $\text{NAD}^+$ , sin embargo, es necesario evaluar experimentalmente si los residuos encontrados en el *docking* son aquellos que estabilizan al ligando.



**Figura 12.** Predicción de interacciones implicadas en el mecanismo de transporte del  $\text{NAD}^+$  de *TcNdt1* y *TcNdt2*. Residuos de m1 y m3 de las hélices H1-H6 en barras y esferas, aminoácidos básicos (azul), ácidos (rojo), aromáticos (cian), polares (verde claro), hidrofóbicos (amarillo) y metionina (beige; residuos que interactúan etiquetados). Interacciones predichas mediante *docking* molecular entre el  $\text{NAD}^+$  (carbono en rosado) y residuos de las proteínas (carbono en gris); centro de anillos aromáticos representado con esfera naranja; superficie del canal de la proteína en verde claro; puentes de hidrógeno (azul), puentes salinos (rojo oscuro), interacciones hidrofóbicas (amarillo) e interacciones  $\pi$  (naranja). Visualización en ChimeraX 1.2.5.

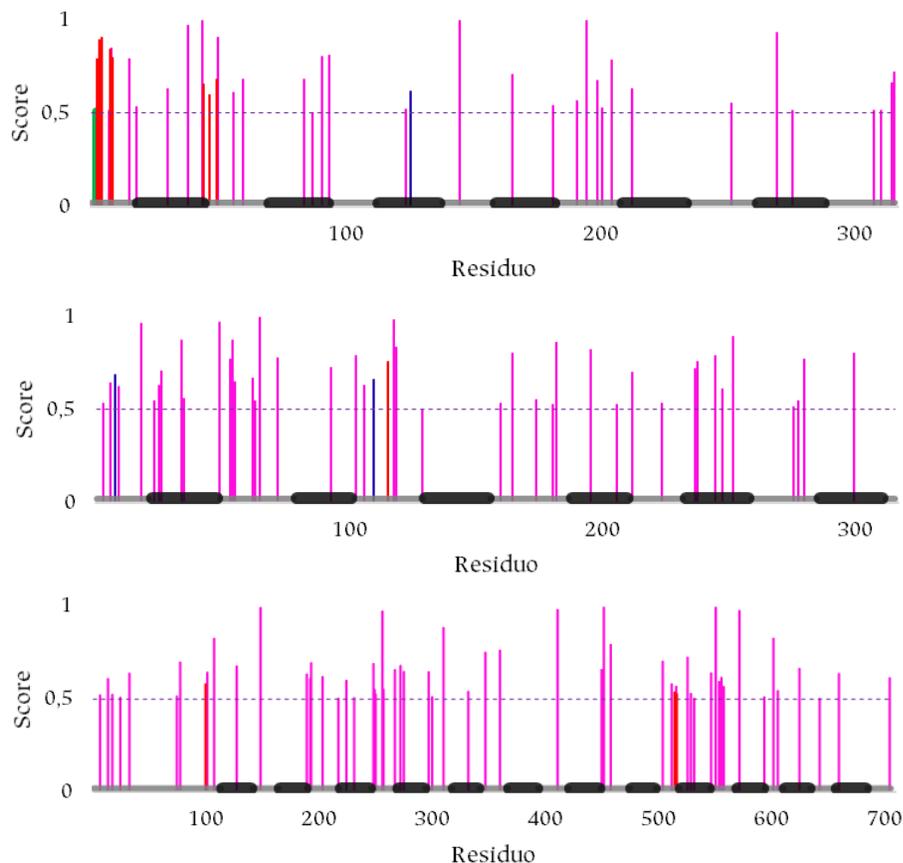
Por último, aprovechando los modelos generados, y la información arrojada por el *docking* molecular, se simularon los cambios conformacionales que se dan en *TcNdt1* y *TcNdt2* a medida que transitan entre los estados C y M; estos resultados se encuentran en el **Anexo: Modelación de dinámica molecular de *TcNdt1* y *TcNdt2***.

## 6.4 Las secuencias candidato *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3* presentan sitios blanco de posibles modificaciones postraduccionales

Para concluir la caracterización bioinformática de *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3*, las secuencias se sometieron a los servidores NetPhos 3.1, NetAcet 1.0, NetOGlyc 4.0 y NetNGlyc 1.0, los cuales llevaron a la identificación de posibles sitios blanco de fosforilación, acetilación, O-glicosilaciones y N-glicosilaciones, respectivamente (**Figura 13**). Los servidores asignan un *score* correspondiente a la probabilidad de presencia de la modificación en un residuo determinado, y así mismo establecen que un sitio con una probabilidad inferior a 0,5 debe descartarse por no superar el umbral mínimo, por lo que en los gráficos solo se incluyen aquellos residuos que cumplen este parámetro.

Es claro que la modificación probable más abundante es la fosforilación, esta se encuentra predicha a lo largo de las secuencias de los candidatos *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3*, aun así, es importante notar que aquellas localizadas sobre regiones transmembrana de las proteínas serían improbables, debido a que estas regiones estarían inmersas en la membrana interna mitocondrial, por lo que las quinastas que efectuarían el cambio tendrían un acceso limitado (esto aplica para las demás modificaciones). Hasta el momento en los transportadores AAC y PiC de la MCF se ha reportado esta modificación, y para el AAC se ha propuesto que permitiría una transición más rápida entre los estados C y M, haciendo el transporte más eficiente<sup>44</sup>. Teniendo en cuenta la gran cantidad de sitios predichos para los candidatos de *T. cruzi*, es factible que esta modificación suceda en ellos, y que también funcione como un modulador de la actividad.

En cuanto a la acetilación predicha para *TcNdt1*, se ha visto que en proteínas pertenecientes a la MCF esta modificación funciona como un interruptor de la actividad transportadora, tal como sucede en los transportadores SLC25A20 y SLC25A21 de *H. sapiens*, donde por medio de sirtuinas (deacetilasas) mitocondriales se inhibe o incrementa la actividad<sup>43</sup>. Este resultado es relevante teniendo en cuenta que cerca de una tercera parte de las proteínas mitocondriales se encuentran acetiladas, y las dinámicas de esta modificación se han visto asociadas a un correcto funcionamiento del metabolismo energético<sup>149</sup>. Por lo anterior, es de esperar que en *T. cruzi* esta modificación ocurra y que sea relevante, pues dos sirtuinas denominadas *TcSIR2RP1* y *TcSIR2RP3* han sido identificadas en *T. cruzi*, siendo proteínas de ubicación citosólica y mitocondrial, respectivamente<sup>150</sup>, por lo que el parásito cuenta con la maquinaria celular adecuada para deacetilar al candidato.



**Figura 13.** Modificaciones postraduccionales predichas para los candidatos *TcNdt1* (arriba), *TcNdt2* (centro) y *TcNdt3* (abajo); fosforilaciones, acetilaciones, O-glicosilaciones y N-glicosilaciones en rosa, verde, rojo y azul, respectivamente; umbral de *score* (según NetPhos 3.1, NetAcet 1.0, NetOGlyc 4.0 y NetNGlyc 1.0) en línea punteada; regiones loop y transmembrana de las proteínas en la parte inferior representadas en líneas gruesas gris y negra, respectivamente.

En los 3 candidatos de *T. cruzi* se predice la presencia de glicosilaciones, modificación que ha sido reportada en los transportadores ANT1 bovino y *LbNdt1* de la MCF, y, aunque el papel que juegan no ha sido determinado, es interesante que en ambos casos suceda sobre transportadores de nucleótidos, pues esta es la actividad propuesta de los candidatos de *T. cruzi*. Las glicosilaciones predichas en *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3* son de tipo N y O, sin embargo, la maquinaria requerida para las N-glicosilaciones es típicamente asociada al retículo endoplasmático y aparato de Golgi<sup>151</sup>, por lo que lo más seguro es que de darse una de estas modificaciones, se tratara de una O-glicosilación (también predicha en mayor cantidad).

Por último, a manera de conclusión parcial de este apartado, los resultados generados a partir de los análisis bioinformáticos realizados sobre los candidatos a transportador de NAD<sup>+</sup> de *T. cruzi*, muestran que *TcNdt1* y *TcNdt2* son secuencias promisorias a presentar la mencionada actividad, ya que tienen las características estructurales propias de la MCF, y los elementos requeridos para movilizar al dinucleótido, y, por ende, se considera pertinente su estudio a nivel experimental con el fin de corroborar su actividad. Por su

parte, TcNdt3 es una secuencia atípica dentro de las proteínas de esta familia de transportadores, y por esta misma razón se convierte en un elemento interesante a tener como objeto de estudio. Aunque en este trabajo no se abordará su evaluación funcional, no se descarta que en futuros proyectos esto sea realizado.

## Aproximación experimental

Tras establecer a nivel bioinformático que las secuencias TcNdt1 y TcNdt2 de *T. cruzi* presentan características estructurales que favorecen que tengan actividad de transportadores de NAD<sup>+</sup>, se procedió a su evaluación funcional. Teniendo como referencia los métodos empleados en la caracterización de los transportadores de NAD<sup>+</sup> de otros organismos<sup>46,51,58</sup>, para el estudio experimental de TcNdt1 y TcNdt2 se formuló una metodología integral orientada a comprobar que estas secuencias presentan la mencionada actividad. Inicialmente se hicieron ensayos de complementación en las cepas  $\Delta ndt1$  y  $\Delta ndt2$  de *S. cerevisiae*, donde TcNdt1 y TcNdt2 rescataron el crecimiento de las células mutantes transfectadas con vectores recombinantes producidos.

Si bien en un principio solo se había contemplado el uso de *S. cerevisiae* para corroborar el transporte, durante el desarrollo de este trabajo se dio la oportunidad de emplear el vector recombinante pET28-MISTIC, que agrega a modo de etiqueta a la proteína MISTIC, la cual actúa como una señal de localización hacia la membrana interna de *E. coli*<sup>72</sup>; con este novedoso sistema se han llevado a cabo ensayos de transporte con otros transportadores de nucleótidos<sup>73</sup>, y por lo mismo, se planteó establecer un sistema similar para evaluar posibles transportadores de NAD<sup>+</sup>. Partiendo del plásmido circular, se construyeron vectores de expresión recombinantes que contienen a TcNdt1 y TcNdt2, al igual que a las secuencias de los transportadores de NAD<sup>+</sup> AtNdt2, ScNdt1 y ScNdt2; se establecieron las condiciones óptimas para la expresión de estos 5 transportadores en el sistema MISTIC; y se realizaron ensayos piloto de transporte de NAD<sup>+</sup> empleando células vivas de *E. coli*.

Por último, se generó y caracterizó una herramienta inmunológica en modelo aviar, empleando una recombinante expresada en *E. coli* como antígeno, lo cual permitió determinar, mediante inmunofluorescencia, que la proteína TcNdt2 corresponde a un transportador de NAD<sup>+</sup> mitocondrial de *T. cruzi*. En este apartado se muestra detalladamente los resultados mencionados.

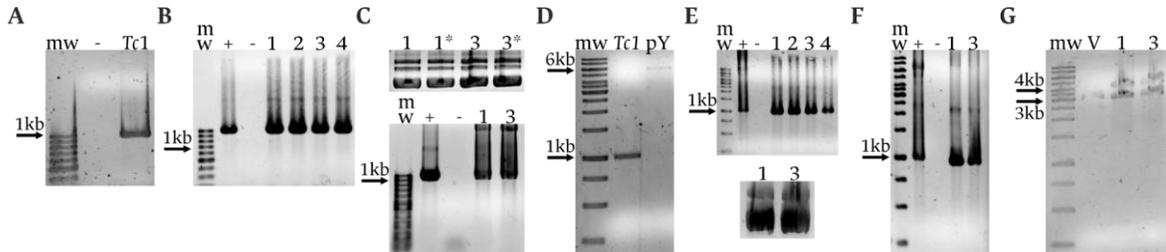
### 6.5 TcNdt1 y TcNdt2 son transportadores de NAD<sup>+</sup>: evaluación funcional mediante ensayos de complementación en mutantes de *S. cerevisiae*

Para la evaluación funcional de los candidatos TcNdt1 y TcNdt2 de *T. cruzi* se eligió el sistema eucariota *S. cerevisiae*, que ha sido empleado ampliamente en la caracterización de transportadores de NAD<sup>+</sup><sup>46,49,52,58</sup>. En esta aproximación, se llevan a cabo ensayos de complementación con los mutantes  $\Delta ndt1$  y  $\Delta ndt2$ , los cuales carecen de transportadores

funcionales del dinucleótido, y por lo tanto presentan un crecimiento rezagado en un medio sin una fuente de carbono fermentable. A las células mutantes se les reestablece la capacidad de movilizar el  $\text{NAD}^+$ , y por ende la capacidad de crecer en un medio no fermentable, al ser transfectadas con un plásmido de expresión (usualmente pYES2) que contiene la secuencia codificante de una proteína transportadora de este dinucleótido. Por ello como primera fase se adelantó la construcción de los vectores recombinantes requeridos.

### 6.5.1 Generación de los vectores recombinantes pYES2-*TcNdt1* y pYES2-*TcNdt2*

Teniendo en cuenta lo anterior, inicialmente se adelantó la construcción en paralelo de los plásmidos recombinantes pYES2-*TcNdt1* (**Figura 14**) y pYES2-*TcNdt2* (**Figura 15**), generando así los vectores de expresión de levaduras esenciales para la complementación; en ambos casos se siguió la estrategia de sub-clonación detallada a continuación. De manera general, se realizó la amplificación de *TcNdt1* y *TcNdt2* (**literal A**), y con el producto de PCR, se llevó a cabo la ligación en el vector T/A pGEM-T Easy; con el producto de ligación se transformaron células *E. coli* TOP10, y las transformantes se evaluaron por PCR de colonia (**literal B**). De las colonias positivas, se extrajeron los plásmidos pGEM-T-*TcNdt1* y pGEM-T-*TcNdt2*, y la presencia del inserto se evaluó por PCR (**literal C**).

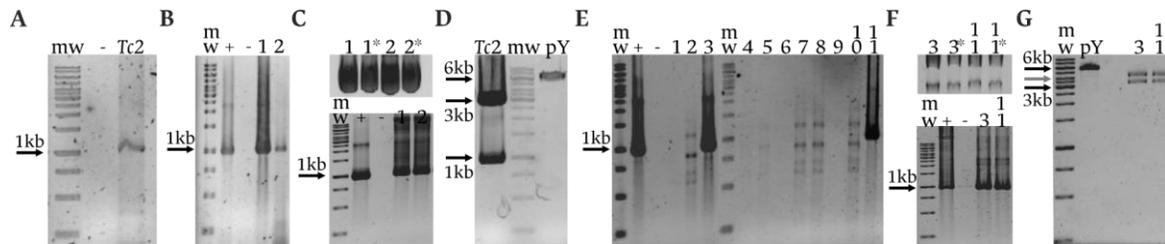


**Figura 14.** Generación del pYES2-*TcNdt1* mediante sub-clonación. **A**, amplificación de *TcNdt1* (972pb) por PCR. **B**, rastreo por PCR de colonias transformantes con el vector pGEM-T-*TcNdt1*. **C**, arriba, plásmidos pGEM-T-*TcNdt1* extraídos por lisis alcalina; abajo, evaluación de plásmidos por PCR. **D**, liberación del inserto *TcNdt1* y linealización del vector pYES2 vacío (pY, 5857pb) mediante restricción enzimática con BamHI y EcoRI. **E**, arriba, rastreo de transformantes mediante PCR de colonia, abajo, extracción de plásmido pYES2-*TcNdt1* mediante lisis alcalina. **F**, evaluación por PCR de pYES2-*TcNdt1*. **G**, verificación por digestión enzimática con EcoRV del pYES2-*TcNdt1* (1 y 3), pYES2-vacío (V). Electroforesis en gel de agarosa en TBE al 1,0% (90 mV/55 min); mw, marcador de peso molecular; \*, réplica de muestra; tinción con bromuro de etidio.

Con los vectores pGEM-T generados (plásmidos donantes), se procedió a la inserción de *TcNdt1* y *TcNdt2* en pYES2 (plásmido receptor), para ello, tanto los plásmidos recombinantes, como el pYES2 vacío, fueron sometidos a restricción enzimática con BamHI y EcoRI (**literal D**), con el fin de generar extremos cohesivos que permitan la ligación de los insertos con la direccionalidad requerida. Los insertos de interés fueron

purificados a partir de gel de agarosa, lo cual se observa para *TcNdt1* (**Figura 14D**) y para *TcNdt2* (**Figura 15D**, se muestra el producto de la digestión; banda superior corresponde al pGEM-T-vacío (3016pb)). Los productos purificados fueron ligados en el vector pYES2 linealizado, y con el producto de ligación se transformaron *E. coli* TOP10; las transformantes obtenidas se evaluaron por PCR, de aquellas colonias positivas se extrajeron mediante lisis alcalina los plásmidos pYES2-*TcNdt1* y pYES2-*TcNdt2*, y estos productos se validaron por PCR (**literal E y F**).

Por último, estos plásmidos fueron sometidos a digestión enzimática con *EcoRV* (**Figura 14G**) y *NheI* (**Figura 15G**); para los dos clones obtenidos del pYES2-*TcNdt1* (1 y 3), tras la restricción se obtiene el perfil esperado de 2 bandas de 3943 y 2864pb, mientras que para el vector vacío se observa aparentemente una sola banda, que en realidad corresponde a dos productos de 2993 y 2864pb. De manera similar, para los dos clones extraídos de pYES2 (3 y 11) el procesamiento arroja dos productos de 3841 y 2948pb, que son los esperados, mientras que el mismo tratamiento para el pYES2 vacío arroja una única banda de 5857pb. Estos resultados muestran la generación de los plásmidos necesarios para realizar la evaluación de la actividad transportadora de NAD<sup>+</sup> mediante ensayos de complementación.



**Figura 15.** Generación del pYES2-*TcNdt2* mediante sub-clonación. **A**, amplificación de *TcNdt2* (954pb) por PCR. **B**, rastreo por PCR de colonias transformantes con el vector pGEM-T-*TcNdt2*. **C**, arriba, plásmidos pGEM-T-*TcNdt2* extraídos por lisis alcalina; abajo, evaluación de plásmidos por PCR. **D**, liberación del inserto *TcNdt2* y linealización del vector pYES2 vacío (pY, 5857pb) mediante restricción enzimática con *Bam*HI y *Eco*RI. **E**, evaluación de transformantes con pYES2-*TcNdt2* mediante PCR. **F**, arriba, extracción de pYES2-*TcNdt2* mediante lisis alcalina; abajo, validación de plásmidos por PCR. **G**, digestión enzimática de pYES2-*TcNdt2* (3 y 11) y pYES2 vacío (pY) con *NheI* (flecha gris indica 4kb). Electroforesis en gel de agarosa en TBE al 1,0% (90 mV/55 min); mw, marcador de peso molecular; \*, réplica de muestra; tinción con bromuro de etidio.

### 6.5.2 *TcNdt1* y *TcNdt2* son transportadores de NAD<sup>+</sup> debido a que rescatan el crecimiento de los mutantes $\Delta ndt1$ y $\Delta ndt2$ de *S. cerevisiae*

Tras la obtención de los plásmidos recombinantes, se procedió a la generación de las líneas transfectantes de *S. cerevisiae* a ser empleadas en los ensayos de complementación; en este paso se emplearon tanto en la línea mutante  $\Delta ndt1$  como en  $\Delta ndt2$  los plásmidos pYES2-*TcNdt1*, pYES2-*TcNdt2*, pYES2-*AfNdt2* (plásmido control

positivo con transportador de NAD<sup>+</sup> de *A. thaliana*, obtenido en un trabajo paralelo<sup>46</sup>), y el pYES2-vacío, generando así 8 líneas transfectantes, adicionalmente, la cepa INVSc1 (WT) fue transfectada con el vector vacío, como se presenta en la **Tabla 6**. Los transfectantes obtenidos fueron evaluados por PCR de colonia (**Figura 16**).

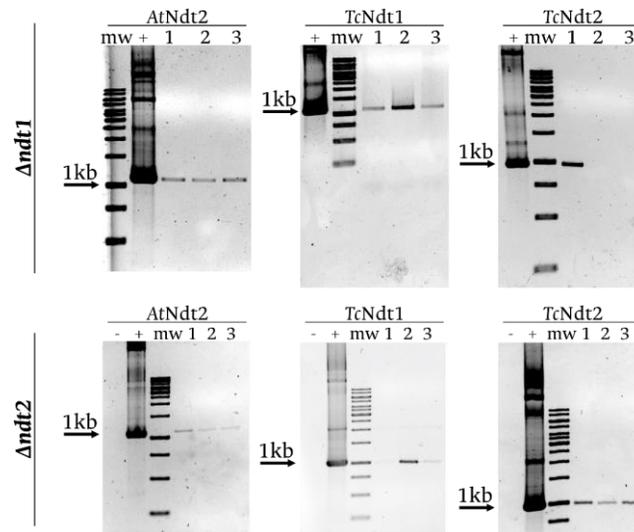
**Tabla 6.** Líneas transfectantes de *S. cerevisiae* generadas mediante transfección con los plásmidos pYES2.

Cepa	Plásmido	Línea transfectante
INVSc1 (WT)	pYES2-vacío	WT+pYES2-vacío
$\Delta ndt1$	pYES2-vacío	$\Delta ndt1$ +pYES2-vacío
	pYES2-AtNdt2	$\Delta ndt1$ +pYES2-AtNdt2
	pYES2-TcNdt1	$\Delta ndt1$ +pYES2-TcNdt2
	pYES2-TcNdt2	$\Delta ndt1$ +pYES2-TcNdt2
$\Delta ndt2$	pYES2-vacío	$\Delta ndt2$ +pYES2-vacío
	pYES2-AtNdt2	$\Delta ndt2$ +pYES2-AtNdt2
	pYES2-TcNdt1	$\Delta ndt2$ +pYES2-TcNdt2
	pYES2-TcNdt2	$\Delta ndt2$ +pYES2-TcNdt2

En la PCR de colonia se observa que para todos los tratamientos se generaron amplificadores en las transfectantes, no obstante, algunas de las colonias no presentaron el resultado esperado. Esto puede deberse a cambios en el procesamiento entre cada muestra, se ha reportado que este tipo de PCR sobre células de levaduras es muy sensible a la disponibilidad del DNA plantilla, y debido a que las células presentan resistencia a factores como el calor y la congelación, suele suceder que no se libere el material genético. Además, en levaduras se ha identificado que la PCR llevada a cabo en las condiciones empleadas puede verse inhibida por exceso de células en la muestra<sup>152,153</sup>; de esta manera, las diferencias en la intensidad de las bandas, o la no generación del producto, también pueden deberse a alta cantidad de células tomadas como plantilla de reacción.

A partir de aquellas colonias en las que se obtuvo el amplificado más contundente para cada gen, se hicieron crioconservados, con el fin de preservar las líneas transfectantes a largo plazo, y para ello se suspendieron en medio con glicerol al 15% y se almacenaron a -80°C, según lo reportado en bibliografía<sup>154</sup>. Con la obtención de las células transfectadas de interés, se procedió a evaluar la actividad transportadora de NAD<sup>+</sup> de TcNdt1 y TcNdt2 mediante los ensayos de complementación (**Figura 17** y **Figura 18**).

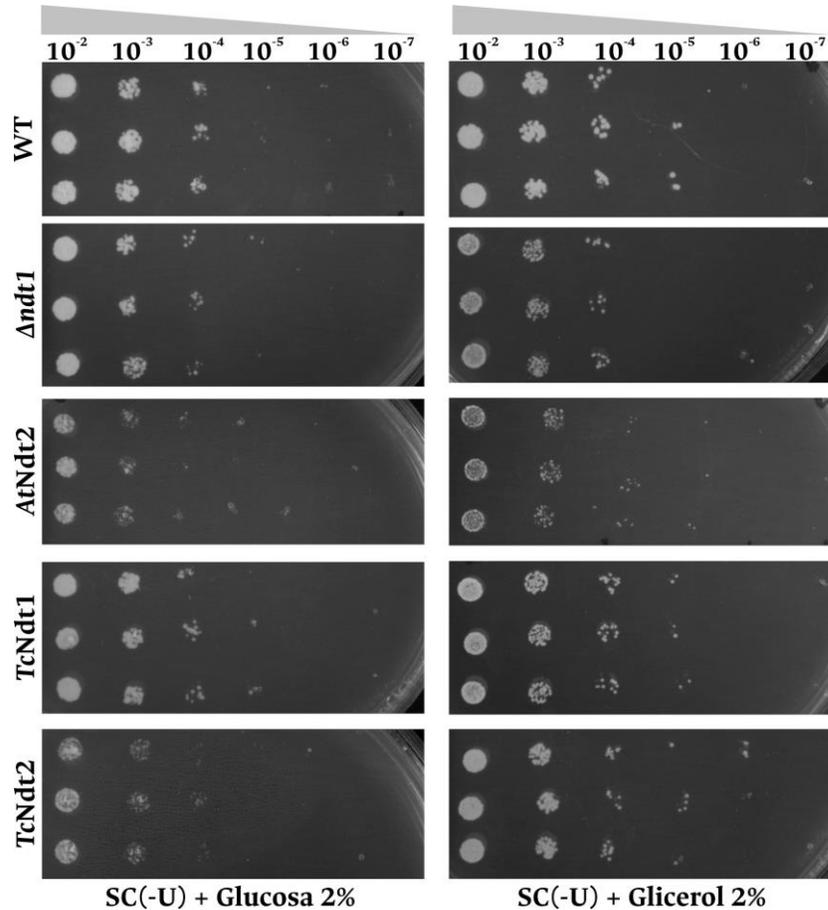
En estos ensayos se determinó la capacidad de los candidatos de *T. cruzi* de reestablecer el crecimiento de las levaduras mutantes en un medio sin fuente fermentable de carbono, pues debido a que las células modificadas no tienen un suministro adecuado de NAD<sup>+</sup> mitocondrial, no pueden llevar a cabo procesos críticos para la homeostasis celular, y al restringir su capacidad de fermentar, se compromete su crecimiento; lo que se espera al suministrar el plásmido recombinante con la secuencia transportadora de NAD<sup>+</sup>, es que las levaduras presenten un crecimiento equiparable al de las células WT.



**Figura 16.** Evaluación de transfección de células  $\Delta ndt1$  y  $\Delta ndt2$  de *S. cerevisiae* mediante PCR. Los genes rastreados se indican en la parte superior de cada gel, y a la izquierda se indica el mutante; *TcNdt1* (972 pb), *TcNdt2* (954 pb) y *AtNdt2* (1089 pb). Electroforesis en gel de agarosa en TBE al 1,0 % (90 mV/55 min); mw, marcador de peso molecular de 1kb; +, control positivo (plásmidos pYES2 recombinantes); -, control negativo; tinción con bromuro de etidio.

En ambos mutantes se observa que con el suministro de glucosa no hay una diferencia que permita relacionar el crecimiento con el genotipo de las levaduras, lo que se ve también a largo de las diluciones realizadas, donde la disminución de células es gradual y uniforme; esto indica que en las células se está favoreciendo la glucólisis y fermentación en la generación de energía química, y por lo tanto una disfuncionalidad mitocondrial no llega a afectar sus tasas de crecimiento<sup>51</sup>.

Al momento de suministrar glicerol, sustrato no fermentable, es posible apreciar que los mutantes complementados presentan un mayor crecimiento con respecto a las levaduras transfectadas con el vector vacío, y es en la dilución 4 donde mejor se aprecia esta diferencia. En  $\Delta ndt1$  es evidente que las células WT y las que contienen a *TcNdt1* y *TcNdt2* tienen un crecimiento similar, mientras que las mutantes con pYES2-vacío tienen un crecimiento limitado, presentando solo 1 colonia en una de las 3 réplicas de la dilución 4; por su parte, en células con el control positivo *AtNdt2* se tiene un crecimiento menos marcado en las primeras diluciones, pero en la dilución mencionada se ve el crecimiento de colonias en las 3 réplicas. Este comportamiento podría corresponder a una recuperación del fenotipo silvestre dado por los candidatos evaluados, lo cual indicaría su capacidad de transportar el NAD<sup>+</sup>, lo anterior se corrobora al realizar el ensayo en el mutante  $\Delta ndt2$ , donde las células complementadas con *AtNdt2*, *TcNdt1* y *TcNdt2* tienen un crecimiento similar a las WT, y mucho más rápido que el de las mutantes que recibieron el vector vacío, lo que en este caso se aprecia desde la dilución 3.

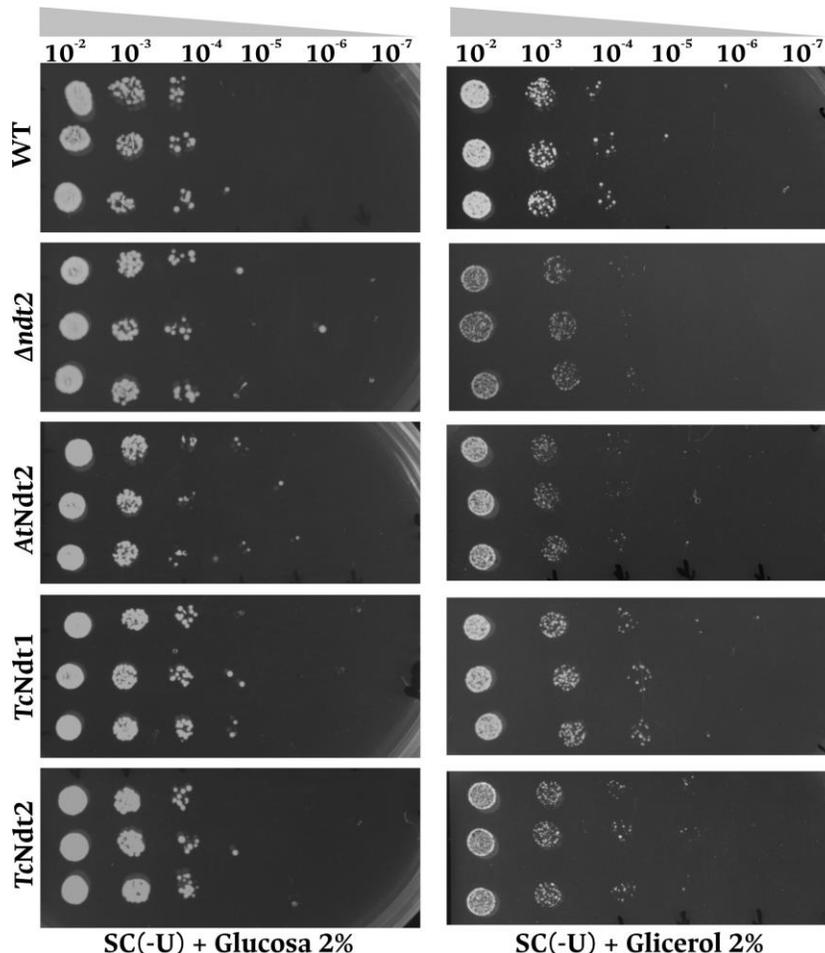


**Figura 17.** Ensayos de complementación con el mutante  $\Delta ndt1$  de *S. cerevisiae*. Evaluación del crecimiento en medio SC(-U) sólido con glucosa 2% (fermentable) y glicerol 2% (no fermentable). Líneas indicadas a la izquierda de cada placa: **WT**, *wild-type*+pYES2-vacío;  **$\Delta ndt1$**  mutante+pYES2-vacío;  **$\Delta Ndt2$** , mutante+pYES2- $\Delta Ndt2$ ; **TcNdt1**, mutante+pYES2-*TcNdt1*; **TcNdt2**, mutante+pYES2-*TcNdt2*. Diluciones de  $2 \times 10^{-2}$  hasta  $2 \times 10^{-7}$  indicadas en la parte superior.

De esta manera, empleando las diferentes cepas de *S. cerevisiae*, los ensayos de crecimiento llevados a cabo con las líneas transfectantes, indican que las secuencias *TcNdt1* y *TcNdt2* de *T. cruzi* presentan actividad de transporte del  $NAD^+$ . Es de resaltar que, para ambos mutantes, la complementación con los transportadores del parásito llevaron a un mayor crecimiento en los ensayos, obteniendo siempre células en la dilución 4, y llegando incluso a la 5; esta observación podría deberse a que estas secuencias sean más eficientes en la movilización del dinucleótido, tal como se ha observado para los transportadores ENT de nucleósidos de *Leishmania spp.*, que llegan a ser hasta 100 veces más afines por su ligando en comparación con los de homólogos de organismos no parásitos<sup>25</sup>.

Este comportamiento en que *TcNdt1* y *TcNdt2* generan un mayor crecimiento se ve respaldado por la evidencia experimental arrojada por un trabajo desarrollado recientemente en nuestro grupo de investigación, donde se siguió una estrategia similar de ensayos de complementación para la caracterización funcional de transportadores de

NAD<sup>+</sup> de *Leishmania braziliensis*<sup>155</sup>; en este trabajo igualmente se registró que el crecimiento observado en las levaduras, era mayor en aquellas complementadas con las secuencias transportadoras del parásito que en las que tenían el *AfNdt2*, e incluso más que en las WT.



**Figura 18.** Ensayos de complementación con el mutante *Δndt2* de *S. cerevisiae*. Evaluación del crecimiento en medio SC(-U) sólido con glucosa 2% (fermentable) y glicerol 2% (no fermentable). Líneas indicadas a la izquierda de cada placa: **WT**, *wild-type*+pYES2-vacío; ***Δndt2*** mutante+pYES2-vacío; ***AfNdt2***, mutante+pYES2-*AfNdt2*; ***TcNdt1***, mutante+pYES2-*TcNdt1*; ***TcNdt2***, mutante+pYES2-*TcNdt2*. Diluciones de  $2 \times 10^{-2}$  hasta  $2 \times 10^{-7}$  indicadas en la parte superior.

Se podría sugerir que el contar con transportadores más eficientes para la captación de moléculas clave para la supervivencia y proliferación, sería una estrategia que surge de la forma de vida parasitaria, facilitando la competencia por recursos al interior de sus hospederos; una caracterización funcional más profunda de estos transportadores permitiría respaldar, o refutar, esta idea con evidencia más robusta, y para ello se propone el uso de otras herramientas biotecnológicas adicionales. Dentro de estas herramientas se contempla el uso de alternativas más cuantificables, al igual que el manejo del doble mutante *Δndt1Δndt2*, en el cual el crecimiento en medio no fermentable se ve afectado en

mayor medida, y, por ende, el fenómeno mencionado podría apreciarse más claramente, y aportar evidencia adicional de la actividad de las proteínas evaluadas.

## 6.6 Desarrollo de un sistema de expresión de *TcNdt1* y *TcNdt2* en membranas de *E. coli* para su estudio funcional empleando la proteína MISTIC

A medida que se desarrolló esta tesis, surgió la posibilidad de trabajar con la herramienta MISTIC, una proteína fusión que al ser incorporada como etiqueta en recombinantes, media la translocación e inserción de las proteínas en membranas de células de *E. coli*; esta característica ha perfilado a la proteína MISTIC como una promisoriosa alternativa para la caracterización de transportadores, pues al conseguir que las proteínas candidato se incorporen en las membranas, se puede emplear tanto células vivas, como vesículas derivadas de las membranas, en ensayos funcionales diseñados para corroborar dicha actividad<sup>72,73</sup>.

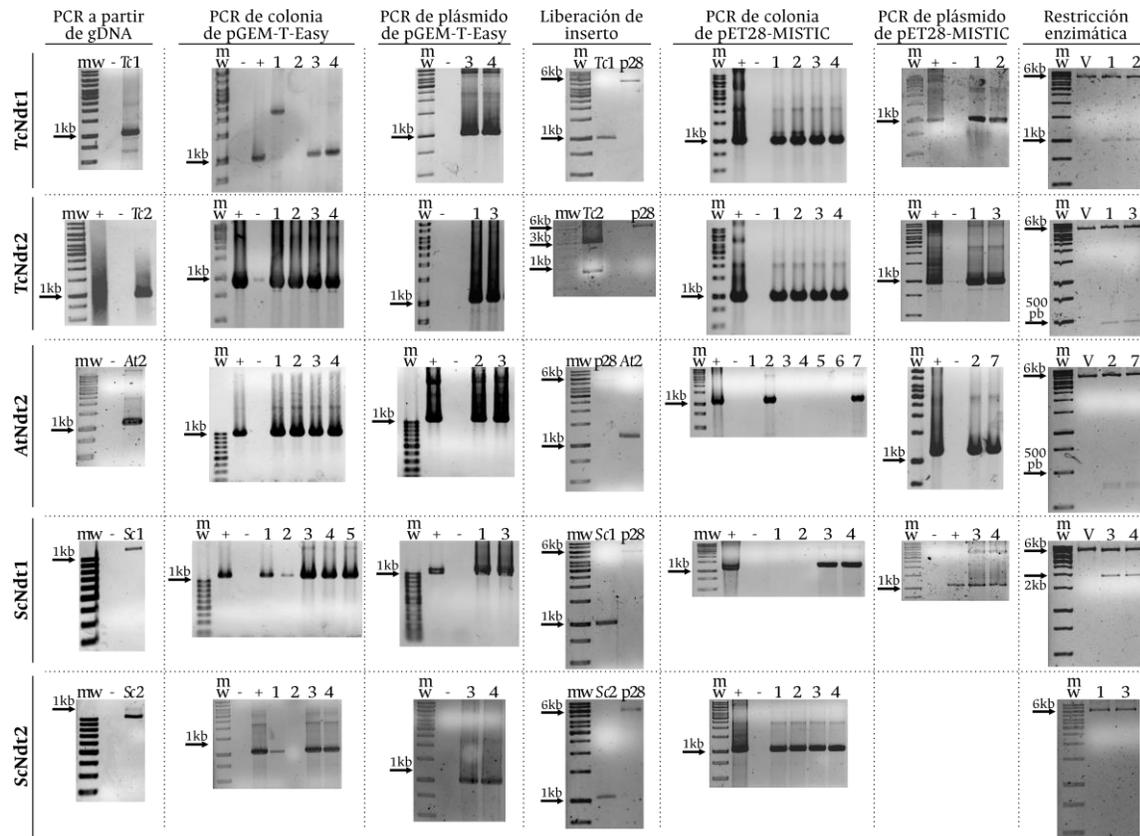
A partir del plásmido de expresión pET28-MISTIC, el cual permite la expresión de proteínas recombinantes en membranas de *E. coli*, empleando primers específicos diseñados para la clonación de las secuencias *TcNdt1*, *TcNdt2*, *AtNdt2*, *ScNdt1* y *ScNdt2* en este vector, se construyeron plásmidos para expresar estos transportadores de NAD<sup>+</sup>. Se establecieron condiciones de expresión de las recombinantes, y se llevó a cabo ensayos piloto de transporte del dinucleótido empleando células vivas de *E. coli*.

### 6.6.1 Generación de los plásmidos de expresión pET28-MISTIC

Como primer paso en la implementación de este sistema, se llevó a cabo la sub-clonación de *TcNdt1* y *TcNdt2*, al igual que de los transportadores de NAD<sup>+</sup> *AtNdt2*, *ScNdt1* y *ScNdt2* (controles de transportador funcional), en pET28-MISTIC (**Figura 19**); de manera general se siguió la misma estrategia metodológica adelantada para la obtención de los plásmidos pYES2 de levaduras. Como primer paso se realizó la amplificación de los insertos a partir de gDNA, a excepción de *AtNdt2* que se obtuvo a partir de PCR sobre sobre el pYES2-*AtNdt2*; en este punto cabe mencionar que los transportadores de *T. cruzi* y de *S. cerevisiae* pueden amplificarse desde gDNA debido a que estas secuencias carecen de intrones, mientras que para el de *A. thaliana* se requiere contar con cDNA sintetizado a partir de mRNA, o en este caso, con un constructo que contenga el marco abierto de lectura correctamente clonado.

Los insertos amplificados fueron clonados en el pGEM-T-Easy T/A empleando ligasa T4, y con los productos de estas reacciones se transformaron células *E. coli* TOP10; en toda las transformaciones fue posible obtener colonias, y tras evaluarlas por PCR, a partir de aquellas positivas se extrajeron por lisis alcalina los plásmidos de mantenimiento pGEM-T recombinantes. Los vectores obtenidos se evaluaron por PCR, y en todos los clones extraídos se obtuvo el amplificado esperado; el peso de cada inserto se indica en la

leyenda de la **Figura 19**, al igual que las enzimas empleadas en el paso de liberación del inserto y en la linealización del vector receptor.



**Figura 19.** Generación de los pET28-MISTIC recombinantes mediante sub-clonación. Insertos de interés indicados a la izquierda; cada paso del proceso está rotulado en la parte superior. Fragmentos clonados y sitios de restricción: *TcNdt1* (*Tc1*, 972pb, BamHI y HindIII), *TcNdt2* (*Tc2*, 954pb, BamHI y HindIII), *AfNdt2* (*Af2*, 1089pb, BamHI y Sall), *ScNdt1* (*Sc1*, 1122pb, BamHI y HindIII) y *ScNdt2* (*Sc2*, 1008pb, BamHI y HindIII); vectores empleados: pGEM-T-Easy (3016pb) y pET28-MISTIC (p28 o V, 5681pb). Electroforesis en gel de agarosa en TBE al 1,0% (90 mV/55 min); mw, marcador de peso molecular; +, control positivo; -, control negativo; tinción con bromuro de etidio.

Los plásmidos pGEM-T recombinantes y el pET28-MISTIC vacío fueron sometidos a doble digestión (el pET28-MISTIC fue digerido para cada una de las ligaciones), con el fin de crear los extremos cohesivos adecuados para la correcta ligación de los insertos liberados en el vector receptor linealizado. Los fragmentos generados fueron ligados con la enzima ligasa T4, y con los productos de esta reacción se transformaron células *E. coli* de la cepa de mantenimiento TOP10; en esta nueva transformación, también fue posible obtener colonias positivas que adquirieron los plásmidos recombinantes para todos los tratamientos, lo cual se evidencia en las PCR de rastreo llevadas a cabo.

De las colonias positivas, se extrajeron por lisis alcalina los plásmidos pET28-MISTIC recombinantes, estos se evaluaron por PCR con el fin de corroborar la presencia del

inserto; para el caso de pET28-MISTIC-ScNdt2 se hizo la PCR sobre el plásmido, sin embargo, este resultado no se documentó y por lo tanto no se muestra. Como último paso en la caracterización de los plásmidos obtenidos, se realizó la digestión enzimática con el fin de confirmar su identidad, en la **Tabla 7** se relacionan las enzimas empleadas en este experimento, al igual que el perfil de bandas esperadas para los vectores recombinantes; en el monitoreo de la restricción con enzimas (**Figura 19**) se aprecia que en todos los tratamientos se obtuvo el perfil de bandas correspondiente a los plásmidos de interés pET28-MISTIC.

**Tabla 7.** Perfiles de bandeado esperados en la evaluación por restricción para los plásmidos pET28-MISTIC recombinantes construidos.

Plásmido	Enzimas de restricción	No. de bandas esperadas	Peso esperado (pb)
pET28-MISTIC-TcNdt1	BamHI y HindIII	2	5656 y 978
pET28-MISTIC-TcNdt2	NheI	2	6172 y 444
pET28-MISTIC-AtNdt2	BamHI y KpnI	2	6286 y 471
pET28-MISTIC-ScNdt1	EcoRV	2	5507 y 1832
pET28-MISTIC-ScNdt2	BamHI	1	6667

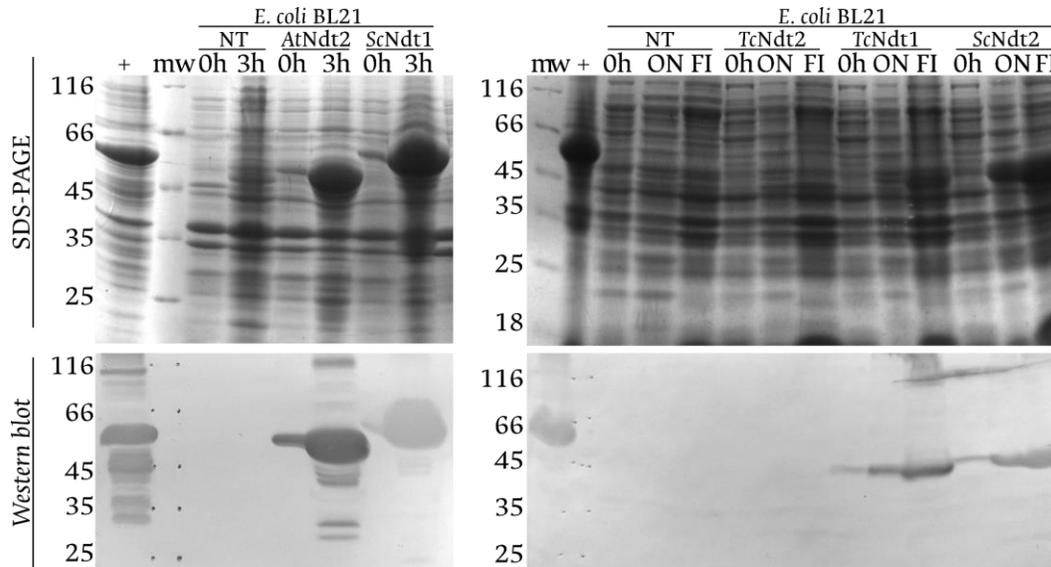
Estos resultados permiten comprobar la obtención de los plásmidos pET28-MISTIC-TcNdt1, pET28-MISTIC-TcNdt2, pET28-MISTIC-AtNdt2, pET28-MISTIC-ScNdt1 y pET28-MISTIC-ScNdt2, insumos necesarios en la implementación del sistema de la proteína fusión MISTIC para la caracterización de transportadores de NAD<sup>+</sup> en células de *E. coli*. El siguiente paso consistió en establecer condiciones óptimas de expresión de las proteínas recombinantes, lo cual se presenta a continuación.

### 6.6.2 Establecimiento de condiciones de expresión de las proteínas MISTIC- Ndt recombinantes en *E. coli*

Para evaluar la expresión de las proteínas, los vectores pET28-MISTIC generados se usaron en la transformación de la cepa de expresión BL21 de *E. coli*. A partir de los transformantes positivos se realizaron preinóculos para la expresión de las proteínas MISTIC-TcNdt1-6xHis, MISTIC-TcNdt2-6xHis, MISTIC-AtNdt2-6xHis, MISTIC-ScNdt1-6xHis y MISTIC-ScNdt2-6xHis (a partir de ahora se nombrarán sin el 6xHis), y de igual manera se hizo para células BL21 no transformadas (NT); posteriormente se hicieron inóculos líquidos de estas células, y cuando llegaron a una OD<sub>600nm</sub> cercana a 0,5, se llevó a cabo la inducción de la expresión con IPTG 1,0 mM a 37°C.

Cabe aclarar que la expresión de las proteínas se llevó a cabo por grupos (**Figura 20**), donde inicialmente se indujo a MISTIC-AtNdt2 y MISTIC-ScNdt1, y después se hizo con TcNdt1, TcNdt2 y ScNdt2; en el primer experimento (izquierda) se evaluaron las fracciones insolubles de proteína de los tiempos 0 horas (0h) y 3 horas (3h), mientras que en el segundo (derecha) se evaluaron proteínas totales a los tiempos de 0 horas y *overnight* (ON) y la fracción insoluble de proteínas en tiempo *overnight* (FI). En ambos casos se

emplearon extractos de proteína de *E. coli* BL21 NT como controles negativos de expresión.



**Figura 20.** Evaluación de la expresión de las proteínas MISTIC-*TcNdt1* (52,0kDa), MISTIC-*TcNdt2* (51,5kDa), MISTIC-*AtNdt2* (56,5kDa), MISTIC-*ScNdt1* (57,4kDa) y MISTIC-*ScNdt2* (53,2kDa). Sobre los tiempos de inducción se indican los tratamientos correspondientes; mw, marcador de peso molecular (kDa); +, proteína control con etiqueta 6xHis. SDS-PAGE 12% (120 mV/55 min); tinción con azul de Coomassie. *Western blot* en membrana de nitrocelulosa, anticuerpos 1°  $\alpha$ -6xHis-*mouse* (1:5000), y 2°  $\alpha$ -*mouse* acoplado a fosfatasa alcalina (1:10000).

Se observa una expresión contundente en 4 de las proteínas recombinantes generadas, tanto a nivel de SDS -PAGE como de *western blot*; la proteína MISTIC-*TcNdt2* no fue obtenida en este experimento. Se ve también que en los tratamientos en que se obtuvo proteína, está sucediendo el proceso de autoinducción, en el cual la recombinante es producida sin necesidad de un agente inductor; se ha reportado que esto puede asociarse al manejo de sistemas de expresión que emplean el promotor T7, el cual deja de estar reprimido cuando disminuye la disponibilidad de glucosa en el cultivo celular de *E. coli*<sup>156</sup>.

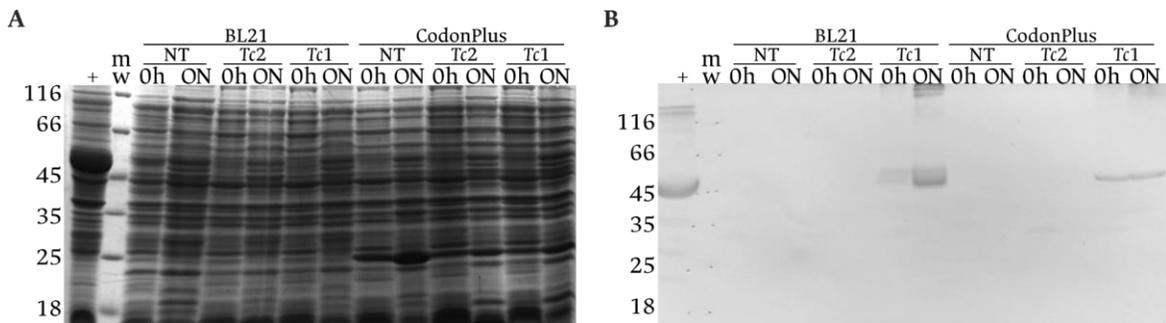
Otro aspecto llamativo es que las proteínas provenientes de *A. thaliana* y *S. cerevisiae* tienen una expresión más elevada con respecto a lo obtenido para MISTIC-*TcNdt1*, o MISTIC-*TcNdt2* que no se expresa. Teniendo en cuenta que todos los constructos corresponden a secuencias de transportadores de la misma familia, la baja expresión no podría atribuirse a factores como la alta hidrofobicidad (característica de las proteínas de membrana<sup>157</sup>), sino que debe relacionarse con elementos propios de cada secuencia.

Al emplear a *E. coli* como plataforma para la expresión heteróloga, se ha visto que en algunos casos los bajos niveles de expresión de determinadas proteínas pueda deberse a la presencia de los denominados codones raros, que son tripletes que no pueden ser procesados eficientemente por la maquinaria celular de la traducción de las bacterias, principalmente porque los tRNA específicos para ellos no son tan abundantes<sup>158</sup>. Por otro lado, en *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major* se ha identificado que los codones raros se presentan

con mayor frecuencia, y que su abundancia a lo largo de las secuencias transcritas está directamente relacionada con los niveles de proteína traducida, por lo que estos elementos adquieren la función de reguladores de la expresión en los trypanosomátidos, funcionando como mecanismo alternativo a la regulación a nivel de transcripción que ocurre en la mayoría de organismos vivos<sup>159,160</sup>.

Teniendo en cuenta lo anterior, puede sugerirse que la baja expresión de las recombinantes *TcNdt1* y *TcNdt2*, con respecto a los ortólogos de *A. thaliana* y *S. cerevisiae*, esté relacionada con la presencia de codones raros en estas secuencias, y, asimismo, que *TcNdt2* tendría una expresión más regulada al interior del parásito, por lo que su funcionalidad estaría asociada a eventos más concretos, mientras que *TcNdt1* presentaría una expresión más abundante y mantenida a lo largo de la vida de *T. cruzi*; en cualquier caso, estas premisas deberán ser estudiadas a fondo en proyectos posteriores para corroborarlas o refutarlas.

Con el fin de abordar si la presencia de codones raros estaría influyendo en la expresión de las recombinantes MISTIC-*TcNdt1* y MISTIC-*TcNdt2*, se llevó a cabo la inducción paralela en las cepas de expresión de *E. coli* BL21 y BL21-CodonPlus (llamada CodonPlus de ahora en adelante); CodonPlus corresponde a una cepa de células modificadas que producen una mayor diversidad y cantidad de tRNA, por lo que favorecen la expresión de proteínas que presentan codones raros en sus precursores<sup>161</sup>. Células de las cepas mencionadas fueron transformadas con los plásmidos pET28-MISTIC-*TcNdt1* y pET28-MISTIC-*TcNdt2*, se indujo la expresión de las proteínas con IPTG 1mM a 37°C, y se monitorearon extractos totales de proteína en los tiempos de 0 horas y *overnight* (ON) (**Figura 21**).



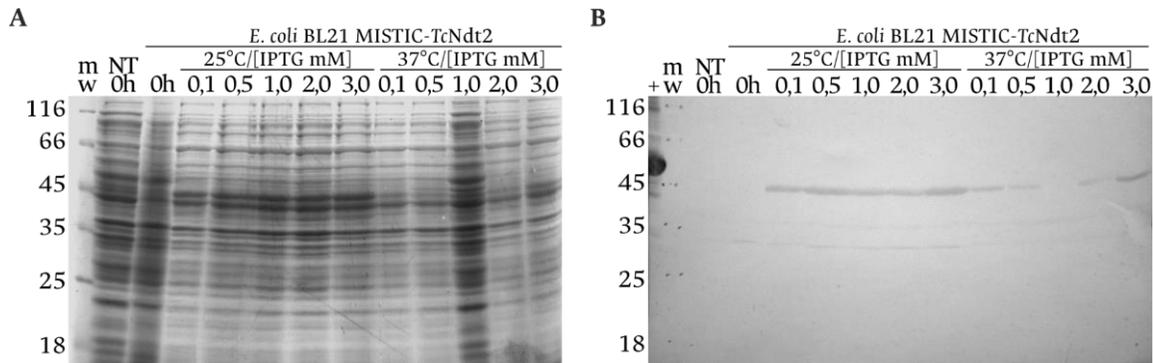
**Figura 21.** Evaluación de la expresión de las proteínas MISTIC-*TcNdt1* (52,0kDa) y MISTIC-*TcNdt2* (51,5kDa) en las cepas BL21 y CodonPlus de *E. coli*. **A**, evaluación de la presencia de las recombinantes en extractos totales de proteína a tiempos de 0 horas y *overnight*. SDS-PAGE 12% (120 mV/55 min); tinción con azul de Coomassie. **B**, *western blot* en membrana de nitrocelulosa, anticuerpos 1°  $\alpha$ -6xHis-*mouse* (1:5000), y 2°  $\alpha$ -*mouse* acoplado a fosfatasa alcalina (1:10000). Sobre los tiempos de inducción se indican los tratamientos correspondientes; mw, marcador de peso molecular (kDa); +, proteína control con etiqueta 6xHis.

En este ensayo a nivel de SDS-PAGE (**Figura 21A**) se observa que en ninguna de las dos cepas hay un bandeo diferencial atribuible a las proteínas inducidas, y en la inmunodetección (**Figura 21B**) se encontró que en la cepa CodonPlus tampoco es posible la expresión de MISTIC-*TcNdt2*. A pesar de que este tratamiento no permitió la expresión

de la TcNdt2 recombinante, para TcNdt1 se da autoinducción en ambas líneas, y es interesante la diferencia en el patrón de expresión entre las cepas que se ve en el *western blot*. En las células BL21 se ve una mayor expresión, reflejada en una señal más intensa sobre la membrana, aunque también se presenta un banda de peso ligeramente superior, al igual que agregados de proteína que no migraron durante la electroforesis; estos han sido reportadas como indicadores que señalan que durante el proceso de expresión se está generando una gran cantidad de proteína mal plegada<sup>162</sup>.

Por el contrario, un patrón de expresión como el observado con la cepa CodonPlus, con una banda discreta bien definida en el peso esperado (aunque también se observa un poco de agregados), se ha reportado como un indicador de que la proteína se encuentra bien plegada, y, por lo tanto, que se encuentre en una forma activa<sup>162</sup>, lo cual es de interés teniendo en cuenta que se busca establecer un sistema de evaluación funcional de las proteínas transportadoras.

Tras encontrar que el cambio de la cepa de expresión no contribuyó a obtener la proteína MISTIC-TcNdt2, se hizo una nueva aproximación empleando la cepa BL21, evaluando el efecto de la temperatura y la concentración de inductor sobre la expresión (**Figura 22**). En este experimento se usaron las temperaturas de 25°C y 37°C, y 5 concentraciones de IPTG (0,1 – 3,0 mM), y se evaluó la expresión sobre extractos de proteínas totales de los tiempos de 0 horas y *overnight*.



**Figura 22.** Evaluación del efecto de la temperatura y la concentración de IPTG en la expresión de MISTIC-TcNdt2 (51,5kDa). **A**, evaluación de la presencia de las recombinantes en extractos totales de proteína a tiempos de 0 horas y *overnight*. SDS-PAGE 12% (120 mV/55 min); tinción con azul de Coomassie. **B**, *western blot* en membrana de nitrocelulosa, anticuerpos 1°  $\alpha$ -6xHis-*mouse* (1:5000), y 2°  $\alpha$ -*mouse* acoplado a fosfatasa alcalina (1:10000). Sobre los tiempos de inducción se indican los tratamientos correspondientes de temperatura y concentración de IPTG; mw, marcador de peso molecular (kDa); +, proteína control con etiqueta 6xHis.

Al analizar tanto el SDS-PAGE como el *western blot* de este ensayo, es notable que el factor de la temperatura es determinante en la expresión de la proteína MISTIC-TcNdt2, ya que esta se consigue a 25°C, sin verse afectada por los cambios en la concentración de IPTG. Por su parte, a 37°C la expresión disminuye, y en este caso se ve afectada por

la concentración de inductor. De manera llamativa se aprecia que la condición de 37°C y 1mM de IPTG es la menos adecuada para que la bacteria produzca a MISTIC-TcNdt2, con relación a ello, esta condición es óptima para la expresión de las demás recombinantes evaluadas en el sistema pET28-MISTIC. Esto representa la importancia de evaluar múltiples variables en la optimización de la expresión de proteínas recombinantes en los sistemas heterólogos.

### 6.6.3 Ensayos piloto de transporte de NAD<sup>+</sup> de las proteínas recombinantes Ndt empleando alcohol deshidrogenasa (ADH)

Para implementar el sistema de la proteína fusión MISTIC en la caracterización de transportadores de NAD<sup>+</sup>, se diseñó una metodología que permite el uso de células vivas que expresen al transportador. En este apartado se realizó un ensayo preliminar, se emplearon 3 líneas celulares CodonPlus, con el fin de establecer las condiciones adecuadas: células no transformadas (NT, control negativo), transformadas con pET28-MISTIC vacío (MISTIC, control negativo), y transformadas con pET28-MISTIC-ScNdt1 (ScNdt1, control positivo).

En esta estrategia inicialmente se tomaron células de las 3 líneas, se llevó a cabo la inducción a 37°C con IPTG 1mM, durante 1 hora. Seguido de esto, el volumen de células fue dividido en 2 y una parte se incubó con NAD<sup>+</sup> 1mM, mientras que a la otra no se suplementó con el dinucleótido; las células se mantuvieron en agitación constante durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir la internalización del NAD<sup>+</sup> por el transportador ScNdt1. Posteriormente, el transporte se detuvo centrifugando las células a 6000rpm/10 minutos/4°C. El pellet celular fue lavado 3 veces con PBS 1X, y seguido se realizó la lisis celular al tratar las bacterias con HCl a 80°C. El extracto generado fue neutralizado con NaOH, se centrifugó a 12000rpm/10 minutos, finalmente, el contenido del NAD<sup>+</sup> en el sobrenadante se colectó para realizar los ensayos de actividad con la alcohol deshidrogenasa, lo cual indirectamente refleja el transporte<sup>163</sup>.

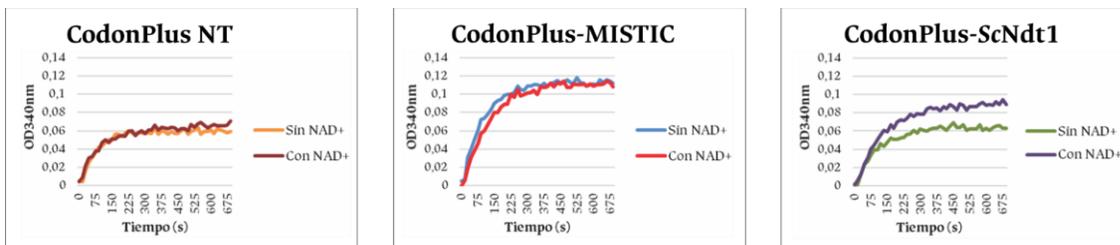
Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo la metodología propuesta por Klingenberg<sup>127</sup>, se comparó la producción de NADH (mediada por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (**Ecuación 1**)) a partir del NAD<sup>+</sup> presente en los extractos intracelulares provenientes de los tratamientos con las 3 líneas celulares NT, MISTIC y ScNdt1; de esta manera, la actividad de la ADH se puede relacionar indirectamente con el proceso de internalización del dinucleótido, pues si hay un aumento en la producción de NADH con respecto al control, se podrá decir que en aquel tratamiento las células incorporaron una mayor cantidad del NAD<sup>+</sup>, debido a la actividad del transportador. La reacción se llevó a cabo en buffer pirofosfatos, adicionando etanol absoluto, el extracto de NAD<sup>+</sup> y a la ADH, y se permitió la formación del NADH durante 700 segundos, haciendo monitoreo mediante espectrofotometría a OD<sub>340nm</sub>.



**Ecuación 1.** Reducción del NAD<sup>+</sup> mediada por la enzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH) en presencia de Etanol. El buffer pirofosfatos se complementa con semicarbazida que se une al acetaldehído, desfavoreciendo la reacción reversa.

Los datos obtenidos fueron graficados comparando la actividad de la ADH obtenida con los extractos de las bacterias incubadas con o sin NAD<sup>+</sup> (**Figura 23**); cabe resaltar que la comparación se hace de manera interna en cada uno de los tratamientos, por lo que los resultados no son comparables entre las líneas empleadas.

En los controles negativos CodonPlus-NT y CodonPlus-MISTIC se observa que no hay una diferencia en la actividad de la ADH al emplear los extractos provenientes de las bacterias tratadas con o sin NAD<sup>+</sup>, lo cual es de esperarse, pues no hubo ningún factor que indujera un cambio en los niveles internos del dinucleótido. Para el caso de las células CodonPlus-ScNdt1 aparece una diferencia en la actividad de la ADH entre los dos tratamientos, donde las células incubadas con NAD<sup>+</sup> presentan un aumento en el parámetro con respecto de las que no se incubaron con la molécula; este comportamiento puede relacionarse con la expresión de la recombinante MISTIC-ScNdt1, que estaría mediando la captación del NAD<sup>+</sup> suministrado en el medio durante la primera parte del ensayo.



**Figura 23.** Ensayo preliminar de transporte indirecto de NAD<sup>+</sup> con la ADH. Las líneas celulares se indican en la parte superior, mientras que el tratamiento se indica en las convenciones de la parte derecha.

Si bien estos resultados parecen indicar que el sistema permite la evaluación de la actividad transportadora de las Ndt, es importante considerar la reproducibilidad del mismo, ya que los datos mostrados corresponden a una única réplica en un ensayo exploratorio. Dos factores a tener en cuenta en la optimización del ensayo son, primero, el efecto de la etiqueta recombinante, si bien la proteína MISTIC media la inserción de las proteínas en la membrana bacteriana, se ha reportado puede llegar a disminuir la actividad transportadora de las recombinantes hasta en un 80%<sup>73</sup>, por lo que es posible que las diferencias en el contenido de NAD<sup>+</sup> intracelular no sean tan marcadas debido a una baja actividad del transportador recombinante, ante lo cual se requeriría un método de mayor sensibilidad. Segundo, el método de cuantificación, para la determinación del NAD<sup>+</sup> intracelular se ha implementado la generación de compuestos fluorescentes a partir del dinucleótido, lo que se conoce como ensayos de ciclación del NAD<sup>+</sup><sup>163</sup>, los cuales son más

sensibles y reproducibles, y por lo tanto son el estándar de trabajo, que se planea emplear en trabajos posteriores.

En conjunto estos resultados muestran que se generaron los insumos necesarios para el uso del sistema de la proteína fusión MISTIC, que se dieron los primeros pasos para la estandarización de ensayos de transporte que permitan evaluar la actividad de secuencias candidato a transportador de NAD<sup>+</sup>; y se resalta también que, aunque en este trabajo se enfocó el desarrollo hacia los transportadores del dinucleótido, el sistema tiene la capacidad de emplearse en la caracterización de un amplio rango de proteínas capaces de movilizar distintos ligandos, y por lo mismo, vale la pena continuar con su implementación.

Tras confirmar la actividad transportadora de NAD<sup>+</sup> de *TcNdt1* y *TcNdt2*, se abordó la generación de una herramienta biotecnológica que permitiera el estudio de alguno de los 2 transportadores a nivel de proteína endógena. Se escogió a *TcNdt2*, debido a que el estudio de estas proteínas en *Leishmania* arrojó un reconocimiento cruzado entre diferentes anticuerpos generados contra los 3 transportadores *LbNdt* identificados<sup>155</sup>. Los resultados presentados a continuación corresponden a la aproximación adelantada, en la que se emplearon proteínas recombinantes y herramientas inmunológicas.

## 6.7 La proteína *TcNdt2* se expresa empleando el vector recombinante pETSUMO-*TcNdt2* en el sistema *E. coli*

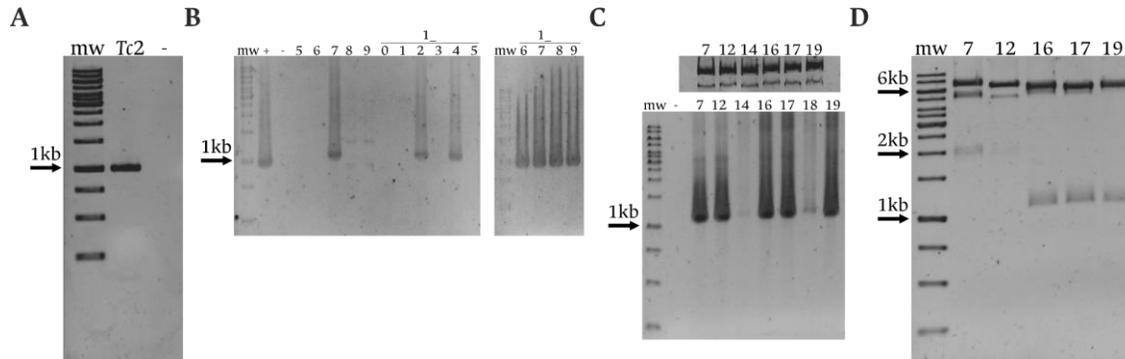
### 6.7.1 Construcción del vector de expresión pETSUMO-*TcNdt2*

La secuencia codificante del candidato *TcNdt2* fue amplificada por PCR a partir de gDNA de *T. cruzi* extraído previamente en el grupo de investigación; tras confirmar la amplificación, el producto de 954pb fue purificado de banda (**Figura 24A**) y posteriormente clonado en el vector de expresión pETSUMO/TA empleando ligasa T4. Con la ligación se transformaron células *E. coli* TOP10 por choque térmico, y las transformantes se evaluaron mediante PCR de colonia (**Figura 24B**), en donde 7 colonias resultaron positivas.

Se extrajeron los plásmidos de las colonias positivas por lisis alcalina, y se visualizaron en gel de agarosa (**Figura 24C**, arriba), donde se aprecian bandas correspondientes a diferentes conformaciones de enrollamiento del DNA. La correcta orientación del gen en los plásmidos se evaluó por PCR direccional (**Figura 24C**, abajo), empleando como *primer* directo el SUMO-Forward (suministrado por el fabricante), que se hibrida sobre la región codificante de la etiqueta SUMO, corriente arriba del sitio de clonación (aumentando el tamaño del inserto); y como *primer* reverso se empleó el del Set No. 1. Mediante esta estrategia se identificaron 5 clones correctamente direccionados.

Los plásmidos direccionados fueron sometidos a digestión enzimática (**Figura 24D**), donde los clones 16, 17 y 19 mostraron el perfil de digestión esperado de dos bandas de alrededor de 1000 y 5500 pb, mientras que los clones 7 y 12 mostraron un perfil de bandas que no corresponde al plásmido de interés, con bandas a la altura de 6000pb y una banda de

cerca de 2000pb; estos resultados permitieron confirmar la obtención e identidad de tres clones del vector recombinante de expresión pETSUMO-*TcNdt2*.



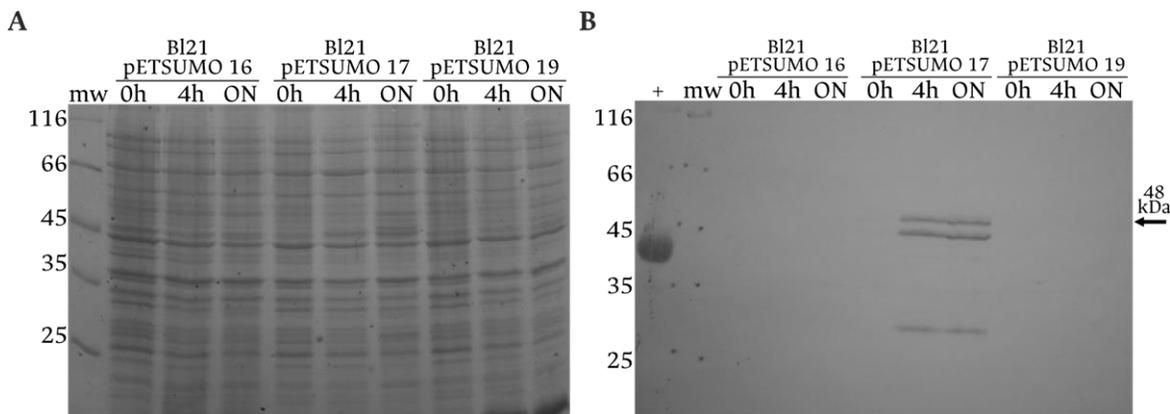
**Figura 24.** Obtención del vector de expresión pETSUMO-*TcNdt2*. **A**, amplificación del candidato *TcNdt2* (954 pb) mediante PCR. **B**, evaluación de clones mediante PCR de colonia. **C**, plásmidos extraídos por lisis alcalina (arriba); evaluación de direccionalidad por PCR (abajo). **D**, evaluación por restricción enzimática empleando *EcoRI*. (+), control positivo; (-), control negativo. Electroforesis en gel de agarosa en TBE al 1,0 % (90 mV/55 min); mw, marcador de peso molecular de 1kb; tinción con bromuro de etidio.

### 6.7.2 Expresión de la proteína recombinante 6xHis-SUMO-*TcNdt2*

Para obtener la proteína recombinante 6xHis-SUMO-*TcNdt2* (48 kDa), células *E. coli* de la cepa de expresión BL21 fueron transformadas con los 3 clones pETSUMO-*TcNdt2* generados (16, 17 y 19). Con las transformantes se llevó a cabo un ensayo de expresión, manejando una concentración de IPTG 1mM y evaluando los tiempos de inducción de 0 horas (0h), 4 horas (4h) y *overnight* (ON) (**Figura 25**).

En la electroforesis no se evidencia claramente la expresión de la proteína recombinante (de 48 kDa; la proteína endógena de *T. cruzi* (35 kDa), más las etiquetas que otorga pETSUMO (13 kDa)). Solo en el clon 17 aparecen bandas discretas (tamaño aproximado a 45 kDa), que pueden corresponder a la proteína recombinante. Para verificar la identidad de dichas bandas, se realizó el *western blot*, empleando un anticuerpo específico para la etiqueta de 6xHis; tras el revelado, en la membrana se reconocen las dos bandas diferenciales visibles en el SDS-PAGE para las fracciones del clon 17, y una adicional de peso inferior y cercano a los 30 kDa, la cual puede atribuirse a un producto de degradación de la recombinante.

La baja expresión de proteínas de membrana en el sistema heterólogo *E. coli* corresponde a un fenómeno frecuente para proteínas eucariotas de este tipo, debido a que estas células carecen de la maquinaria adecuada para su procesamiento y correcto plegamiento<sup>73</sup>, e igualmente esta condición puede asociarse con la inestabilidad y aparición de productos de degradación. No obstante la baja expresión, el sistema permitió obtener el antígeno necesario para el desarrollo de una herramienta inmunológica para la detección y estudio de la proteína endógena; este proceso se describe después de la validación funcional de los candidatos, que es mostrada a continuación



**Figura 25.** Expresión de la proteína 6xHis-SUMO-*TcNdt2* (48 kDa) en el sistema heterólogo *E. coli*. **A**, evaluación de presencia de la proteína recombinante en extractos totales de células BL21 transformadas. SDS-PAGE 12% (120 mV/55 min); mw, marcador de peso molecular; tinción con azul de Coomassie. **B**, *western blot* en membrana de nitrocelulosa de 6xHis-SUMO-*TcNdt2*; anticuerpos 1°  $\alpha$ -6xHis-*mouse*, y 2°  $\alpha$ -*mouse* acoplado a fosfatasa alcalina, en diluciones 1:5000 y 1:10000, respectivamente; +, proteína control con etiqueta 6xHis (40 kDa).

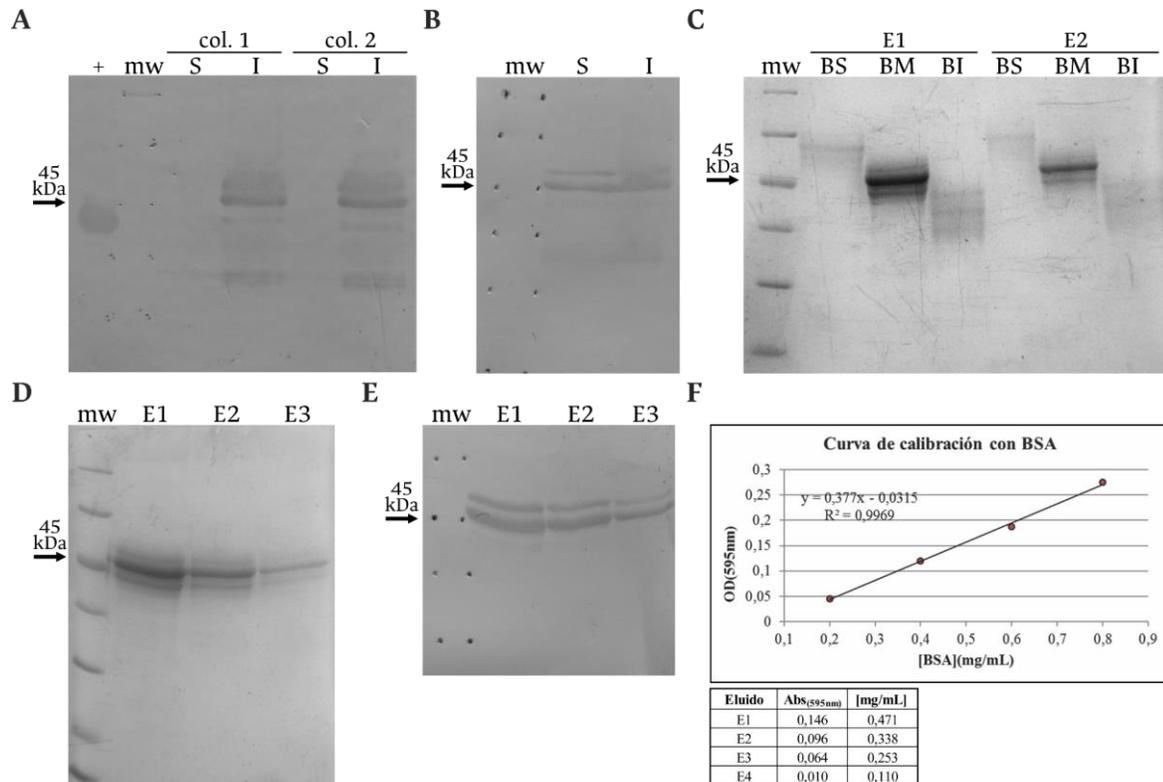
## 6.8 Una herramienta inmunológica desarrollada en modelo aviar permite determinar que *TcNdt2* es una proteína mitocondrial de *T. cruzi*

### 6.8.1 Obtención del antígeno requerido mediante expresión a gran escala de 6xHis-SUMO-*TcNdt2*

Con el propósito de estudiar la proteína endógena *TcNdt2* de *T. cruzi* se propuso desarrollar anticuerpos específicos, para ello se hizo la expresión a gran escala de 6xHis-SUMO-*TcNdt2*, con el fin de obtener el antígeno suficiente para el esquema de inoculación; teniendo en cuenta los resultados anteriores se empleó el clon 17 de expresión y se manejó un tiempo de inducción de 4 horas. Tras la transformación de *E. coli* BL21 con pETSUMO-*TcNdt2*, dos colonias fueron seleccionadas para el proceso de inducción, y al concluir el mismo, las células fueron colectadas y sometidas a lisis, en donde la proteína se obtuvo en la fracción insoluble (**Figura 26A**), lo cual es de esperarse al tratarse de una proteína de membrana, pues requiere un ambiente muy hidrofóbico para estabilizarse<sup>164</sup>.

Las fracciones insolubles de las dos colonias se unieron para hacer la purificación de los cuerpos de inclusión, con el objetivo de enriquecer la proteína recombinante expresada en la muestra. El producto de la fracción final obtenido con el buffer de extracción fue dializado para eliminar compuestos denaturantes como el cloruro de guanidino, y las fracciones soluble e insoluble se evaluaron por *western blot* (**Figura 26B**), en donde se encontró que en ambas había presencia de la proteína, indicando que el proceso de diálisis fue insuficiente para depurar la muestra.

Las fracciones soluble e insoluble provenientes de la diálisis fueron cargadas en un SDS-PAGE preparativo, y tras la corrida electroforética se procedió a hacer purificación de banda correspondiente a la proteína recombinante. Tres bandas a diferentes alturas del gel fueron cortadas y procesadas para conseguir la elución de las proteínas; el monitoreo de las bandas muestra que en 2 eluidos de la banda media hay una presencia mayoritaria de proteínas del peso esperado para 6xHis-SUMO-*TcNdt2*, a diferencia de las bandas inferior y superior (**Figura 26C**).



**Figura 26.** Expresión a gran escala y purificación parcial de 6xHis-SUMO-*TcNdt2*. **A**, *western blot* de fracciones de proteína soluble (S) e insoluble (I) obtenidas de 2 colonias de *E. coli* BL21 transformadas con pETSUMO-*TcNdt2* (clon 17). **B**, *western blot* de fracciones soluble (S) e insoluble (I) obtenidas tras la diálisis de proteína proveniente de cuerpos de inclusión. **C**, monitoreo mediante SDS-PAGE de eluidos 1 (E1) y 2 (E2) de bandas purificadas a escala preparativa; BS: banda superior, BM: media y BI: inferior. **D**, evaluación de eluidos obtenidos de BM mediante SDS-PAGE. **E**, evaluación por *western blot* de eluidos obtenidos de BM. **F**, cuantificación por método de Bradford de eluidos obtenidos de BM. SDS-PAGE al 12% (120 mV/55 min) y tinción con azul de Coomassie. Inmunodetección en membrana de nitrocelulosa; anticuerpos 1°  $\alpha$ -6xHis-*mouse*, y 2°  $\alpha$ -*mouse* acoplado a fosfatasa alcalina, en diluciones 1:5000 y 1:10000, respectivamente.

De acuerdo con la cantidad de proteína observada en el monitoreo, se decidió hacer 2 eluidos adicionales de la banda media, para un total de 4, y solo los primeros 3 se evaluaron tanto por SDS-PAGE, como por *western blot* (**Figura 26D y E**, respectivamente), encontrando que en ellos hay un enriquecimiento en proteína recombinante, por lo que se puede afirmar que fue posible purificar parcialmente a 6xHis-SUMO-*TcNdt2*.

Por último, se llevó a cabo la cuantificación de los 4 eluidos de la banda media por método de Bradford (**Figura 26F**). Empleando la curva de calibración construida, y teniendo en cuenta que de cada eluido se obtuvo un volumen cercano a 2,0 mL, al final del proceso de producción de 6xHis-SUMO-*TcNdt2* se consiguieron alrededor de 2,34 mg de proteína recombinante. Al relacionar esta cantidad de recombinante con el volumen del medio de cultivo, que en este caso fue de 1,0 L, se encontró que hubo un rendimiento de 2,34 mg<sub>proteína</sub>/L<sub>medio</sub>. El valor se encuentra dentro de lo esperado para esta plataforma de producción de recombinantes, en donde se reportan rendimientos que van desde 2,0 hasta 40 mg de proteína por L de medio<sup>165</sup>; y también se resalta el hecho que *TcNdt2* sea de naturaleza hidrofóbica, pues la expresión de este tipo de proteínas en *E. coli* es considerada un reto metodológico<sup>166</sup>.

Por último, hay que tener en cuenta que la 6xHis-SUMO-*TcNdt2* obtenida se usó como antígeno en la producción de IgY específicas para el estudio de la proteína endógena, lo cual representa una aplicación que permite el uso de la proteína agregada en los cuerpos de inclusión, la que normalmente es considerada indeseable o un producto secundario en la generación de recombinantes<sup>167</sup>.

### 6.8.2 IgY $\alpha$ -6xHis-SUMO-*TcNdt2* provenientes de suero y yemas de huevo reconocen específicamente al antígeno recombinante

La proteína 6xHis-SUMO-*TcNdt2* purificada fue empleada en la inoculación de gallinas Hy-Line Brown de 56 semanas de edad, siguiendo el esquema de la **Tabla 2**. El modelo aviar fue escogido por la alta cantidad de anticuerpos presente en las yemas de huevo, ya que es posible obtener de 18 a 25 mg de IgY por mL de yema, y de estas, entre el 1 y el 10% serán específicas por el antígeno inoculado<sup>132</sup>; por otro lado, las IgY pueden ser extraídas de sueros provenientes de sangrías de pequeños volúmenes, siendo un proceso poco invasivo, y, por último, este modelo ha sido previamente usado en el LIBBIQ<sup>131,168</sup>.

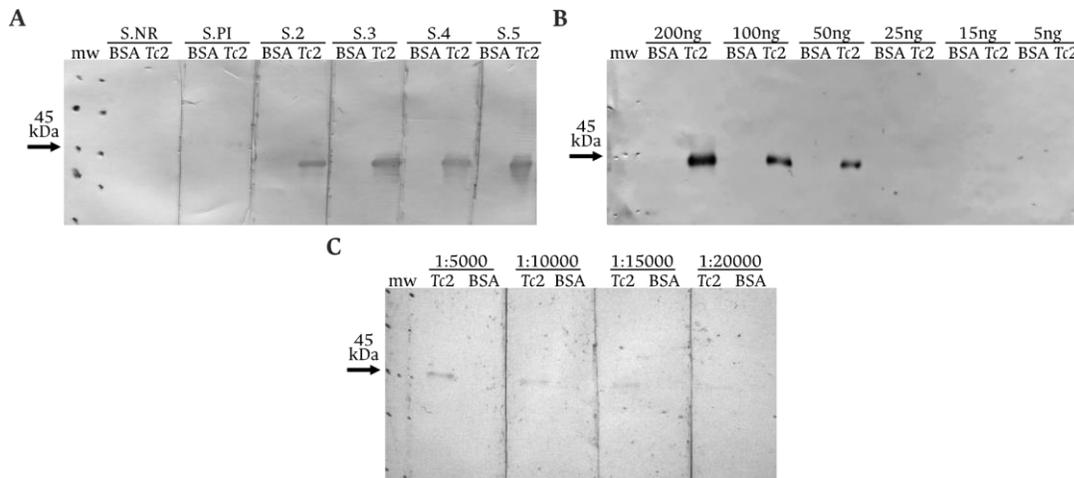
A lo largo de la inoculación se colectaron 5 sangrías, de las que fue posible obtener cerca de 2,0 mL de suero, la capacidad de reconocimiento del antígeno por parte de estas IgY fue evaluada. Inicialmente se analizó mediante *western blot* la capacidad de reconocimiento de 200 ng de proteína recombinante, y para ello se manejaron diluciones de 1:5000 de los sueros; como control negativo se empleó el suero no relacionado proveniente de la gallina control inoculada con PBS 1X, y como control de antígeno a 200 ng de BSA (**Figura 27A**). El resultado obtenido muestra que la herramienta inmunológica desarrollada permite el reconocimiento específico del antígeno a partir de la primera sangría tras la inmunización y, que la respuesta se intensifica a medida que se hacen los refuerzos.

Tras encontrar que todos los sueros inmunes reconocen el antígeno de manera específica, se determinó la mínima cantidad de proteína detectable por el sistema, empleando el suero 2 (1:5000). Se evaluó el reconocimiento de cantidades decrecientes de proteína purificada,

a partir de 200 ng y hasta 5 ng (**Figura 27B**), encontrando que se genera una señal de detección contundente hasta los 50 ng de recombinante.

Como último paso en la caracterización de los sueros, se evaluó la máxima dilución del suero 2 (1:5000, 1:10000, 1:15000, 1:20000) capaz de reconocer 50 ng de antígeno (**Figura 27C**); esta cantidad fue escogida por ser la última en mostrar una señal contundente en el experimento anterior. Con las 4 diluciones empleadas es posible observar una señal específica correspondiente a la detección de la proteína de interés. En conjunto, estos resultados permiten afirmar que las IgY  $\alpha$ -6xHis-SUMO-*TcNdt2* presentes en los sueros inmunes son capaces de reconocer de manera específica a 50 ng de recombinante en una dilución hasta de 1:20000, convirtiéndose en una valiosa herramienta para el estudio de la proteína del parásito.

Es importante resaltar la alta cantidad de IgY producidas, pues se obtuvieron alrededor de 8,0 mL de suero inmune que puede emplearse en altas diluciones, corroborando la alta productividad del sistema aviar; además, estos resultados están en concordancia con lo reportado en trabajos donde se ha empleado una estrategia metodológica similar<sup>169</sup>.



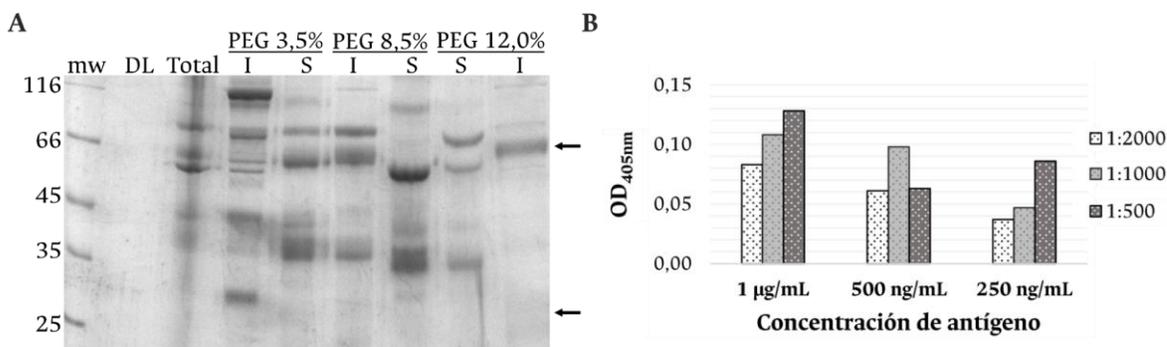
**Figura 27.** Caracterización de los sueros  $\alpha$ -6xHis-SUMO-*TcNdt2* provenientes de sangrías de la gallina inoculada. **A**, evaluación del reconocimiento de 200 ng de 6xHis-SUMO-*TcNdt2* por parte de S.NR: suero no relacionado; S.PI: suero pre-inmune; S.2: suero sangría 2; S.3: suero sangría 3; S.4: suero sangría 4 y S.5: suero sangría 5; todos en dilución 1:5000. **B**, evaluación de la concentración mínima de reconocimiento de 6xHis-SUMO-*TcNdt2* empleando S.2 en dilución 1:5000. **C**, evaluación de máxima dilución de S.2 capaz de reconocer 50 ng de proteína recombinante. Inmunodetección en membrana de nitrocelulosa; anticuerpo 2° (1:10000)  $\alpha$ -*chicken* acoplado a fosfatasa alcalina.

En paralelo, se realizó la caracterización de las IgY  $\alpha$ -6xHis-SUMO-*TcNdt2* presentes en las yemas de huevos colectados a lo largo del esquema de inoculación. Inicialmente se adelantó la purificación a pequeña escala de las inmunoglobulinas contenidas en 33 huevos provenientes de la gallina inmunizada, para ello se realizaron sucesivas precipitaciones con PEG6000, y el proceso fue monitoreado mediante SDS-PAGE,

cargando proteínas presentes en cada una de las fracciones obtenidas del huevo #14 (**Figura 28A**).

En el SDS-PAGE es evidente que durante la deslipidación ocurre una pérdida mínima de proteína. En la fracción correspondiente a proteínas totales se observan pocas bandas al compararlas con las siguientes fracciones. Esto podría atribuirse a que las proteínas se habrían concentrado en las diferentes fracciones durante los siguientes pasos de precipitación, volviéndose más visibles en el gel. Al finalizar el proceso, en la fracción insoluble de la precipitación hecha con PEG6000 12%, se ve el enriquecimiento en bandas correspondientes a las cadenas pesada (~66 kDa) y liviana (~27 kDa) de las IgY, lo cual es resaltado con flechas negras<sup>133</sup>

El proceso de depuración de proteínas contaminantes es apreciable en las fracciones insoluble de la precipitación con 3,5% de PEG6000 y en las solubles de las realizadas al 8,5 y 12,0%, lo que muestra que este método resulta apropiado para la obtención de las IgY de interés. Si bien la última fracción está enriquecida en inmunoglobulinas, en el gel es clara la presencia de otras proteínas, como es el caso de la banda observada la altura de 35 kDa, que es atribuible al precursor de la vitelogenina II<sup>170</sup>.

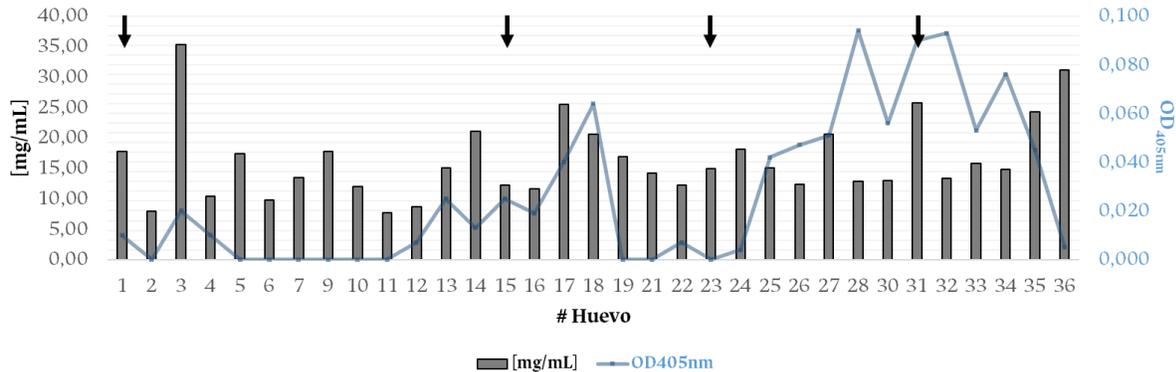


**Figura 28.** Purificación de IgY y determinación de condiciones óptimas de ELISA. **A**, monitoreo de precipitaciones sucesivas con PEG6000. Las flechas negras indican las cadenas pesada (~66 kDa) y liviana (~27 kDa) de las IgY; DL: fracción deslipidada; I: fracción insoluble; S: fracción soluble. **B**, estandarización de condiciones de reconocimiento mediante ELISA indirecto, evaluando 3 concentraciones de 6xHis-SUMO-TcNdt2 con diferentes diluciones de IgY provenientes del huevo #30, indicadas en la convención.

Con el fin de monitorear la cantidad de proteína obtenida en la fracción final enriquecida en IgY, para cada uno de los 33 huevos se llevó a cabo la cuantificación mediante espectrofotometría (IgY totales). En simultáneo, se adelantó la titulación de los anticuerpos específicos, para ello, se hizo un ELISA preliminar que permitió determinar que las mejores condiciones de reconocimiento serían una concentración de antígeno de 1µg/mL y una dilución de anticuerpo 1:500 (**Figura 28B**), ya que arrojan la señal más fuerte. Con las condiciones establecidas se procedió a identificar cuales huevos presentan el mayor contenido de IgY específicas, para conseguirlo se realizó un ELISA indirecto con las

fracciones enriquecidas provenientes de todas las yemas. En la **Figura 29** se presenta la cuantificación y titulación de las fracciones analizadas.

No se observa una tendencia de la concentración de proteína (barras grises) para las fracciones de cada huevo durante el período monitoreado, lo cual podría atribuirse a (1) variación en la cantidad de proteína total presente en las yemas de huevo, (2) cambios particulares entre las muestras a lo largo del proceso de purificación y (3) variaciones en el contenido de IgY en las yemas, producto de adaptaciones al medio (bioterio) que estimulan en sistema inmunológico, debido a que, si bien los máximos de concentración de proteína no corresponden con los máximos de reconocimiento específico determinados mediante el ELISA (línea azul), debe tenerse en cuenta que el sistema inmune de la gallina se enfrenta a un amplio espectro de agentes antigénicos, y no solo a la proteína recombinante inoculada, por lo que estas variaciones en la concentración de proteína no pueden relacionarse directamente con el esquema de inmunización.



**Figura 29.** Monitoreo de la producción de IgY  $\alpha$ -6xHis-SUMO-*TcNdt2*. Para cada fracción de IgY parcialmente purificada se determinó 1) concentración en mg/mL, mostrada en barras grises, y 2) la señal específica de reconocimiento obtenida en el ELISA mostrada con la línea azul claro. Las flechas negras indican los días de inoculación.

Al analizar la curva del ELISA (reconocimiento específico de IgY), es evidente un incremento en la respuesta inmune después del tercer y cuarto refuerzo, lo cual se refleja en los huevos 28, 30, 31, 32, 33 y 34, en los que se ve una señal más intensa y mantenida. La generación de IgY en modelo aviar presenta un perfil dependiente de factores como la edad de las gallinas, tipo de antígeno, periodos entre inoculaciones, entre otros; perfiles similares se han documentado en un nuestro grupo en la generación de IgY para otras proteínas<sup>131</sup>.

De estos 6 huevos mencionados se hizo la purificación parcial de IgY a gran escala a partir de las proteínas totales almacenadas, y la cantidad de proteínas totales y de proteínas presentes en la fracción final de IgY fue cuantificada para el huevo 31. Se determinó que la cantidad total de proteínas de la yema de este huevo era de 2,8 g, lo que concuerda con los reportes de 2,5 a 3,4 g de proteína por yema<sup>171</sup>; para el caso de la fracción final de IgY, se encontró una cantidad de 0,37 g. Para yemas de huevo se ha reportado un contenido de IgY's de entre 18 a 25 mg por mL, y teniendo en cuenta que en los huevos procesados

había aproximadamente un volumen de yema de 20 mL, entre 0,36 y 0,45g de IgY's habrían estado en la yema de trabajo<sup>132,134,168</sup>.

Finalmente, para evaluar la especificidad del anticuerpo generado mediante ensayos de reconocimiento cruzado con los candidatos disponibles, se realizó un *western blot* empleando las proteínas recombinantes *TcNdt1* y *TcNdt2* en el sistema MISTIC (datos no mostrados); a partir de lo cual, se estableció que las IgY producidas reconocen únicamente a *TcNdt2*. Esto puede corresponder con un análisis entre estos 2 transportadores que arrojó un 43,4% de identidad, y se considera inferior al requerido para que se de el reconocimiento cruzado, que se ha propuesto existe cuando hay más del 50-70% de identidad<sup>172</sup>.

### 6.8.3 Detección de la proteína endógena mediante *western blot* e inmunofluorescencia

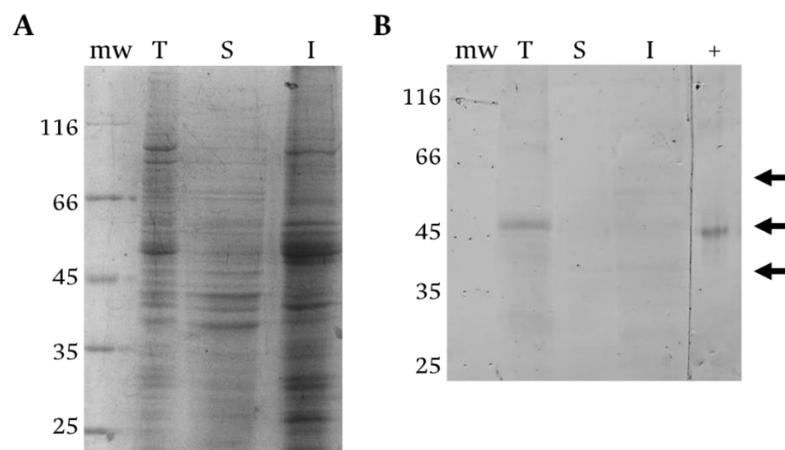
Para llevar a cabo la detección de *TcNdt2*, inicialmente se obtuvieron extractos de proteínas totales de epimastigotes de *T. cruzi*, al igual que fracciones de proteínas soluble e insoluble; estas dos últimas se consiguieron sometiendo a los parásitos a lisis hipotónica y separando las fracciones mediante centrifugación. En paralelo, las IgY producidas fueron purificadas por afinidad, se inmovilizó el antígeno en una membrana de nitrocelulosa, y se incubó con las IgY permitiendo su unión, posteriormente, llevar a cabo la elución de las inmunoglobulinas empleando buffer Tris-HCl a un pH 2,5, según lo descrito en el apartado metodológico.

Haciendo uso de las IgY purificadas a partir de suero, se llevó a cabo la detección sobre los extractos de proteína de *T. cruzi*, se observa el perfil de bandas de las fracciones obtenidas (**Figura 30A**), y la inmunodetección de la *TcNdt2* endógena (**Figura 30B**); igualmente se realizaron ensayos con IgY purificadas a partir de yema de huevo, y se observó un reconocimiento similar, no obstante, aquellas provenientes de suero mostraron las señales más intensas.

El peso esperado de la *TcNdt2* endógena corresponde a 35 kDa, y una banda de este peso es reconocida en la inmunodetección en la fracción de proteínas insolubles, al igual que otras 2 bandas de peso mayor (señaladas con flechas negras); adicionalmente, el hecho de que el reconocimiento se esté dando sobre la fracción insoluble corresponde con la naturaleza hidrofóbica característica de las proteínas transportadoras<sup>164</sup>. De manera interesante, en la fracción de proteínas totales, la banda cercana a 45 kDa se reconoce con mayor intensidad.

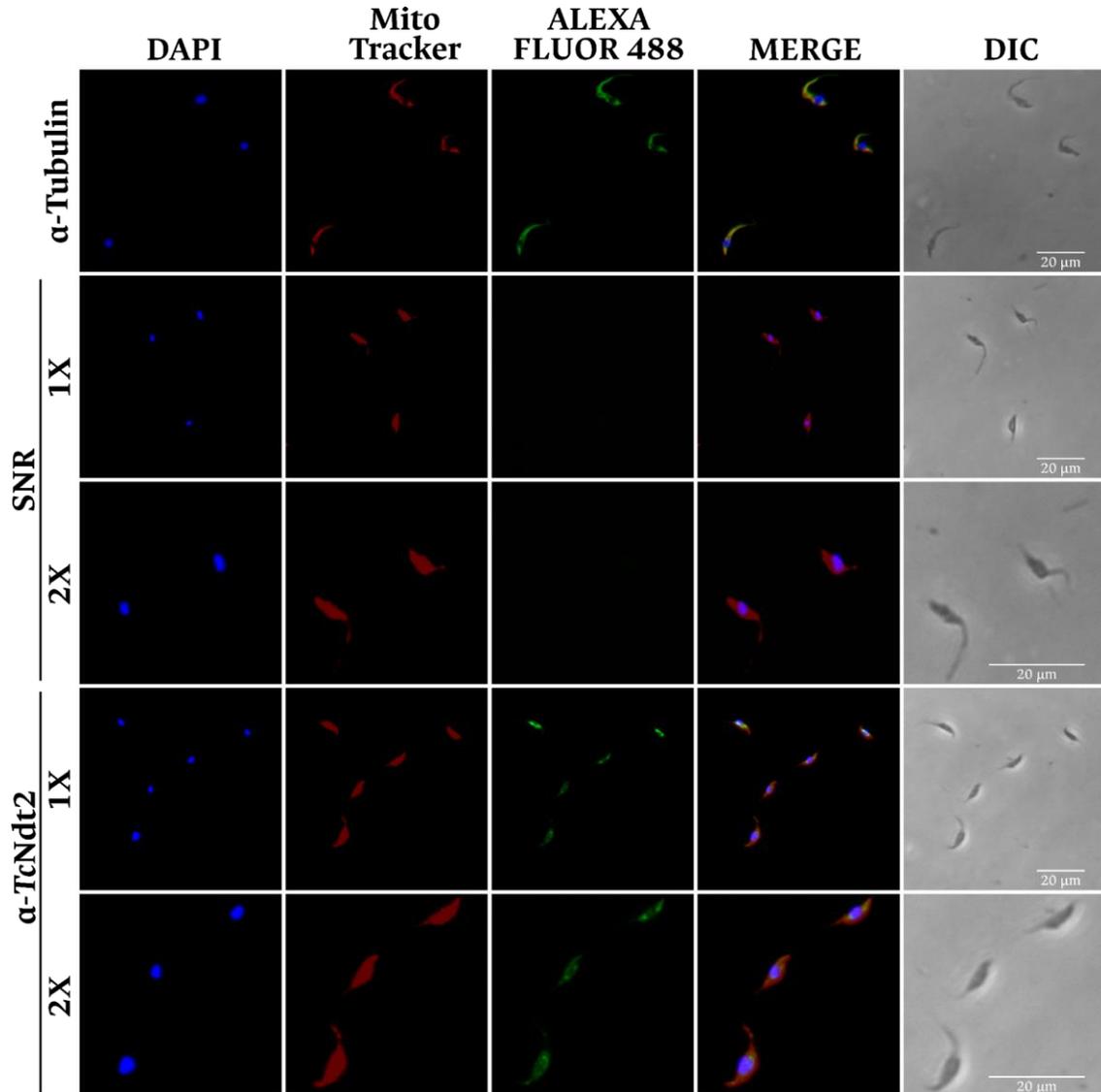
Las bandas de superior peso detectadas en el *western blot* (señaladas con flechas negras) bien podrían atribuirse a inespecificidad del anticuerpo, aunque también podrían corresponder a formas de la *TcNdt2* endógena modificadas postraduccionalmente. Como se ha discutido a lo largo de este texto, algunas proteínas de esta familia modulan su actividad al ser blanco de modificaciones como acetilación, fosforilación y glicosilación, e interesantemente, algunas de ellas corresponden a transportadores de nucleótidos<sup>43,44,46</sup>;

estas modificaciones pueden aumentar el peso de la proteína, llevando a que en la migración electroforética aparezcan señales en bandas de mayor peso molecular. Teniendo en cuenta lo anterior, el resultado obtenido podría derivar de un fenómeno similar de modificación postraducciona, sin embargo, sería necesaria más evidencia experimental para corroborar esta posibilidad; con tal fin, podría tratarse los extractos celulares con N y/u O-glicosidasas, y evaluar las variaciones en el perfil electroforético.



**Figura 30.** Evaluación de la presencia de la *TcNdt2* endógena en extractos de proteína de *T. cruzi*. **A**, visualización del perfil proteico de fracciones totales (T), soluble (S) e insoluble (I) mediante SDS-PAGE al 12% (120 mV/55 min) y tinción con azul de Coomassie. **B**, inmunodetección por *western blot* en membrana de nitrocelulosa de la proteína endógena de *T. cruzi*; +, 6xHis-SUMO-*TcNdt2*; anticuerpos 1° IgY  $\alpha$ -6xHis-SUMO-*TcNdt2* purificadas por afinidad (1:250), y 2°  $\alpha$ -*chicken* acoplado a fosfatasa alcalina (1:10000).

Como paso final, se llevó a cabo la inmunofluorescencia sobre epimastigotes de *T. cruzi* con el fin de determinar la localización del transportador (**Figura 31**). En la detección de *TcNdt2* se emplearon las IgY específicas purificadas por afinidad, y las mitocondrias y ácidos nucleicos se marcaron con MitoTracker (rojo) y DAPI (azul), respectivamente; como control positivo se empleó el anticuerpo  $\alpha$ -*Tubulin*, ya que esta es una proteína constitutiva del parásito<sup>173,174</sup>, y como control negativo, se empleó un suero inmune no relacionado (SNR) proveniente de la gallina control. Para obtener una señal fluorescente correspondiente a las proteínas de interés, se emplearon como sondas los anticuerpos  $\alpha$ -*mouse*-ALEXA488 y  $\alpha$ -*chicken*-ALEXA488, cuyos fluoróforos emiten color verde al ser excitados a una longitud de onda de 495nm<sup>175</sup>.



**Figura 31.** Inmunodetección de la *TcNdt2* endógena mediante microscopía de fluorescencia en epimastigotes de *T. cruzi*. Anticuerpos primarios: IgG  $\alpha$ -*Tubulin* (desarrollado en ratón), control positivo, dilución 1:1000; IgY SNR, suero no relacionado, control negativo, dilución 1:1000; IgY  $\alpha$ -*TcNdt2*, purificados por afinidad, dilución 1:250. Anticuerpos secundarios:  $\alpha$ -*mouse*-ALEXA488 y  $\alpha$ -*chicken*-ALEXA488, dilución 1:1000. Mitocondrias y ácidos nucleicos marcados con MitoTracker y DAPI, respectivamente. MERGE, superposición. DIC, contraste. Visualización en microscopio EVOS M5000 (Thermo), objetivo 100x.

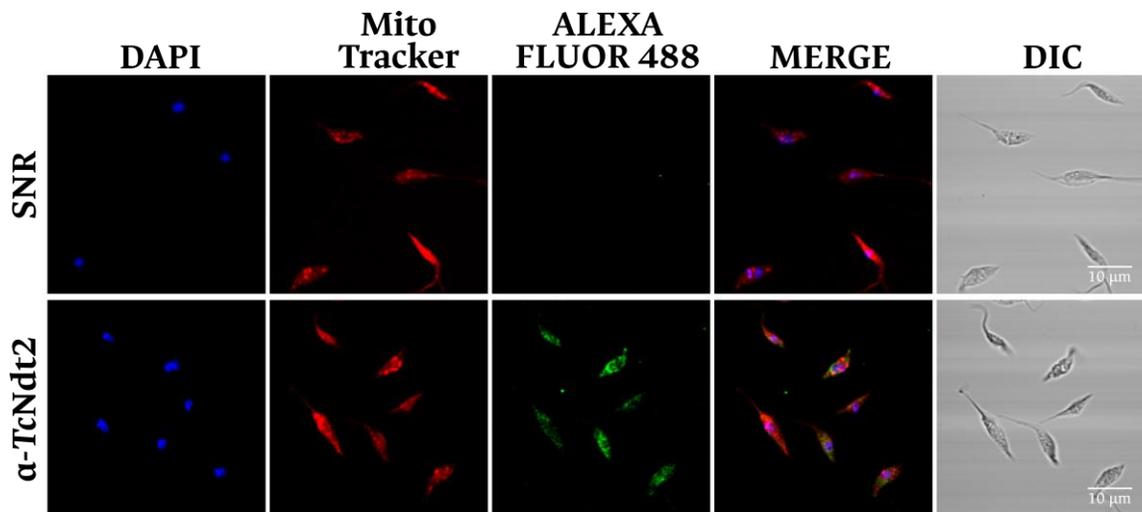
Para el control positivo se observa una buena señal con el DAPI, al igual que para el MitoTracker, y se aprecia que prácticamente la totalidad de parásito es detectada con el anticuerpo  $\alpha$ -*Tubulin*, lo que se espera al tratarse de una proteína que está presente a lo largo de toda la célula<sup>174</sup>. El color amarillo que se ve en la superposición indica la co-localización de la proteína detectada con la mitocondria, e igualmente, se aprecia que algunas partes de las células mantienen la señal verde, principalmente en el flagelo, indicando que la mitocondria no se extiende por la totalidad de la célula.

---

En el control negativo es posible apreciar con el DAPI la tinción de 2 elementos circulares independientes, que corresponden a 2 agregados de DNA, el núcleo y el kinetoplasto<sup>176</sup>, y al igual que en el control positivo, el MitoTracker muestra una señal que recorre gran parte de la célula, pero no su totalidad; en cuanto al control negativo, y como es de esperar, ninguna señal es detectada en el canal de fluorescencia verde, debido a que los anticuerpos empleados en este tratamiento no tendrían afinidad por las proteínas presentes en los parásitos.

En el tratamiento de detección del transportador, con el DAPI también se distinguen el núcleo y kinetoplasto, y con el MitoTracker se aprecia la mitocondria del parásito. Empleando las IgY  $\alpha$ -TcNdt2 se detecta una proteína que se distribuye en forma particulada en el citoplasma de *T. cruzi*. Al hacer la superposición con las demás sondas, se aprecia parcialmente posible co-localización del transportador en la mitocondria; lo cual se apoya con las predicciones bioinformáticas que ubican estas proteínas en varios organelos (mitocondria y glicosoma).

Con el fin de ahondar en este aspecto, se realizó una nueva inmunofluorescencia sobre epimastigotes de *T. cruzi* y se empleó microscopía confocal para observar con mayor detalle la distribución de TcNdt2 (**Figura 32**). Se aprecia nuevamente que las sondas del DAPI y el MitoTracker muestran señales de buena calidad en ambos tratamientos; por su parte, las IgY  $\alpha$ -TcNdt2 muestran una señal atribuible a la proteína transportadora, y, para el caso de las IgY no relacionadas (SNR), no se ve señal correspondiente al reconocimiento de una proteína del parásito. Este experimento permite distinguir que en realidad la TcNdt2 endógena no co-localiza con la mitocondria, sino que se distribuye a lo largo de la célula, con una mayor intensidad en las regiones próximas al núcleo; un comportamiento similar al observado se ha documentado en proteínas que participan en las dinámicas de tráfico vesicular<sup>177</sup>, al igual que en las peroxinas PEX3 y PEX11 de *T. brucei*<sup>178</sup> lo cual sugiere una posible localización en el glicosoma, pues muchas de las proteínas constituyentes del organelo pasan por esta vía. Esto podría asociarse con las predicciones bioinformáticas llevadas a cabo, pues estas arrojaron una posible localización en mitocondria o glicosomal.



**Figura 32.** Inmunodetección de la *TcNdt2* endógena mediante microscopía confocal en epimastigotes de *T. cruzi*. Anticuerpos primarios: IgY SNR, suero no relacionado (control negativo, dilución 1:1000); IgY  $\alpha$ -TcNdt2 (purificados por afinidad, dilución 1:250). Anticuerpo secundario  $\alpha$ -chicken-ALEXA488, dilución 1:1000. Mitocondrias y ácidos nucleicos marcados con MitoTracker y DAPI, respectivamente. MERGE, superposición. DIC, contraste. Visualización en microscopio confocal, objetivo 200x.

## 6.9 Aproximación a la expresión del ED de la RVG en el sistema eucariota *S. cerevisiae*

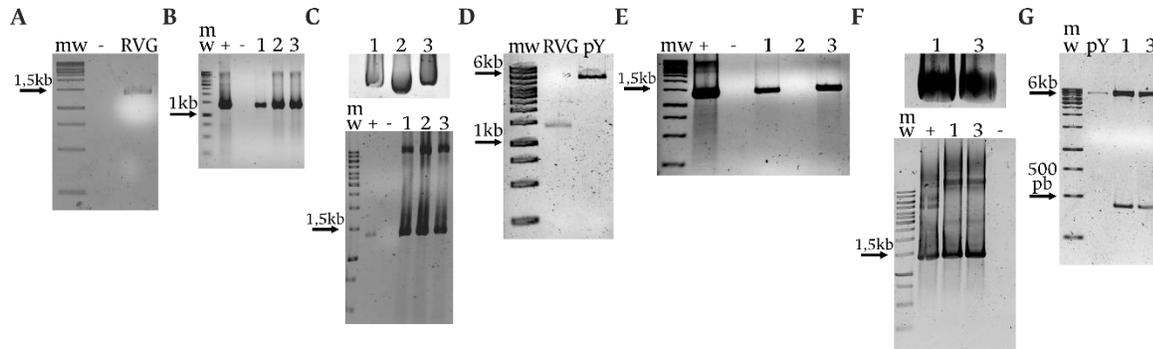
El siguiente apartado constituye un componente adicional al proyecto inicialmente planteado, y se adjunta ya que se considera pertinente porque permite extrapolar el uso del sistema eucariota de *S. cerevisiae* empleado en este trabajo. Esta aproximación surgió como necesidad de buscar alternativas para la producción del antígeno principal (el ED de la RVG) de la vacuna contra el virus de la rabia, y fue parte del desarrollo experimental durante esta maestría.

En términos generales, el objetivo de este apartado fue expresar el ectodominio (ED) de la RVG como una recombinante en este sistema eucariota *S. cerevisiae*; se realizó la construcción del vector pYES2-RVG, la transfección de células de cepa INVSc1 de expresión, seguido del análisis de los extractos de proteína y la inmunodetección empleando IgY específicas producidas previamente, a continuación, se muestran detalladamente estos resultados.

### 6.9.1 Construcción del vector recombinante pYES2-RVG

Siguiendo la estrategia de sub-clonación adelantada en este trabajo, se construyó el plásmido recombinante pYES2-RVG a partir del pET30-RVG, con el cual es posible inducir la expresión del ED de la RVG (**Figura 33**). Empleando *primers* específicos se amplificó por PCR el fragmento de interés, obteniendo una única banda del peso esperado (1320 pb) (**Figura 33A**). Este producto fue ligado en el vector pGEM-T-Easy/TA y con la reacción,

se transformaron *E. coli* TOP10 mediante choque térmico; las transformantes se rastrearon por PCR de colonia (**Figura 33B**), y de aquellas positivas, se extrajo el plásmido por lisis alcalina, y el mismo se evaluó por PCR (**Figura 33C**).



**Figura 33.** Generación del pYES2-RVG mediante sub-clonación. **A**, amplificación del ED (1320pb) por PCR. **B**, rastreo por PCR de colonias transformantes con el vector pGEM-T-RVG. **C**, arriba, plásmidos pGEM-T-RVG extraídos por lisis alcalina; abajo, PCR de plásmido. **D**, liberación del inserto RVG y linealización del vector pYES2 vacío (pY, 5857pb) mediante restricción enzimática con EcoRI y HindIII. **E**, rastreo de transformantes mediante PCR de colonia. **F**, arriba, extracción de plásmido pYES2-RVG mediante lisis alcalina; abajo, PCR de plásmido. **G**, digestión enzimática del pYES2 vacío (pY) y pYES2-RVG (1 y 3) con BamHI y HindIII. Electroforesis en gel de agarosa en TBE al 1,0 % (90 mV/55 min); mw, marcador de peso molecular; +/-, controles positivo/negativo de PCR; tinción con bromuro de etidio.

Mediante doble digestión enzimática con EcoRI y HindIII se liberó el inserto de interés (a partir de pGEM-T-RVG), y se linealizó el pYES2-vacío, generando así los extremos cohesivos requeridos para la correcta inserción del ED en el vector de expresión (**Figura 33D**); en este caso el inserto se purificó de banda, mientras que la reacción del pYES2 linealizado se incubó a 80°C/20 minutos para inactivar las enzimas de corte. Con los dos productos obtenidos, se llevó a cabo una nueva reacción con el objetivo de generar el pYES2-RVG; con esta ligación se transformaron *E. coli* TOP10, y las colonias se evaluaron por PCR (**Figura 33E**). Los plásmidos pYES2-RVG fueron extraídos por lisis alcalina a partir de las colonias positivas, y de igual manera la presencia del inserto se corroboró por PCR (**Figura 33F**).

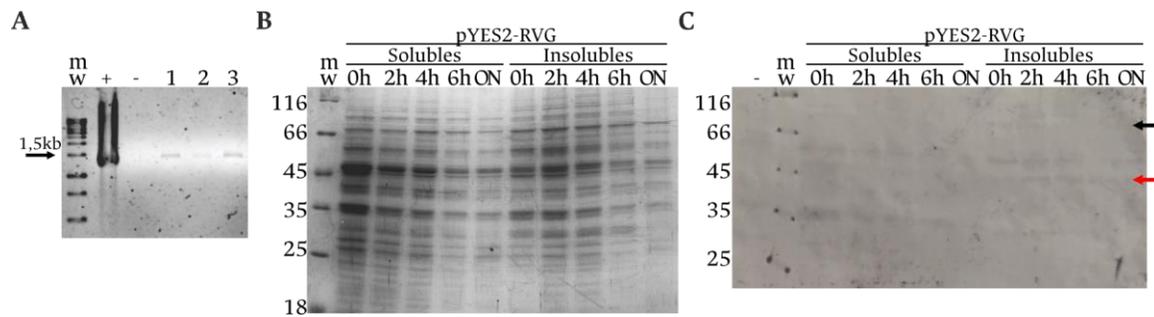
Los clones pYES2-RVG obtenidos fueron digeridos con las enzimas BamHI y HindIII con el fin de evaluar su identidad, y en simultáneo se hizo el mismo proceso con el pYES2-vacío (**Figura 33G**). En este ensayo se observa que para los plásmidos construidos se obtiene un perfil de 2 bandas (de 434 y 6706 pb) característico del pYES2-RVG, mientras que para el pYES2-vacío, se genera una banda de 5857 pb debido a que este plásmido solo posee sitio de corte para HindIII. Los resultados presentados permitieron confirmar la construcción del pYES2-RVG, y con el mismo se procedió a evaluar la expresión de la proteína en el sistema eucariota.

### 6.9.2 Evaluación de la expresión del ED de la RVG recombinante en *S. cerevisiae* INVSc1

Con el vector de expresión generado y el pYES2-vacío, se transfectaron *S. cerevisiae* de la cepa de expresión INVSc1, siguiendo el método de LiAc/ssDNA/PEG3350 y choque térmico empleado previamente; las transfectantes se evaluaron por PCR de colonia (**Figura 34A**), en donde las 3 muestras seleccionadas arrojaron un amplificado del peso esperado del fragmento ED, lo cual permitió confirmar la toma del plásmido por parte de las levaduras (con el pYES2-vacío no fue posible hacer esta confirmación). A partir de las transfectantes positivas se hicieron criopreservados en glicerol 15%, y se almacenaron a -80°C.

A partir de los criopreservados, se hicieron inóculos de las transfectantes y se llevó a cabo el proceso de inducción de expresión del ED (48 kDa) de la RVG, evaluando diferentes tiempos (**Figura 34B y C**). Los protocolos de lisis de levaduras implican el uso de enzimas como la zimoliasa, de pequeñas perlas de vidrio, o de equipos e infraestructura especializada<sup>179-181</sup>. En este caso, no se contaba con ninguno de estos insumos, que de haberlos solicitado habrían implicado una inversión importante de tiempo (espera en la importación) y de recursos económicos, por lo tanto, se optó por implementar y estandarizar un protocolo en que se aprovecha los recursos disponibles en el laboratorio, y que una vez establecido, es sencillo, es reproducible, y costo-eficiente<sup>140</sup>. En la **Figura 34A** se observa el perfil de expresión del SDS-PAGE, el proceso de lisis fue efectivo y permitió obtener proteínas tanto en la fracción soluble, como en la insoluble.

Tras la inmunodetección con las IgY  $\alpha$ -RVG, en la fracción de proteínas insolubles se aprecia una señal diferencial a la altura de los 45 kDa (flecha roja), que aparece desde las 2 horas de inducción, y se mantiene en los demás tiempos evaluados; esta banda es atribuida a la expresión del fragmento de la RVG clonado, cuyo peso esperado es de 48 kDa y aparece tras cambiar a medio de inducción con galactosa y rafinosa. Otras bandas promisorias corresponden a las insolubles observadas a la altura de 66 kDa (flecha negra) en los tiempos de 2 y 4 horas; aunque su peso sea superior al esperado, esto no sería atípico, debido a que el ED de la RVG es blanco de glicosilaciones<sup>84,91</sup>, y el sistema *S. cerevisiae* cuenta con la maquinaria requerida para realizar esta modificación, por lo que no se descarta que las bandas correspondan a versiones modificadas. Si bien otras bandas arrojan una señal en el *western blot*, estas lo hacen desde el tiempo de 0 horas, indicando que corresponden a proteínas propias de las levaduras que logran ser reconocidas por las IgY producidas. También es de resaltar que, a pesar de que en el control negativo se da la detección de algunas bandas, esto sucede de forma tenue, y de igual manera, estas no coinciden con las bandas atribuidas al fragmento de interés de la RVG.



**Figura 34.** Generación de transfectantes con pYES2-RVG y evaluación de la inducción de expresión del ED (48 kDa) en *S. cerevisiae*. **A**, monitoreo de transfección de células INVSc1 de *S. cerevisiae* mediante PCR de colonia. Electroforesis en gel de agarosa en TBE al 1,0 % (90 mV/55 min); mw, marcador de peso molecular de 1kb; tinción con bromuro de etidio. **B**, perfil proteico a lo largo del proceso de inducción de expresión en células *S. cerevisiae* transfectadas con pYES2-RVG. SDS-PAGE 12% (120 mV/55 min); mw, marcador de peso molecular; tinción con azul de Coomassie. **C**, inmunodetección mediante *western blot* en membrana de nitrocelulosa del ED recombinante inducido; -, extracto de proteínas insolubles de *S. cerevisiae* transfectadas con pYES2-vacío e inducidas 6 horas; anticuerpos 1° IgY  $\alpha$ -RVG (1:3500), y 2°  $\alpha$ -chicken acoplado a fosfatasa alcalina (1:10000).

Teniendo en cuenta los resultados presentados, se puede afirmar que se consiguió inducir la expresión del ED de la RVG en el sistema eucariota *S. cerevisiae*, no obstante, el proceso de inducción de la expresión debe ser optimizado. Factores como el tiempo de inducción, temperatura, los volúmenes de cultivo, concentraciones de inductor, y metodologías de lisis celular deben estandarizarse para alcanzar niveles de proteína más elevados, al igual que deben mejorarse las condiciones de inmunodetección con las IgY empleadas, con el fin de eliminar artefactos presentes en el *western blot*. Los clones obtenidos constituyen un paso inicial para la obtención de esta glicoproteína empleando un sistema eucariota de bajo costo.

# 7. Conclusiones y recomendaciones

## 7.1 Conclusiones

En este trabajo se abordó el estudio de 3 candidatos a transportador de NAD<sup>+</sup> de *T. cruzi*, denominados *TcNdt1*, *TcNdt2* y *TcNdt3*, empleando herramientas bioinformáticas y experimentales.

Se corroboró la identidad funcional de *TcNdt1* y *TcNdt2* como transportadores de NAD<sup>+</sup> de *T. cruzi* mediante ensayos de complementación en mutantes ( $\Delta ndt1$  y  $\Delta ndt2$ ) de *S. cerevisiae*, donde los constructos reestablecieron el crecimiento de las células en medio no fermentable.

De manera complementaria, se generaron los insumos requeridos para la implementación del sistema MISTIC en *E. coli*, proyectado a ser una plataforma alterna para la evaluación funcional de transportadores. Se construyeron vectores que permitieron la expresión de *TcNdt1*, *TcNdt2*, *AtNdt2*, *ScNdt1* y *ScNdt2* unidos a la proteína fusión MISTIC; empleando a *ScNdt1* y líneas control se establecieron condiciones de ensayos piloto de transporte indirecto del dinucleótido.

Se determinó la distribución subcelular del transportador *TcNdt2* en epimastigotes de *T. cruzi*, la cual presenta un patrón similar al observado para proteínas implicadas en dinámicas de tráfico vesicular, posiblemente glicosomales, empleando la herramienta inmunológica generada.

Por bioinformática se encontró que *TcNdt1* y *TcNdt2* son miembros de la MCF que presentan características de esta familia como el tamaño, la distribución de dominios repetitivos, y las estructuras secundaria y terciaria; también se determinó la posible interacción con el ligando, encontrando similitud con lo reportado para sus ortólogos. En la secuencia *TcNdt3* se encontró una duplicación en el número de elementos estructurales, constituyendo un miembro atípico de la MCF. De manera complementaria, se identificó que corresponderían a proteínas mitocondriales o glicosomales, y que podrían ser blanco de modificaciones postraduccionales.

Este trabajo constituye un primer acercamiento al estudio de estos transportadores de NAD<sup>+</sup> en el protozoo *T. cruzi*, aportando elementos para la dilucidación de las interacciones parásito-hospedero, concretamente los implicados en la dinámica de transporte de metabolitos esenciales, lo que es relevante teniendo en cuenta la

simplificación metabólica que han sufrido las formas de vida parasitarias. Lo anterior se hace pertinente en la búsqueda de estrategias de control alternas.

## 7.2 Perspectivas

A continuación, se presentan distintas apreciaciones que derivan del desarrollo de este trabajo, dirigidas a proponer metodologías alternas o complementarias a las ya empleadas, que permitan ahondar en las dinámicas del transporte del NAD<sup>+</sup> de este parásito, y que de igual manera lleven a robustecer las estrategias experimentales y de análisis utilizadas.

La evaluación funcional llevada a cabo con los mutantes  $\Delta ndt1$  y  $\Delta ndt2$  de *S. cerevisiae* permitió corroborar la actividad transportadora de NAD<sup>+</sup> de *TcNdt1* y *TcNdt2*, sin embargo, el uso de la línea doble mutante  $\Delta ndt1\Delta ndt2$  es el estándar en la caracterización de transportadores de NAD<sup>+</sup> por ensayos de complementación, y por lo tanto se propone su uso futuro, con el fin de dar más contundencia a este resultado. Para conseguir esta línea doble mutante se requiere de una plataforma de biología molecular especializada que permite el silenciamiento dirigido de genes de interés; si bien no se descarta el desarrollo de la misma en el grupo de investigación, también se tiene como posibilidad el establecimiento de colaboraciones con otros grupos de investigación que ya cuentan con estas levaduras.

De manera promisorio, se observó que el sistema de la proteína fusión MISTIC en *E. coli* podría emplearse para la caracterización de secuencias transportadoras, aunque presenta limitaciones en los métodos de cuantificación; por lo tanto, se sugiere que en futuros experimentos se implementen métodos más sensibles y reproducibles, como lo son la marcación radioactiva, o la producción de compuestos fluorescentes a partir del NAD<sup>+</sup> (lo que aumenta su detectabilidad) por medio de ciclación, con el fin de robustecer esta novedosa aproximación, y poder aplicarla en la identificación de nuevos transportadores, al igual que en la corroboración de la actividad de *TcNdt1* y *TcNdt2*.

En la inmunodetección de *TcNdt2* sobre extractos y epimastigotes de *T. cruzi* se obtuvieron resultados que indicaron que se trata de una proteína posiblemente glicosomal, no obstante, a nivel de *western blot* se vieron múltiples señales al momento de emplear las IgY producidas, esto podría deberse a inespecificidad de los anticuerpos o a la presencia de modificaciones postraduccionales que alteran la migración electroforética; para dar claridad al respecto, se propone: generar anticuerpos a partir de los péptidos más antigénicos del transportador; obtener anticuerpos monoclonales que sean más específicos; y estudiar la presencia de modificaciones postraduccionales en la proteína endógena. También sería valioso determinar la localización del transportador *TcNdt1*, y estudiar posibles fenómenos de expresión diferencial, bien sea en sus organelos o en los estadios del ciclo de vida.

Con respecto al candidato *TcNdt3*, este mostró particularidades que lo ubican como un miembro atípico de la MCF, una caracterización bioinformática más profunda de esta

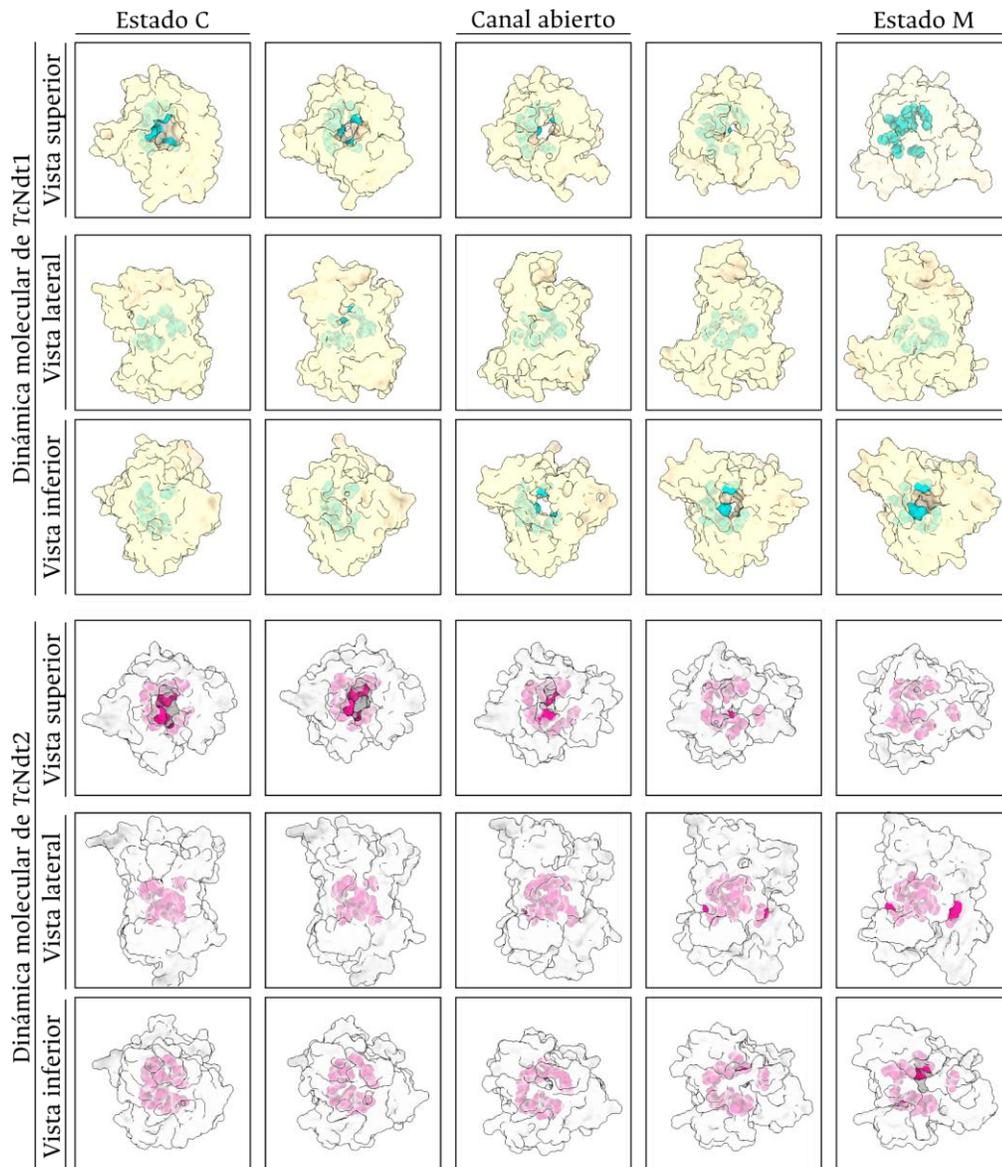
secuencia en la que se integren más herramientas de análisis, permitirían proponer una actividad para la proteína, y, asimismo, aportarían un marco de referencia para definir una estrategia idónea para abordar su estudio experimental.

Por último, la obtención del ED de la RVG en *S. cerevisiae* se muestra como una promisorio alternativa para la generación del principal antígeno presente en la vacuna antirrábica, sin embargo, se requiere la optimización tanto del proceso de inducción de la expresión, como del de inmunodetección, al igual que establecer el escalamiento de la producción de este insumo biotecnológico en fermentadores.



# A. Anexo: Modelación de dinámica molecular de *TcNdt1* y *TcNdt2*

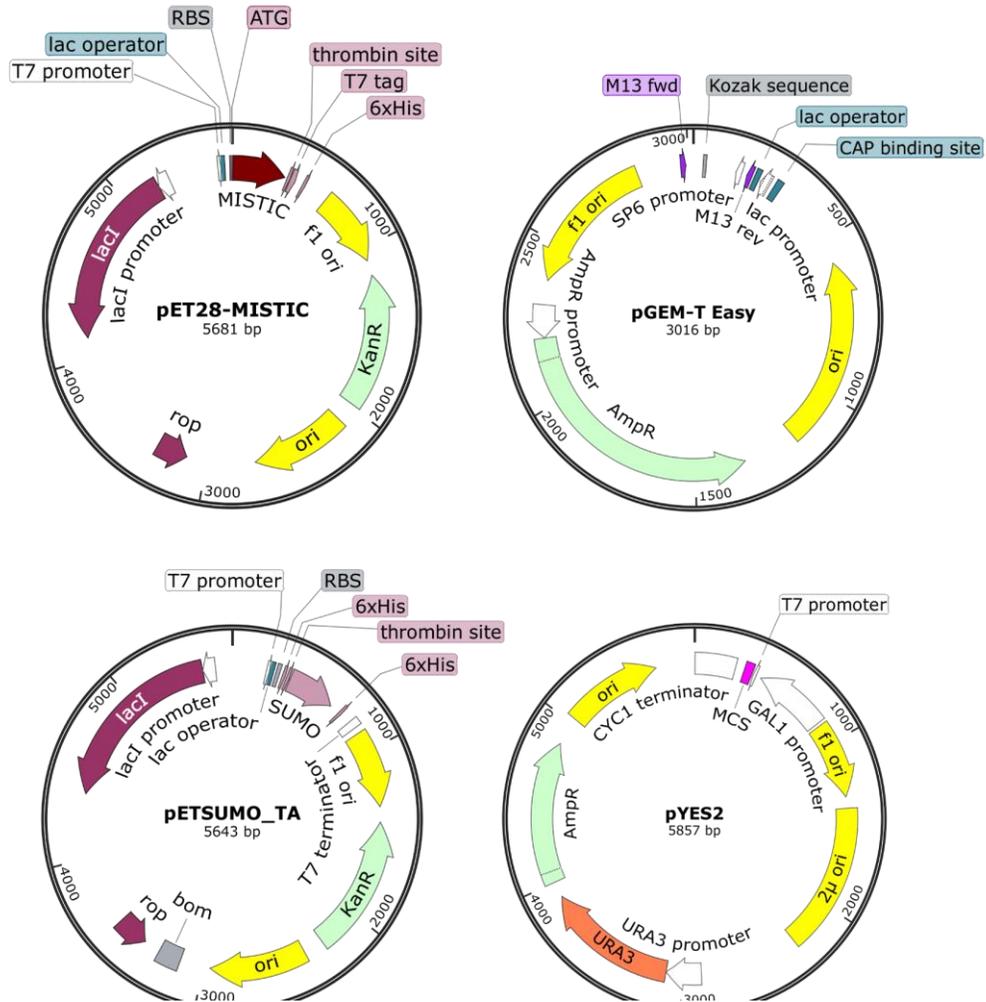
Cambios conformacionales entre los estados C y M predichos para los transportadores de  $\text{NAD}^+$  de *T. cruzi*. En esferas azules y rosadas se señalan los residuos que interactúan con el ligando predichos por el *docking* molecular para *TcNdt1* y *TcNdt2*, respectivamente. En la parte superior se señala la conformación que tienen las proteínas (los que no tienen leyenda corresponden a estados intermedios), en el lateral izquierdo se indica el transportador y la vista. Se resalta que los residuos del bolsillo polar indicados están expuestos y disponibles tanto en estado C como en estado M.





## B. Anexo: Mapas de los plásmidos empleados

A partir de los siguientes plásmidos se generaron los diferentes constructos recombinantes empleados en este trabajo, en este apartado se muestran sus principales características.





## C. Anexo: Lista de plásmidos construidos

En este apartado se muestran los 17 plásmidos recombinantes construidos durante la realización de este trabajo, mediante diferentes estrategias de clonación. Para cada plásmido de expresión generado por sub-clonación se construyó un pGEM-T-Easy, en cada caso se indica entre paréntesis y subrayado el plásmido receptor específico.

Secuencia	Estrategia clonación	Plásmido recombinante	Tipo de plásmido
TcNdt1	T/A	pGEM-T-TcNdt1 ( <u>pYES2</u> )	Mantenimiento
	Sub-clonación	pYES2-TcNdt1	Expresión
	T/A	pGEM-T-TcNdt1 ( <u>pET28</u> )	Mantenimiento
	Sub-clonación	pET28-MISTIC-TcNdt1	Expresión
TcNdt2	T/A	pGEM-T-TcNdt2 ( <u>pYES2</u> )	Mantenimiento
	Sub-clonación	pYES2-TcNdt2	Expresión
	T/A	pGEM-T-TcNdt2 ( <u>pET28</u> )	Mantenimiento
	Sub-clonación	pET28-MISTIC-TcNdt2	Expresión
	T/A	pETSUMO-TcNdt2	Expresión
AtNdt2	T/A	pGEM-T-AtNdt2 ( <u>pET28</u> )	Mantenimiento
	Sub-clonación	pET28-MISTIC-AtNdt2	Expresión
ScNdt1	T/A	pGEM-T-ScNdt1 ( <u>pET28</u> )	Mantenimiento
	Sub-clonación	pET28-MISTIC-ScNdt1	Expresión
ScNdt2	T/A	pGEM-T-ScNdt2 ( <u>pET28</u> )	Mantenimiento
	Sub-clonación	pET28-MISTIC-ScNdt2	Expresión
RVG (ED)	T/A	pGEM-T-RVG ( <u>pYES2</u> )	Mantenimiento
	Sub-clonación	pYES2-RVG	Expresión



## Bibliografía

- (1) Coura, J. R.; Viñas, P. A. Chagas Disease: A New Worldwide Challenge. *Nature* **2010**, *465* (7301), S6-7. <https://doi.org/10.1038/nature09221>.
- (2) Dias, J. C. P.; Schofield, C. J. 3 - Social and Medical Aspects on Chagas Disease Management and Control. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)*; Telleria, J., Tibayrenc, M., Eds.; Elsevier: London, 2017; pp 47–57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00003-4>.
- (3) Rassi, A.; Rassi, A.; Marcondes de Rezende, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2012**, *26* (2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>.
- (4) Rassi, A.; de Rezende, J. M.; Luquetti, A. O.; Rassi, A. 28 - Clinical Phases and Forms of Chagas Disease. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)*; Telleria, J., Tibayrenc, M., Eds.; Elsevier: London, 2017; pp 653–686. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00029-0>.
- (5) Luquetti, A. O.; Schmuñis, G. A. Diagnosis of Trypanosoma Cruzi Infection. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition*; 2017; pp 687–730. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00030-7>.
- (6) Bern, C.; Montgomery, S. P.; Herwaldt, B. L.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A.; Dantas, R. O.; Maguire, J. H.; Acquatella, H.; Morillo, C.; Kirchhoff, L. V.; Gilman, R. H.; Reyes, P. A.; Salvatella, R.; Moore, A. C. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States: A Systematic Review. *JAMA* **2007**, *298* (18), 2171–2181. <https://doi.org/10.1001/jama.298.18.2171>.
- (7) A Higher Level Classification of All Living Organisms <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119248> (accessed 2018 -09 -08).
- (8) Sacks, D.; Sher, A. Evasion of Innate Immunity by Parasitic Protozoa. *Nat. Immunol.* **2002**, *3* (11), 1041–1047. <https://doi.org/10.1038/ni1102-1041>.
- (9) Mansfield, J. M.; Olivier, M. Immune Evasion by Parasites. *Immune Response Infect.* **2011**, 453–469. <https://doi.org/10.1128/9781555816872.ch36>.
- (10) Sibley, L. D. Invasion and Intracellular Survival by Protozoan Parasites. *Immunol. Rev.* **2011**, *240* (1), 72–91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00990.x>.
- (11) Cavalier-Smith, T. Higher Classification and Phylogeny of Euglenozoa. *Eur. J. Protistol.* **2016**, *56*, 250–276. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.09.003>.
- (12) Hannaert, V.; Bringaud, F.; Opperdoes, F. R.; Michels, P. A. Evolution of Energy Metabolism and Its Compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol. Dis.* **2003**, *2*, 11. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-2-11>.
- (13) El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A.-N.; Ghedin, E.; Worthey, E. A.; Delcher, A. L.; Blandin, G.; Westenberger, S. J.; Caler, E.; Cerqueira, G. C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D. A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J. F.; de Jong, P.; Edwards,

- K.; Englund, P. T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasc, A. C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M. J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C. R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J. C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J. L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S. L.; Sanchez, D. O.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A. J.; Sisk, E.; Tammi, M. T.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P. N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C. M.; Stuart, K. D.; Andersson, B. The Genome Sequence of *Trypanosoma Cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science* **2005**, 309 (5733), 409–415. <https://doi.org/10.1126/science.1112631>.
- (14) Weatherly, D. B.; Boehlke, C.; Tarleton, R. L. Chromosome Level Assembly of the Hybrid *Trypanosoma Cruzi* Genome. *BMC Genomics* **2009**, 10, 255. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-255>.
- (15) Callejas-Hernández, F.; Gironès, N.; Fresno, M. Genome Sequence of *Trypanosoma Cruzi* Strain Bug2148. *Genome Announc.* **2018**, 6 (3). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01497-17>.
- (16) Minning, T. A.; Weatherly, D. B.; Atwood, J.; Orlando, R.; Tarleton, R. L. The Steady-State Transcriptome of the Four Major Life-Cycle Stages of *Trypanosoma Cruzi*. *BMC Genomics* **2009**, 10, 370. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-370>.
- (17) de Souza, W.; de Carvalho, T. U.; Barrias, E. S. 18 - Ultrastructure of *Trypanosoma Cruzi* and Its Interaction with Host Cells. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)*; Telleria, J., Tibayrenc, M., Eds.; Elsevier: London, 2017; pp 401–427. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00018-6>.
- (18) De Souza, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma Cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, 8 (4), 269–285.
- (19) Michels, P. A. M.; Bringaud, F.; Herman, M.; Hannaert, V. Metabolic Functions of Glycosomes in Trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2006**, 1763 (12), 1463–1477. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.019>.
- (20) Gaunt, M. W.; Yeo, M.; Frame, I. A.; Stothard, J. R.; Carrasco, H. J.; Taylor, M. C.; Mena, S. S.; Veazey, P.; Miles, G. A. J.; Acosta, N.; de Arias, A. R.; Miles, M. A. Mechanism of Genetic Exchange in American Trypanosomes. *Nature* **2003**, 421 (6926), 936–939. <https://doi.org/10.1038/nature01438>.
- (21) Cuervo, P.; Domont, G. B.; De Jesus, J. B. Proteomics of Trypanosomatids of Human Medical Importance. *J. Proteomics* **2010**, 73 (5), 845–867. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.12.012>.
- (22) Nikiforov, A.; Dölle, C.; Niere, M.; Ziegler, M. Pathways and Subcellular Compartmentation of NAD Biosynthesis in Human Cells FROM ENTRY OF EXTRACELLULAR PRECURSORS TO MITOCHONDRIAL NAD GENERATION. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 (24), 21767–21778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213298>.
- (23) Nikiforov, A.; Kulikova, V.; Ziegler, M. The Human NAD Metabolome: Functions, Metabolism and Compartmentalization. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2015**, 50 (4), 284–297. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1028612>.
- (24) Zhang, N.; Sauve, A. A. Regulatory Effects of NAD + Metabolic Pathways on Sirtuin Activity. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier, 2018; Vol. 154, pp 71–104. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.012>.
- (25) Dean, P.; Major, P.; Nakjang, S.; Hirt, R. P.; Embley, T. M. Transport Proteins of Parasitic Protists and Their Role in Nutrient Salvage. *Front. Plant Sci.* **2014**, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00153>.

- (26) Acimovic, Y.; Coe, I. R. Molecular Evolution of the Equilibrative Nucleoside Transporter Family: Identification of Novel Family Members in Prokaryotes and Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **2002**, *19* (12), 2199–2210. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004044>.
- (27) Molina-Arcas, M.; Casado, F. J.; Pastor-Anglada, M. Nucleoside Transporter Proteins. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2009**, *7* (4), 426–434.
- (28) Landfear, S. M. Nutrient Transport and Pathogenesis in Selected Parasitic Protozoa. *Eukaryot. Cell* **2011**, *10* (4), 483–493. <https://doi.org/10.1128/EC.00287-10>.
- (29) Parker, J. L.; Newstead, S. Structural Basis of Nucleotide Sugar Transport across the Golgi Membrane. *Nature* **2017**, *551* (7681), 521–524. <https://doi.org/10.1038/nature24464>.
- (30) Haferkamp, I.; Schmitz-Esser, S.; Wagner, M.; Neigel, N.; Horn, M.; Neuhaus, H. E. Tapping the Nucleotide Pool of the Host: Novel Nucleotide Carrier Proteins of Protochlamydia Amoebophila. *Mol. Microbiol.* **2006**, *60* (6), 1534–1545. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05193.x>.
- (31) Fisher, D. J.; Fernández, R. E.; Maurelli, A. T. Chlamydia Trachomatis Transports NAD via the Npt1 ATP/ADP Translocase. *J. Bacteriol.* **2013**, *195* (15), 3381–3386. <https://doi.org/10.1128/JB.00433-13>.
- (32) Ruprecht, J. J.; Kunji, E. R. S. The SLC25 Mitochondrial Carrier Family: Structure and Mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **2020**, *45* (3), 244–258. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.11.001>.
- (33) Agrimi, G.; Russo, A.; Scarcia, P.; Palmieri, F. The Human Gene SLC25A17 Encodes a Peroxisomal Transporter of Coenzyme A, FAD and NAD<sup>+</sup>. *Biochem. J.* **2012**, *443* (1), 241–247. <https://doi.org/10.1042/BJ20111420>.
- (34) Zhou, Y.; Wang, L.; Yang, F.; Lin, X.; Zhang, S.; Zhao, Z. K. Determining the Extremes of the Cellular NAD(H) Level by Using an Escherichia Coli NAD<sup>+</sup>-Auxotrophic Mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77* (17), 6133–6140. <https://doi.org/10.1128/AEM.00630-11>.
- (35) Haferkamp, I.; Schmitz-Esser, S. The Plant Mitochondrial Carrier Family: Functional and Evolutionary Aspects. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00002>.
- (36) Palmieri, F.; Pierri, C. L.; De Grassi, A.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A. R. Evolution, Structure and Function of Mitochondrial Carriers: A Review with New Insights. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **2011**, *66* (1), 161–181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04516.x>.
- (37) Palmieri, F. The Mitochondrial Transporter Family SLC25: Identification, Properties and Physiopathology. *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34* (2–3), 465–484. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.005>.
- (38) Ogunbona, O. B.; Claypool, S. M. Emerging Roles in the Biogenesis of Cytochrome c Oxidase for Members of the Mitochondrial Carrier Family. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00003>.
- (39) King, M. S.; Kerr, M.; Crichton, P. G.; Springett, R.; Kunji, E. R. S. Formation of a Cytoplasmic Salt Bridge Network in the Matrix State Is a Fundamental Step in the Transport Mechanism of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1857* (1), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.09.013>.
- (40) Nury, H.; Blesneac, I.; Ravaud, S.; Pebay-Peyroula, E. Structural Approaches of the Mitochondrial Carrier Family. In *Membrane Protein Structure Determination*; Lacapère, J.-J., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; Vol. 654, pp 105–117. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-762-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-762-4_6).

- (41) Ruprecht, J. J.; King, M. S.; Zögg, T.; Aleksandrova, A. A.; Pardon, E.; Crichton, P. G.; Steyaert, J.; Kunji, E. R. S. The Molecular Mechanism of Transport by the Mitochondrial ADP/ATP Carrier. *Cell* **2019**, *176* (3), 435-447.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.025>.
- (42) Kunji, E. R. S.; Robinson, A. J. The Conserved Substrate Binding Site of Mitochondrial Carriers. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1757* (9–10), 1237–1248. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.021>.
- (43) Czuba, L. C.; Hillgren, K. M.; Swaan, P. W. Post-Translational Modifications of Transporters. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *192*, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.06.013>.
- (44) Marquez, J.; Lee, S. R.; Kim, N.; Han, J. Post-Translational Modifications of Cardiac Mitochondrial Proteins in Cardiovascular Disease: Not Lost in Translation. *Korean Circ. J.* **2016**, *46* (1), 1–12. <https://doi.org/10.4070/kcj.2016.46.1.1>.
- (45) Burnham-Marusch, A. R.; Berninsone, P. M. Multiple Proteins with Essential Mitochondrial Functions Have Glycosylated Isoforms. *Mitochondrion* **2012**, *12* (4), 423–427. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.04.004>.
- (46) Morales Herrera, D. S.; Contreras Rodríguez, L. E.; Rubiano Castellanos, C. C.; Ramírez Hernández, M. H. Identification and Sub-Cellular Localization of a NAD Transporter in *Leishmania Braziliensis* (LbNDT1). *Heliyon* **2020**, *6* (7), e04331. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04331>.
- (47) Lambrechts, R. A.; Schepers, H.; Yu, Y.; van der Zwaag, M.; Autio, K. J.; Vieira-Lara, M. A.; Bakker, B. M.; Tijssen, M. A.; Hayflick, S. J.; Grzeschik, N. A.; Sibon, O. C. CoA-Dependent Activation of Mitochondrial Acyl Carrier Protein Links Four Neurodegenerative Diseases. *EMBO Mol. Med.* **2019**, *11* (12), e10488. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910488>.
- (48) Luongo, T. S.; Eller, J. M.; Lu, M.-J.; Niere, M.; Raith, F.; Perry, C.; Bornstein, M. R.; Oliphant, P.; Wang, L.; McReynolds, M. R.; Migaud, M. E.; Rabinowitz, J. D.; Johnson, F. B.; Johnson, K.; Ziegler, M.; Cambronne, X. A.; Baur, J. A. SLC25A51 Is a Mammalian Mitochondrial NAD<sup>+</sup> Transporter. *Nature* **2020**, *588* (7836), 174–179. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2741-7>.
- (49) 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. Molecular Identification and Functional Characterization of *Arabidopsis thaliana* Mitochondrial and Chloroplastic NAD<sup>+</sup> Carrier Proteins. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (45), 31249–31259. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041830>.
- (50) Bernhardt, K.; Wilkinson, S.; Weber, A. P. M.; Linka, N. A Peroxisomal Carrier Delivers NAD<sup>+</sup> and Contributes to Optimal Fatty Acid Degradation during Storage Oil Mobilization. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **2012**, *69* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04775.x>.
- (51) Todisco, S.; Agrimi, G.; Castegna, A.; Palmieri, F. Identification of the Mitochondrial NAD<sup>+</sup> Transporter in *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (3), 1524–1531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510425200>.
- (52) Balico, L. de L. de L.; de Souza Santos, E.; Suzuki-Hatano, S.; Sousa, L. O.; Azzolini, A. E. C. S.; Lucisano-Valim, Y. M.; Dinamarco, T. M.; Kannen, V.; Uyemura, S. A. Heterologous Expression of Mitochondrial Nicotinamide Adenine Dinucleotide Transporter (Ndt1) from *Aspergillus Fumigatus* Rescues Impaired Growth in  $\Delta ndt1\Delta ndt2$  *Saccharomyces Cerevisiae* Strain. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2017**, *49* (6), 423–435. <https://doi.org/10.1007/s10863-017-9732-x>.

- (53) Agrimi, G.; Brambilla, L.; Frascotti, G.; Pisano, I.; Porro, D.; Vai, M.; Palmieri, L. Deletion or Overexpression of Mitochondrial NAD<sup>+</sup> Carriers in *Saccharomyces Cerevisiae* Alters Cellular NAD and ATP Contents and Affects Mitochondrial Metabolism and the Rate of Glycolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77* (7), 2239–2246. <https://doi.org/10.1128/AEM.01703-10>.
- (54) Orlandi, I.; Stamerra, G.; Vai, M. Altered Expression of Mitochondrial NAD<sup>+</sup> Carriers Influences Yeast Chronological Lifespan by Modulating Cytosolic and Mitochondrial Metabolism. *Front. Genet.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00676>.
- (55) Gakière, B.; Hao, J.; Bont, L. de; Pétriacq, P.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A. R. NAD<sup>+</sup> Biosynthesis and Signaling in Plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2018**, *37* (4), 259–307. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1505591>.
- (56) Feitosa-Araujo, E.; Chaves, I. de S.; Florian, A.; da Fonseca-Pereira, P.; Apfata, J. A. C.; Heyneke, E.; Medeiros, D. B.; Pires, M. V.; Mettler-Altmann, T.; Neuhaus, H. E.; Palmieri, F.; Araújo, W. L.; Obata, T.; Weber, A. P. M.; Linka, N.; Fernie, A. R.; Nunes-Nesi, A. Down-Regulation of a Mitochondrial NAD<sup>+</sup> Transporter (NDT2) Alters Seed Production and Germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa017>.
- (57) Girardi, E.; Agrimi, G.; Goldmann, U.; Fiume, G.; Lindinger, S.; Sedlyarov, V.; Srdic, I.; Gürtl, B.; Agerer, B.; Kartnig, F.; Scarcia, P.; Di Noia, M. A.; Liñeiro, E.; Rebsamen, M.; Wiedmer, T.; Bergthaler, A.; Palmieri, L.; Superti-Furga, G. Epistasis-Driven Identification of SLC25A51 as a Regulator of Human Mitochondrial NAD Import. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 6145. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19871-x>.
- (58) Kory, N.; Bos, J. uit de; Rijt, S. van der; Jankovic, N.; Göra, M.; Arp, N.; Pena, I. A.; Prakash, G.; Chan, S. H.; Kunchok, T.; Lewis, C. A.; Sabatini, D. M. MCART1/SLC25A51 Is Required for Mitochondrial NAD Transport. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (43), eabe5310. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe5310>.
- (59) Vögtle, F.-N.; Wortelkamp, S.; Zahedi, R. P.; Becker, D.; Leidhold, C.; Gevaert, K.; Kellermann, J.; Voos, W.; Sickmann, A.; Pfanner, N.; Meisinger, C. Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability. *Cell* **2009**, *139* (2), 428–439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.045>.
- (60) Harsman, A.; Schneider, A. Mitochondrial Protein Import in Trypanosomes: Expect the Unexpected. *Traffic* **2017**, *18* (2), 96–109. <https://doi.org/10.1111/tra.12463>.
- (61) Jores, T.; Klinger, A.; Groß, L. E.; Kawano, S.; Flinner, N.; Duchardt-Ferner, E.; Wöhnert, J.; Kalbacher, H.; Endo, T.; Schleiff, E.; Rapaport, D. Characterization of the Targeting Signal in Mitochondrial  $\beta$ -Barrel Proteins. *Nat. Commun.* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms12036>.
- (62) Ferramosca, A.; Zara, V. Biogenesis of Mitochondrial Carrier Proteins: Molecular Mechanisms of Import into Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2013**, *1833* (3), 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.11.014>.
- (63) Dyer, J. M.; McNew, J. A.; Goodman, J. M. The Sorting Sequence of the Peroxisomal Integral Membrane Protein PMP47 Is Contained within a Short Hydrophilic Loop. *J. Cell Biol.* **1996**, *133* (2), 269–280. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.2.269>.
- (64) Kim, P. K.; Hetteima, E. H. Multiple Pathways for Protein Transport to Peroxisomes. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427* (6), 1176–1190. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.005>.
- (65) Mayerhofer, P. U. Targeting and Insertion of Peroxisomal Membrane Proteins: ER Trafficking versus Direct Delivery to Peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA -*

- Mol. Cell Res.* **2016**, 1863 (5), 870–880.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.021>.
- (66) Zara, V.; Ferramosca, A.; Robitaille-Foucher, P.; Palmieri, F.; Young, J. C. Mitochondrial Carrier Protein Biogenesis: Role of the Chaperones Hsc70 and Hsp90. *Biochem. J.* **2009**, 419 (2), 369–375. <https://doi.org/10.1042/BJ20082270>.
- (67) Endo, T.; Yamamoto, H.; Esaki, M. Functional Cooperation and Separation of Translocators in Protein Import into Mitochondria, the Double-Membrane Bounded Organelles. *J. Cell Sci.* **2003**, 116 (Pt 16), 3259–3267.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.00667>.
- (68) Jansen, R. L. M.; van der Klei, I. J. The Peroxisome Biogenesis Factors Pex3 and Pex19: Multitasking Proteins with Disputed Functions. *FEBS Lett.* **2019**, 593 (5), 457–474. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13340>.
- (69) Colasante, C.; Peña Diaz, P.; Clayton, C.; Voncken, F. Mitochondrial Carrier Family Inventory of *Trypanosoma Brucei* Brucei: Identification, Expression and Subcellular Localisation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, 167 (2), 104–117.  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.05.004>.
- (70) Fiermonte, G.; Palmieri, L.; Todisco, S.; Agrimi, G.; Palmieri, F.; Walker, J. E. Identification of the Mitochondrial Glutamate Transporter BACTERIAL EXPRESSION, RECONSTITUTION, FUNCTIONAL CHARACTERIZATION, AND TISSUE DISTRIBUTION OF TWO HUMAN ISOFORMS. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (22), 19289–19294. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201572200>.
- (71) Roosild, T. P.; Greenwald, J.; Vega, M.; Castronovo, S.; Riek, R.; Choe, S. NMR Structure of Mystic, a Membrane-Integrating Protein for Membrane Protein Expression. *Science* **2005**, 307 (5713), 1317–1321.  
<https://doi.org/10.1126/science.1106392>.
- (72) Roosild, T. P.; Vega, M.; Castronovo, S.; Choe, S. Characterization of the Family of Mystic Homologues. *BMC Struct. Biol.* **2006**, 6 (1), 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-6-10>.
- (73) Deniaud, A.; Bernaudat, F.; Frelet-Barrand, A.; Juillan-Binard, C.; Vernet, T.; Rolland, N.; Pebay-Peyroula, E. Expression of a Chloroplast ATP/ADP Transporter in *E. Coli* Membranes: Behind the Mystic Strategy. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1808 (8), 2059–2066. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.04.011>.
- (74) Colasante, C.; Alibu, V. P.; Kirchberger, S.; Tjaden, J.; Clayton, C.; Voncken, F. Characterization and Developmentally Regulated Localization of the Mitochondrial Carrier Protein Homologue MCP6 from *Trypanosoma Brucei*. *Eukaryot. Cell* **2006**, 5 (8), 1194–1205. <https://doi.org/10.1128/EC.00096-06>.
- (75) Pena-Diaz, P.; Pelosi, L.; Ebikeme, C.; Colasante, C.; Gao, F.; Bringaud, F.; Voncken, F. Functional Characterisation of TbMCP5, a Conserved and Essential ADP/ATP Carrier Present in the Mitochondrion of the Human Pathogen *Trypanosoma Brucei*. *J. Biol. Chem.* **2012**, jbc.M112.404699.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404699>.
- (76) Macêdo, J. P. de; Burkard, G. S.; Niemann, M.; Barrett, M. P.; Vial, H.; Mäser, P.; Roditi, I.; Schneider, A.; Bütikofer, P. An Atypical Mitochondrial Carrier That Mediates Drug Action in *Trypanosoma Brucei*. *PLOS Pathog.* **2015**, 11 (5), e1004875. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004875>.
- (77) Zheng, F.; Colasante, C.; Voncken, F. Characterisation of a Mitochondrial Iron Transporter of the Pathogen *Trypanosoma Brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2019**, 233, 111221. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111221>.
- (78) Colasante, C.; Zheng, F.; Kemp, C.; Voncken, F. A Plant-like Mitochondrial Carrier Family Protein Facilitates Mitochondrial Transport of Di- and Tricarboxylates in

- Trypanosoma Brucei. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2018**, *221*, 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.03.003>.
- (79) Mitra, B.; Laranjeira-Silva, M. F.; Menezes, J. P. B. de; Jensen, J.; Michailowsky, V.; Andrews, N. W. A Trypanosomatid Iron Transporter That Regulates Mitochondrial Function Is Required for Leishmania Amazonensis Virulence. *PLoS Pathog.* **2016**, *12* (1), e1005340. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005340>.
- (80) Sánchez-Lancheros, D. M.; Ospina-Giraldo, L. F.; Ramírez-Hernández, M. H. Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase of Trypanosoma Cruzi (TcNMNAT): A Cytosol Protein Target for Serine Kinases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, *111* (11), 670–675. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160103>.
- (81) Niño, C. H.; Forero-Baena, N.; Contreras, L. E.; Sánchez-Lancheros, D.; Figarella, K.; Ramírez, M. H.; Niño, C. H.; Forero-Baena, N.; Contreras, L. E.; Sánchez-Lancheros, D.; Figarella, K.; Ramírez, M. H. Identification of the Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase of Trypanosoma Cruzi. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2015**, *110* (7), 890–897. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150175>.
- (82) Velasco-Villa, A.; Mauldin, M. R.; Shi, M.; Escobar, L. E.; Gallardo-Romero, N. F.; Damon, I.; Olson, V. A.; Streicker, D. G.; Emerson, G. The History of Rabies in the Western Hemisphere. *Antiviral Res.* **2017**, *146*, 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.03.013>.
- (83) Fooks, A. R.; Cliquet, F.; Finke, S.; Freuling, C.; Hemachudha, T.; Mani, R. S.; Müller, T.; Nadin-Davis, S.; Picard-Meyer, E.; Wilde, H.; Banyard, A. C. Rabies. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2017**, *3* (1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.91>.
- (84) Cherian, S.; Singh, R.; Anjaneya; Kp, S. Rabies Glycoprotein: A Benefit to the Virus, Us or Both? *Res. Rev. J. Veterinary Sci.* **2015**, *1* (1), 1–9.
- (85) Giesen, A.; Gniel, D.; Malerczyk, C. 30 Years of Rabies Vaccination with Rabipur: A Summary of Clinical Data and Global Experience. *Expert Rev. Vaccines* **2015**, *14* (3), 351–367. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1011134>.
- (86) Hemachudha, T.; Ugolini, G.; Wacharapluesadee, S.; Sungkarat, W.; Shuangshoti, S.; Laothamatas, J. Human Rabies: Neuropathogenesis, Diagnosis, and Management. *Lancet Neurol.* **2013**, *12* (5), 498–513. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70038-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70038-3).
- (87) INS. Boletín Epidemiológico - Semana 38, 2019 <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/Forms/AllItems.aspx> (accessed 2020 -05 -19).
- (88) MinSalud. MinSalud promueve jornada nacional de vacunación para prevenir la rabia <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/MinSalud-promueve-jornada-nacional-de-vacunacion-para-prevenir-la-rabia-.aspx> (accessed 2020 -05 -19).
- (89) VECOL. RABICÁN <https://www.vecol.com.co/productos/mascotas/biologicos/rabican> (accessed 2020 -05 -20).
- (90) Yelverton, E.; Norton, S.; Obijeski, J. F.; Goeddel, D. V. Rabies Virus Glycoprotein Analogs: Biosynthesis in Escherichia Coli. *Science* **1983**, *219* (4585), 614–620. <https://doi.org/10.1126/science.6297004>.
- (91) Fernando, B.-G.; Yersin, C.-T.; José, C.-B.; Paola, Z.-S. Predicted 3D Model of the Rabies Virus Glycoprotein Trimer <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/1674580/> (accessed 2020 -05 -30). <https://doi.org/10.1155/2016/1674580>.
- (92) Gomes, A. R.; Byregowda, S. M.; Veeregowda, B. M.; Balamurugan, V. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. **2016**. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356>.

- (93) Robinson, A. J.; Kunji, E. R. S. Mitochondrial Carriers in the Cytoplasmic State Have a Common Substrate Binding Site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (8), 2617–2622. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509994103>.
- (94) Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35* (6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- (95) Finn, R. D.; Attwood, T. K.; Babbitt, P. C.; Bateman, A.; Bork, P.; Bridge, A. J.; Chang, H.-Y.; Dosztányi, Z.; El-Gebali, S.; Fraser, M.; Gough, J.; Haft, D.; Holliday, G. L.; Huang, H.; Huang, X.; Letunic, I.; Lopez, R.; Lu, S.; Marchler-Bauer, A.; Mi, H.; Mistry, J.; Natale, D. A.; Necci, M.; Nuka, G.; Orengo, C. A.; Park, Y.; Pesseat, S.; Piovesan, D.; Potter, S. C.; Rawlings, N. D.; Redaschi, N.; Richardson, L.; Rivoire, C.; Sangrador-Vegas, A.; Sigrist, C.; Sillitoe, I.; Smithers, B.; Squizzato, S.; Sutton, G.; Thanki, N.; Thomas, P. D.; Tosatto, S. C. E.; Wu, C. H.; Xenarios, I.; Yeh, L.-S.; Young, S.-Y.; Mitchell, A. L. InterPro in 2017—beyond Protein Family and Domain Annotations. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (Database issue), D190–D199. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1107>.
- (96) Finn, R. D.; Clements, J.; Eddy, S. R. HMMER Web Server: Interactive Sequence Similarity Searching. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (Web Server issue), W29–W37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr367>.
- (97) Chou, K.-C.; Shen, H.-B. Euk-MPLoc: A Fusion Classifier for Large-Scale Eukaryotic Protein Subcellular Location Prediction by Incorporating Multiple Sites. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (5), 1728–1734. <https://doi.org/10.1021/pr060635i>.
- (98) Chou, K.-C.; Shen, H.-B. Cell-PLoc: A Package of Web Servers for Predicting Subcellular Localization of Proteins in Various Organisms. *Nat. Protoc.* **2008**, *3* (2), 153–162. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.494>.
- (99) Lin, W.-Z.; Fang, J.-A.; Xiao, X.; Chou, K.-C. ILoc-Animal: A Multi-Label Learning Classifier for Predicting Subcellular Localization of Animal Proteins. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9* (4), 634–644. <https://doi.org/10.1039/c3mb25466f>.
- (100) Blum, T.; Briesemeister, S.; Kohlbacher, O. MultiLoc2: Integrating Phylogeny and Gene Ontology Terms Improves Subcellular Protein Localization Prediction. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 274. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-274>.
- (101) Almagro Armenteros, J. J.; Sønderby, C. K.; Sønderby, S. K.; Nielsen, H.; Winther, O. DeepLoc: Prediction of Protein Subcellular Localization Using Deep Learning. *Bioinformatics* **2017**, *33* (21), 3387–3395. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>.
- (102) Kelley, L. A.; Mezulis, S.; Yates, C. M.; Wass, M. N.; Sternberg, M. J. E. The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis. *Nat. Protoc.* **2015**, *10* (6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
- (103) Kim, D. E.; Chivian, D.; Baker, D. Protein Structure Prediction and Analysis Using the Robetta Server. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (Web Server issue), W526–W531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>.
- (104) Baek, M.; DiMaio, F.; Anishchenko, I.; Dauparas, J.; Ovchinnikov, S.; Lee, G. R.; Wang, J.; Cong, Q.; Kinch, L. N.; Schaeffer, R. D.; Millán, C.; Park, H.; Adams, C.; Glassman, C. R.; DeGiovanni, A.; Pereira, J. H.; Rodrigues, A. V.; van Dijk, A. A.; Ebrecht, A. C.; Opperman, D. J.; Sagmeister, T.; Buhlheller, C.; Pavkov-Keller, T.; Rathinaswamy, M. K.; Dalwadi, U.; Yip, C. K.; Burke, J. E.; Garcia, K. C.; Grishin, N. V.; Adams, P. D.; Read, R. J.; Baker, D. Accurate Prediction of Protein Structures and Interactions Using a Three-Track Neural Network. *Science* **2021**, *373* (6557), 871–876. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>.

- (105) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Meng, E. C.; Couch, G. S.; Croll, T. I.; Morris, J. H.; Ferrin, T. E. UCSF ChimeraX: Structure Visualization for Researchers, Educators, and Developers. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2021**, *30* (1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>.
- (106) Pontius, J.; Richelle, J.; Wodak, S. J. Deviations from Standard Atomic Volumes as a Quality Measure for Protein Crystal Structures. *J. Mol. Biol.* **1996**, *264* (1), 121–136. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0628>.
- (107) Sanner, M. F. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *J. Mol. Graph. Model.* **1999**, *17* (1), 57–61.
- (108) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- (109) PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA | Nucleic Acids Research | Oxford Academic <https://academic.oup.com/nar/article/49/W1/W530/6266421> (accessed 2021 -09 -29).
- (110) Blom, N.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Sequence and Structure-Based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites. *J. Mol. Biol.* **1999**, *294* (5), 1351–1362. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3310>.
- (111) Blom, N.; Sicheritz-Pontén, T.; Gupta, R.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Prediction of Post-Translational Glycosylation and Phosphorylation of Proteins from the Amino Acid Sequence. *Proteomics* **2004**, *4* (6), 1633–1649. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300771>.
- (112) Kiemer, L.; Bendtsen, J. D.; Blom, N. NetAcet: Prediction of N-Terminal Acetylation Sites. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2005**, *21* (7), 1269–1270. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti130>.
- (113) Steentoft, C.; Vakhrushev, S. Y.; Joshi, H. J.; Kong, Y.; Vester-Christensen, M. B.; Schjoldager, K. T.-B. G.; Lavrsen, K.; Dabelsteen, S.; Pedersen, N. B.; Marcos-Silva, L.; Gupta, R.; Bennett, E. P.; Mandel, U.; Brunak, S.; Wandall, H. H.; Levery, S. B.; Clausen, H. Precision Mapping of the Human O-GalNAc Glycoproteome through SimpleCell Technology. *EMBO J.* **2013**, *32* (10), 1478–1488. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79>.
- (114) Gupta, R.; Brunak, S. Prediction of Glycosylation across the Human Proteome and the Correlation to Protein Function. *Pac. Symp. Biocomput. Pac. Symp. Biocomput.* **2002**, 310–322.
- (115) Apte, A.; Daniel, S. PCR Primer Design. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2009**, *2009* (3), pdb.ip65. <https://doi.org/10.1101/pdb.ip65>.
- (116) Sutherland, J. C.; Lin, B.; Monteleone, D. C.; Mugavero, J.; Sutherland, B. M.; Trunk, J. Electronic Imaging System for Direct and Rapid Quantitation of Fluorescence from Electrophoretic Gels: Application to Ethidium Bromide-Stained DNA. *Anal. Biochem.* **1987**, *163* (2), 446–457. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90247-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90247-8).
- (117) Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Protocol <https://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-cleanup-system-protocol/> (accessed 2019 -09 -22).
- (118) pGEM®-T Vector Systems <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-vector-systems/> (accessed 2018 -11 -08).
- (119) Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; CSHL Press, 2001.

- (120) Poxon, S. W.; Hughes, J. A. The Effect of Lyophilization on Plasmid DNA Activity. *Pharm. Dev. Technol.* **2000**, 5 (1), 115–122. <https://doi.org/10.1081/PDT-100100526>.
- (121) Eco32I (EcoRV) (10 U/L) - Thermo Fisher Scientific <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0301> (accessed 2018 -10 -25).
- (122) User Guide: NheI 2500 U [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0013185\\_NheI\\_2500U\\_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogTmhlSSAyNTAwIFU=](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0013185_NheI_2500U_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogTmhlSSAyNTAwIFU=) (accessed 2020 -06 -14).
- (123) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method | Nature Protocols <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.13?draft=collection> (accessed 2020 -03 -17).
- (124) Duennwald, M. L. Growth Assays to Assess Polyglutamine Toxicity in Yeast. *JoVE J. Vis. Exp.* **2012**, No. 61, e3461. <https://doi.org/10.3791/3461>.
- (125) Schägger, H. Tricine–SDS–PAGE. *Nat. Protoc.* **2006**, 1 (1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>.
- (126) Yang, P.-C.; Mahmood, T. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North Am. J. Med. Sci.* **2012**, 4 (9), 429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>.
- (127) Klingenberg, M. Nicotinamide-Adenine Dinucleotides (NAD, NADP, NADH, NADPH): Spectrophotometric and Fluorimetric Methods. In *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)*; Bergmeyer, H. U., Ed.; Academic Press, 1974; pp 2045–2072. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091304-6.50060-4>.
- (128) Champion pET SUMO Protein Expression System [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fpetsumo\\_man.pdf&title=Q2hhbXBpb24gcEVUIFNVTU8gUHJvdGVpbiBFeHByZXNzaW9uIFN5c3RlbnQ=](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fpetsumo_man.pdf&title=Q2hhbXBpb24gcEVUIFNVTU8gUHJvdGVpbiBFeHByZXNzaW9uIFN5c3RlbnQ=) (accessed 2019 -07 -07).
- (129) User Guide: EcoRI, 10 U/uL, 5000U [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012089\\_EcoRI\\_10\\_UuL\\_5000U\\_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogRWVudWUwIDUwMDBV](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012089_EcoRI_10_UuL_5000U_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogRWVudWUwIDUwMDBV) (accessed 2019 -07 -07).
- (130) Contreras, L. E.; Neme, R.; Ramírez, M. H. Identification and Functional Evaluation of Leishmania Braziliensis Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase. *Protein Expr. Purif.* **2015**, 115, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.08.022>.
- (131) Moreno-González, P. A.; Diaz, G. J.; Ramírez-Hernández, M. H. Producción y purificación de anticuerpos aviares (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante central en el metabolismo del NAD+. *Rev. Colomb. Quím.* **2013**, 42 (2), 12–20.
- (132) Pauly, D.; Dorner, M.; Zhang, X.; Hlinak, A.; Dorner, B.; Schade, R. Monitoring of Laying Capacity, Immunoglobulin Y Concentration, and Antibody Titer Development in Chickens Immunized with Ricin and Botulinum Toxins over a Two-Year Period. *Poult. Sci.* **2009**, 88 (2), 281–290. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00323>.
- (133) Polson, A.; von Wechmar, M. B.; van Regenmortel, M. H. Isolation of Viral IgY Antibodies from Yolks of Immunized Hens. *Immunol. Commun.* **1980**, 9 (5), 475–493. <https://doi.org/10.3109/08820138009066010>.

- (134) Guilmineau, F.; Krause, I.; Kulozik, U. Efficient Analysis of Egg Yolk Proteins and Their Thermal Sensitivity Using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis under Reducing and Nonreducing Conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (24), 9329–9336. <https://doi.org/10.1021/jf050475f>.
- (135) Matsuda, H.; Tanaka, H.; Blas, B. L.; Noseñas, J. S.; Tokawa, T.; Ohsawa, S. Evaluation of ELISA with ABTS, 2-2'-Azino-Di-(3-Ethylbenzthiazoline Sulfonic Acid), as the Substrate of Peroxidase and Its Application to the Diagnosis of Schistosomiasis. *Jpn. J. Exp. Med.* **1984**, *54* (3), 131–138.
- (136) Niño, C. H. Identificación y Caracterización de La Nicotinamida Mononucleótido Adenilil Transferasa (NMNAT) En Trypanosoma Cruzi: Enzima Clave En El Metabolismo Del NAD+. **2014**.
- (137) Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Academic Press, 2012.
- (138) User Guide: BamHI, 10 U/uL, 10,000U [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fassets%2Fmanuals%2FMAN0012058\\_BamHI\\_10\\_UuL\\_10000U\\_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogQmFtSEksIDewlFUvdUwIDewLDawMFU=](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fassets%2Fmanuals%2FMAN0012058_BamHI_10_UuL_10000U_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogQmFtSEksIDewlFUvdUwIDewLDawMFU=) (accessed 2020 -06 -13).
- (139) User Guide: HindIII, 10 U/uL, 5000U [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fassets%2Fmanuals%2FMAN0012130\\_HindIII\\_10\\_UuL\\_5000U\\_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogSGluZEIJSswgMTAgVS91TCwgNTAwMFU=](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fassets%2Fmanuals%2FMAN0012130_HindIII_10_UuL_5000U_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogSGluZEIJSswgMTAgVS91TCwgNTAwMFU=) (accessed 2020 -06 -13).
- (140) Zhang, T.; Lei, J.; Yang, H.; Xu, K.; Wang, R.; Zhang, Z. An Improved Method for Whole Protein Extraction from Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: Yeast Protein Extraction by LiAc/NaOH. *Yeast* **2011**, *28* (11), 795–798. <https://doi.org/10.1002/yea.1905>.
- (141) Ziegler, M.; Monné, M.; Nikiforov, A.; Agrimi, G.; Heiland, I.; Palmieri, F. Welcome to the Family: Identification of the NAD<sup>+</sup> Transporter of Animal Mitochondria as Member of the Solute Carrier Family SLC25. *Biomolecules* **2021**, *11* (6), 880. <https://doi.org/10.3390/biom11060880>.
- (142) Chacón, E.; Ramírez-Hernández, M. H. APROXIMACIÓN BIOINFORMÁTICA Y EXPERIMENTAL AL ESTUDIO DE TRANSPORTADORES DE NAD<sup>+</sup> EN EL PARÁSITO PROTOZOARIO Trypanosoma cruzi; Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas: Armenia, 2019; Vol. 2, pp 409–411.
- (143) Rost, B. Twilight Zone of Protein Sequence Alignments. *Protein Eng. Des. Sel.* **1999**, *12* (2), 85–94. <https://doi.org/10.1093/protein/12.2.85>.
- (144) Hannaert, V.; Saavedra, E.; Duffieux, F.; Szikora, J.-P.; Rigden, D. J.; Michels, P. A. M.; Opperdoes, F. R. Plant-like Traits Associated with Metabolism of Trypanosoma Parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (3), 1067–1071. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335769100>.
- (145) Jones, J. M.; Morrell, J. C.; Gould, S. J. Multiple Distinct Targeting Signals in Integral Peroxisomal Membrane Proteins. *J. Cell Biol.* **2001**, *153* (6), 1141–1150. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.6.1141>.
- (146) Wang, X.; Unruh, M. J.; Goodman, J. M. Discrete Targeting Signals Direct Pmp47 to Oleate-Induced Peroxisomes in *Saccharomyces Cerevisiae* \*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (14), 10897–10905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010883200>.

- (147) Cole, S. P. C. Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a “Multitasking” ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter \*. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289 (45), 30880–30888. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.609248>.
- (148) Hollingsworth, S. A.; Karplus, P. A. A Fresh Look at the Ramachandran Plot and the Occurrence of Standard Structures in Proteins. *Biomol. Concepts* **2010**, 1 (3–4), 271–283. <https://doi.org/10.1515/BMC.2010.022>.
- (149) Anderson, K. A.; Hirschev, M. D. Mitochondrial Protein Acetylation Regulates Metabolism. *Essays Biochem.* **2012**, 52, 10.1042/bse0520023. <https://doi.org/10.1042/bse0520023>.
- (150) Ritagliati, C.; Alonso, V. L.; Manarin, R.; Cribb, P.; Serra, E. C. Overexpression of Cytoplasmic TcSIR2RP1 and Mitochondrial TcSIR2RP3 Impacts on *Trypanosoma Cruzi* Growth and Cell Invasion. **2015**. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003725>.
- (151) Fisher, P.; Thomas-Oates, J.; Wood, A. J.; Ungar, D. The N-Glycosylation Processing Potential of the Mammalian Golgi Apparatus. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, 7, 157. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00157>.
- (152) Millar, B. C.; Jiru, X.; Moore, J. E.; Earle, J. A. P. A Simple and Sensitive Method to Extract Bacterial, Yeast and Fungal DNA from Blood Culture Material. *J. Microbiol. Methods* **2000**, 42 (2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00174-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00174-3).
- (153) Mirhendi, H.; Diba, K.; Rezaei, A.; Jalalizand, N.; Hosseinpour, L.; Khodadadi, H. Colony PCR Is a Rapid and Sensitive Method for DNA Amplification in Yeasts. *Iran. J. Public Health* **2007**, 36 (1), 40–44.
- (154) Koh, C. M. Storage of Bacteria and Yeast. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2013; Vol. 533, pp 15–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00002-7>.
- (155) Villamil Silva, S. E. Exploración de un transportador de NAD<sup>+</sup> y/o sus precursores en Leishmania. Trabajo de grado - Maestría, Universidad Nacional de Colombia, 2021.
- (156) Fathi-Roudsari, M.; Maghsoudi, N.; Maghsoudi, A.; Niazi, S.; Soleiman, M. Auto-Induction for High Level Production of Biologically Active Retepase in *Escherichia Coli*. *Protein Expr. Purif.* **2018**, 151, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.05.008>.
- (157) Shaw, A. Z.; Miroux, B. A General Approach for Heterologous Membrane Protein Expression in *Escherichia Coli*. In *Membrane Protein Protocols: Expression, Purification, and Characterization*; Selinsky, B. S., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2003; pp 23–35. <https://doi.org/10.1385/1-59259-400-X:23>.
- (158) Aguirre-López, B.; Cabrera, N.; de Gómez-Puyou, M. T.; Perez-Montfort, R.; Gómez-Puyou, A. The Importance of Arginine Codons AGA and AGG for the Expression in *E. Coli* of Triosephosphate Isomerase from Seven Different Species. *Biotechnol. Rep.* **2017**, 13, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.01.002>.
- (159) Horn, D. Codon Usage Suggests That Translational Selection Has a Major Impact on Protein Expression in Trypanosomatids. *BMC Genomics* **2008**, 9, 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-2>.
- (160) Jeacock, L.; Faria, J.; Horn, D. Codon Usage Bias Controls mRNA and Protein Abundance in Trypanosomatids. *eLife* **2018**, 7, e32496. <https://doi.org/10.7554/eLife.32496>.
- (161) Kleber-Janke, T.; Becker, W.-M. Use of Modified BL21(DE3) *Escherichia Coli* Cells for High-Level Expression of Recombinant Peanut Allergens Affected by Poor Codon Usage. *Protein Expr. Purif.* **2000**, 19 (3), 419–424. <https://doi.org/10.1006/pep.2000.1265>.

- (162) Geertsma, E. R.; Groeneveld, M.; Slotboom, D.-J.; Poolman, B. Quality Control of Overexpressed Membrane Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (15), 5722–5727. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802190105>.
- (163) Zhou, Y. J.; Yang, W.; Wang, L.; Zhu, Z.; Zhang, S.; Zhao, Z. K. Engineering NAD<sup>+</sup> Availability for Escherichia Coli Whole-Cell Biocatalysis: A Case Study for Dihydroxyacetone Production. *Microb. Cell Factories* **2013**, *12* (1), 103. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-103>.
- (164) Palmieri, F.; Pierri, C. L. Structure and Function of Mitochondrial Carriers - Role of the Transmembrane Helix P and G Residues in the Gating and Transport Mechanism. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (9), 1931–1939. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.063>.
- (165) Sivashanmugam, A.; Murray, V.; Cui, C.; Zhang, Y.; Wang, J.; Li, Q. Practical Protocols for Production of Very High Yields of Recombinant Proteins Using Escherichia Coli. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2009**, *18* (5), 936–948. <https://doi.org/10.1002/pro.102>.
- (166) Hayat, S. M. G.; Farahani, N.; Golichenari, B.; Sahebkar, A. Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli (E.Coli): What We Need to Know. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *24* (6), 718–725. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180131121940>.
- (167) Singhvi, P.; Saneja, A.; Srichandan, S.; Panda, A. K. Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38* (5), 474–486. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.011>.
- (168) Schade, R.; Calzado, E. G.; Sarmiento, R.; Chacana, P. A.; Porankiewicz-Asplund, J.; Terzolo, H. R. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-Technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *Altern. Lab. Anim.* **2005**, *33* (2), 129–154. <https://doi.org/10.1177/026119290503300208>.
- (169) Adrizal, A.; Patterson, P. H.; Cravener, T.; Hendricks, G. L. Egg Yolk and Serum Antibody Titers of Broiler Breeder Hens Immunized with Uricase and or Urease. *Poult. Sci.* **2011**, *90* (10), 2162–2168. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00855>.
- (170) Klimentzou, P.; Paravatou-Petsotas, M.; Zikos, C.; Beck, A.; Skopeliti, M.; Czarnecki, J.; Tsitsilonis, O.; Voelter, W.; Livaniou, E.; Evangelatos, G. P. Development and Immunochemical Evaluation of Antibodies Y for the Poorly Immunogenic Polypeptide Prothymosin Alpha. *Peptides* **2006**, *27* (1), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.07.002>.
- (171) FoodData Central <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/172184/nutrients> (accessed 2019 -12 -12).
- (172) Aalberse, R. C. Structural Biology of Allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**, *106* (2), 228–238. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.108434>.
- (173) Gallo, J.-M.; Precigout, E. Tubulin Expression in Trypanosomes. *Biol. Cell* **1988**, *64* (2), 137–143.
- (174) Mattos, E. C.; Schumacher, R. I.; Colli, W.; Alves, M. J. M. Adhesion of Trypanosoma Cruzi Trypomastigotes to Fibronectin or Laminin Modifies Tubulin and Paraflagellar Rod Protein Phosphorylation. *PLOS ONE* **2012**, *7* (10), e46767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046767>.
- (175) Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, M. K.; Millard, P. J.; Mao, F.; Leung, W.-Y.; Haugland, R. P. Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes That Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47* (9), 1179–1188. <https://doi.org/10.1177/002215549904700910>.

- 
- (176) Zuma, A. A.; Cavalcanti, D. P.; Zogovich, M.; Machado, A. C. L.; Mendes, I. C.; Thiry, M.; Galina, A.; de Souza, W.; Machado, C. R.; Motta, M. C. M. Unveiling the Effects of Berenil, a DNA-Binding Drug, on *Trypanosoma Cruzi*: Implications for KDNA Ultrastructure and Replication. *Parasitol. Res.* **2015**, *114* (2), 419–430. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4199-8>.
- (177) Kalb, L. C.; Frederico, Y. C. A.; Boehm, C.; Moreira, C. M. do N.; Soares, M. J.; Field, M. C. Conservation and Divergence within the Clathrin Interactome of *Trypanosoma Cruzi*. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 31212. <https://doi.org/10.1038/srep31212>.
- (178) Kalel, V. C.; Li, M.; Gaussmann, S.; Delhommel, F.; Schäfer, A.-B.; Tippler, B.; Jung, M.; Maier, R.; Oeljeklaus, S.; Schliebs, W.; Warscheid, B.; Sattler, M.; Erdmann, R. Evolutionary Divergent PEX3 Is Essential for Glycosome Biogenesis and Survival of Trypanosomatid Parasites. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2019**, *1866* (12), 118520. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.07.015>.
- (179) Salazar, O. Bacteria and Yeast Cell Disruption Using Lytic Enzymes. In *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation*; Posch, A., Ed.; Methods in Molecular Biology™; Humana Press: Totowa, NJ, 2008; pp 23–34. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_2).
- (180) Diekert, K.; I.P.M. de Kroon, A.; Kispal, G.; Lill, R. Chapter 2 Isolation and Subfractionation of Mitochondria from the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. In *Methods in Cell Biology*; Mitochondria; Academic Press, 2001; Vol. 65, pp 37–51. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)65003-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(01)65003-9).
- (181) Nielsen, K. H. Protein Expression-Yeast. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2014; Vol. 536, pp 133–147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00012-X>.