

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**ESTUDIO MOLECULAR Y
BIOQUÍMICO DE UN CANDIDATO A
SIRTUINA EN *Giardia duodenalis*.**

Edian Andres Herrera Tequia

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

2017

ESTUDIO MOLECULAR Y BIOQUÍMICO DE UN CANDIDATO A SIRTUINA EN *Giardia duodenalis*.

Edian Andres Herrera Tequia

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

Director (a):

Dr. rer. nat. María Helena Ramírez Hernández

Bioquímica y biología molecular de parásitos
Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ)

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

2017

*A mi familia, mis padres, mis hermanos y
a los que supieron hacerme sentirme
en casa fuera de casa.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, mi amada alma mater. Al Departamento de Química, a su cuerpo docente y a todos los que hacen parte de él.

A la Facultad de Ciencias por su apoyo durante la realización de la maestría mediante becas Auxiliar docente y exención para estudiantes de posgrado. A la Dirección de Investigación y Extensión (**DIEB**)- Sede Bogotá por los proyectos numeros: 35580 y 30416. A Dirección de Investigación y Extensión (**DIEB**)- Sede Bogotá y a Colciencias por su apoyo mediante la convocatoria 706 de jóvenes investigadores 2015.

Al profesor Luís Fernando Ospina del departamento de Farmacia por su ayuda durante el proceso de elaboración de los anticuerpos murinos y al profesor Gonzalo Díaz, Amparito y Tito, por su apoyo durante el proceso de elaboración de los anticuerpos aviares.

A la Doctora Magda Alvarado por su apoyo y orientación constantes.

A mi directora de tesis la profesora María Helena Ramírez por su orientación, paciencia, dedicación y sobre todo, por el apoyo y las enseñanzas constantes durante todo este proceso.

Al maravilloso grupo de seres humanos que hacen e hicieron parte del Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ), a Rosalbis, Laura Marcela, Nico, Diana, Luis, Lesly, Laura K, Gus, Facu, Melissa, Aravy y en especial a Carlos Alfonso (Fonso), por ser un apoyo constante y un gran amigo. A todos gracias por hacer amenos los momentos frustrantes y difíciles, y por compartir y potenciar los buenos.

Resumen

Las sirtuinas son una familia de proteínas muy conservada y ampliamente distribuida a lo largo de todos los dominios de la vida. Estas proteínas se encuentran agrupadas en la clase III de las deacetilasas de histonas, la cuales tienen como característica especial su dependencia de NAD^+ como cosustrato para llevar a cabo la deacetilación de residuos de lisina, en proteínas histónicas y no histónicas, tales como las histonas H3, H4 así como el factor de transcripción p53. El requerimiento de NAD^+ para la actividad sirtuina, convierte a este grupo de proteínas en sensores metabólicos, que se ven favorecidos en periodos de estrés calórico. Actualmente, se conoce que estas proteínas se encuentran involucradas en procesos celulares fundamentales, para el correcto funcionamiento celular. A pesar del importante rol de las sirtuinas para la función celular, el papel que cumplen estas proteínas en parásitos protozoarios es a la fecha un campo muy poco explorado, salvo por algunas sirtuinas de *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Leishmania*.

En este trabajo se realizó la caracterización bioinformática y experimental de los candidatos a sirtuina GdSir2.1 y GdSir2.2 presentes en el genoma de *Giardia duodenalis*, para ello se realizó: la clonación, expresión en *E. coli*, purificación de las proteínas recombinantes, evaluación de su capacidad de deacetilación *in vitro*, y, por último, ensayos inmunológicos y de retrotranscripción, para determinar la localización subcelular y expresión de estas proteínas. Esto permitió identificar en las estructuras primarias y terciarias predichas de estos candidatos, características estructurales conservadas para la familia sirtuina, como los son: el dominio con plegamiento tipo Rossmann de unión a NAD^+ y el dominio de unión a zinc. La aproximación experimental permitió a nivel *in vitro* la expresión de las proteínas recombinantes Hisx6-GdSir2.1, Hisx6-GdSir2.2 y MBP-GdSir2.2, junto con la determinación la capacidad deacetilasa dependiente de NAD^+ del candidato GdSir2.1. Los ensayos *in vivo*, por su parte, permitieron identificar que estos genes son transcripcional y traduccionalmente activos en trofozoítos del parásito. El desarrollo de anticuerpos policlonales aviares y murinos contra las proteínas recombinantes, permitió determinar una localización citoplasmática y nuclear para

GdSir2.1 y GdSir2.2 respectivamente en trofozoítos. El análisis de la expresión a nivel proteico de la proteína endógena GdSir2.2 durante la enquistación, mostró que la proteína disminuye su expresión a las 24 h postinducción de este proceso.

Palabras clave: Deacetilación de proteínas, Deacetilasas dependientes de NAD⁺, familia Sir2, parásitos protozoarios.

Abstract

The sirtuins are a family of proteins pretty conserved and widely distributed across all domains of life. Those proteins are grouped within the histone deacetylases-class III, which are distinctly characterized by their NAD⁺-dependence to carry out their deacetylation activity over lysine residues of histone proteins and non-histone proteins such as the histones H3 and H4 as well as the transcriptional factor p53. The dependence upon NAD⁺ for sirtuin activity makes this group of proteins metabolic sensors that are favored during times of caloric stress. Currently, it is known that these proteins are involved in metabolic processes fundamental for the correct function of cells. Despite the important role of sirtuins for cellular function, the role of these proteins in protozoan parasites is at the moment a field poorly explored, except for some proteins of *Plasmodium*, *Trypanosoma* and *Leishmania*.

In this study, the bioinformatic and experimental characterizations of the sirtuin-candidates GdSir2.1 and GdSir2.2 present in *Giardia duodenalis* genome was carried out. To do this, cloning, expression in *E. Coli*, purification of the recombinant proteins and evaluations of their capacity for deacetylation *in vitro* were performed. Finally, immunological and retrotranscriptional assays to identify the subcelular localization, protein and gene expressions of those candidates were done. This allowed the identification in the primary and predicted-tertiary structures of these candidates, conserved structural features in the sirtuin family, such as the Rossmann folds domain for NAD⁺ binding and the zinc-binding domain. The experimental approach allowed at *in vitro* level the expression of the recombinant proteins Hisx6-GdSir2.1, Hisx6-GdSir2.2 y MBP-GdSir2.2 as well as the determination of the NAD⁺-dependent deacetylase capacity of GdSir2.1 candidate. For their part, the *in vivo* assays allowed to identify that these genes are transcriptionally and traductionally active in *Giardia* trophozoites. The avian and murine polyclonal antibodies development against the recombinant proteins allowed determining cytoplasmic and nuclear localizations for GdSir2.1 and GdSir2.2 in trophozoites respectively. The analysis of protein-level expression for the endogenous GdSir2.1 throughout the encystation showed that the protein decrease its expression at 24 hours post induction of this process.

Keywords: Protein deacetylation, NAD⁺ dependent proteins, Sir2 family, protozoan parasites.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VII
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Introducción	1
1. Marco teórico	3
1.1. Biología de <i>Giardia duodenalis</i> : el organismo de estudio	3
1.2. Deacetilasas de histonas dependientes de NAD ⁺ (Sirtuinas).....	5
1.2.1 Acetilación y deacetilación de proteínas	5
1.2.2 Deacetilasas de histonas dependientes del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD ⁺)-Sirtuinas.....	6
1.2.3 Características estructurales y función de las Sirtuinas	8
1.3 <i>Giardia duodenalis</i> y sus sirtuinas	12
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo general	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. Preguntas de investigación.....	15
4. Materiales y métodos.....	16
4.1 Aproximación bioinformática.....	16
4.2 Aproximación in vitro	17
4.2.1 Construcción de los plásmidos pET100-GdSir2.1 y pET100-GdSir2.2 17	17
4.2.2 Construcción del plásmido pMAL-C5X-GdSir2.2.....	20
4.2.3 Expresión y purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas recombinantes	21
4.2.4 Efecto de las condiciones de inducción en la solubilidad GdSir2.2	23
4.2.5 Coexpresión de Hisx6-GdSir2.2 con proteínas chaperonas	23
4.2.6 Evaluación de la cepa de expresión en la solubilidad Hisx6-GdSir2.2	24
4.2.7 Renaturalización a partir de cuerpos de inclusión de la Hisx6-GdSir2.2.....	24
4.2.8 Ensayos de deacetilación	25
4.3 Aproximación in vivo	26

4.3.1	Generación, obtención y caracterización de IgGs policlonales murinos e IgYs policlonales aviares	26
4.3.2	Inmunodetección de las proteínas endógenas en extractos de <i>G. duodenalis</i>	30
4.3.3	Determinación de la localización subcelular por Inmunofluorescencia	30
4.3.4	Evaluación de la expresión de las GdSir2.1 y GdSir2.2 durante la enquistación	31
5.	Resultados y discusión	34
5.1	Aproximación bioinformática de los candidatos a sirtuina GdSir2.1 y GdSir2.2 de <i>G. duodenalis</i>	34
5.2	Aproximación in vitro a la caracterización de los candidatos a sirtuina GdSir2.1 y GdSir2.2 de <i>G. duodenalis</i>	40
5.2.1	Obtención de los vectores recombinantes pET100-GdSir2.1 y pET100-GdSir2.2.....	41
5.2.2	Expresión de las proteínas recombinantes Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2.....	43
5.2.3	Estandarización de la condiciones de expresión de la proteína recombinante GdSir2.2 en <i>E. Coli</i>	45
5.2.4	Obtención del vector recombinante pMAL C5X-GdSir2.2 y expresión de la proteína recombinante BMP-Gdsir2.2 soluble	51
5.2.5	Purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas recombinantes Hisx6-GdSir2.1 y MBP-GdSir2.2 y ensayo de actividad in vitro	56
5.3	Aproximación in vivo a la caracterización de las sirtuinas GdSir2.1 y GdSir2.2 de <i>G. duodenalis</i>	63
5.3.1	Generación, obtención y caracterización de los IgYs aviares anti-Hisx6-GdSir2.1 e IgGs murinos anti-Hisx6-GdSir2.2	63
5.3.2	Inmunodetección y localización subcelular de las proteínas GdSir2.1 y GdSir2.2 endógenas de <i>G. duodenalis</i>	68
5.3.3	Evaluación de la expresión de las GdSir2.1 y GdSir2.2 en el ciclo de vida de <i>G. duodenalis</i>	74
5.3.4	Detección de la actividad transcripcional de las GdSir2.1 y GdSir2.2 de <i>G. duodenalis</i>	75
5.3.5	Expresión transcripcional de las GdSir2.1 y GdSir2.2 durante la enquistación en <i>Giardia</i>	77
5.3.6	Expresión proteica de GdSir2.2 durante la enquistación en <i>Giardia</i>	78
6.	Conclusiones y perspectivas	81
6.1	Conclusiones	81
6.1.1	Generales	81
6.1.2	Específicas.....	82
6.2	Perspectivas	82
Anexos	84	
Anexo 1.	Predicción de dominios conservados usando el servidor CDD del NCBI ..	84
Anexo 2.	Alineamiento múltiple del domino sirtuina presente en los candidatos GdSir2.1, GdSir2.2 y las 7 sirtuinas humanas	85
Anexo 3.	Alineamiento de las estructuras primarias completas de las GdSir2.1, GdSir2.2 y sirtuinas ortólogas.....	87
Anexo 4.	Modelos de la estructura tridimensional predicha de los candidatos, obtenidos con el servidor I-TASSER.	88

Anexo 5. Evaluación mediante Gráfico de Ramachandran de los modelos de estructura tridimensional predicha para la GdSir2.1 y GdSir2.2.	89
Anexo 6. Vectores pET100/D-TOPO (A), pET-100-GdSir2.1 (B) y pET-100-GdSir2.1 (C).....	90
Anexo 7. Cisteínas presentes en el candidato GdSir2.2.....	90
Bibliografía	92

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Ciclo de vida de <i>G. duodenalis</i>	4
Figura 1-2: Deacetilación reversible de residuos de lisina por acetilasas y deacetilasas.	6
Figura 1-3: Estructura del dominio sirtuina y mecanismo de deacetilación catalizado por la familia sirtuina.....	10
Figura 5-1: Las estructuras primarias de las GdSir2.1 y GdSir2.2 presentan características conservadas de la familia Sirtuina.	36
Figura 5-2: Estructuras tridimensionales generadas para el dominio sirtuina presente en los candidatos Gdsir2.1 y GdSir2.2.	38
Figura 5-3: Superposición de las estructuras tridimensionales predichas para los dominios sirtuina y los modelos resueltos para las SIRT1 y SIRT2 humanas.....	39
Figura 5-4: Obtención de los vectores recombinantes pET100-GdSir2.1 y pET100-GdSir2.2.....	42
Figura 5-5: Expresión de las proteínas recombinantes Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2 en <i>E. coli</i> BL21 DE3.	44
Figura 5-6: Evaluación de la solubilidad de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.2 bajo diferentes condiciones de inducción en la cepa BL21 DE3.....	46
Figura 5-7: Evaluación de la solubilidad de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.1 en diferentes cepas de expresión.....	49
Figura 5-8: Obtención del vector recombinantes pMAL C5X-GdSir2.2.	53
Figura 5-9: Expresión de la proteína recombinante MBP-GdSir2.2 en células BL21 DE3.	54
Figura 5-10: Purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas Hisx6-GdSir2.1 y MBP-Gdsir2.2.....	57
Figura 5-11: Evaluación de la capacidad de acetilasa del candidato GdSir2.1.	58
Figura 5-12: Evaluación de la capacidad de acetilasa del candidato GdSir2.2.	59
Figura 5-13: Renaturalización de la proteína Hisx6-GdSir2.2 a partir de cuerpos de inclusión y evaluación de actividad.....	61
Figura 5-14: Purificación de Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2 por SDS-PAGE preparativa a partir de cuerpos de inclusión de BL21 DE3.	65
Figura 5-15: Caracterización de los anticuerpos policlonales aviares anti-Hisx6-GdSir2.1	66

Figura 5-16: Caracterización de los anticuerpos policlonales murinos anti-Hisx6-GdSir2.2	67
Figura 5-17: Inmunodetección de GdSir2.1 y GdSir2.2 en extractos de proteínas totales de <i>G. duodenalis</i>	68
Figura 5-18: La GdSir2.1 de <i>G. duodenalis</i> es una proteína con localización citoplasmática.	71
Figura 5-19: La GdSir2.2 de <i>G. duodenalis</i> es una proteína con localización nuclear. ...	72
Figura 5-20: Determinación por sobre-expresión de la localización subcelular de las proteínas GdSir2.1 y GdSir2.2 en <i>Giardia</i>	74
Figura 5-21: Detección de la actividad transcripcional de las GdSir2.1 y GdSir2.2 de <i>G. duodenalis</i>	76
Figura 5-22: Niveles de los mRNAs para las sirtuinas durante la enquistación en <i>Giardia</i>	77
Figura 5-23: Evaluación de la expresión proteica de la GdSir2.2 durante la enquistación en <i>Giardia</i>	79

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Localización subcelular y función de las sirtuinas presentes en humanos.....	8
Tabla 1-2: Sirtuinas identificadas por alineamientos de estructura primaria en <i>G. duodenalis</i>	13
Tabla 4-1: Esquema de inmunización hembras Babcock Brown con la proteína recombinante His-GdSir2.1	28
Tabla 4-2: Esquema de inmunización de hembras <i>Mus musculus</i> con la proteína recombinante His-GdSir2.2.	29
Tabla 4-3: Primers diseñados para la detección por RT-PCR de las GdSir2.1 y GdSir2.2.	32
Tabla 5-1: Primers diseñados para la clonación de los candidatos GdSir2.1 y GdSir2.2 en el vector pET100/D-TOPO.	40
Tabla 5-2: Predicción de efecto solubilizador de etiquetas fusión en la solubilidad de la GdSir2.2.....	51

Introducción

Giardia duodenalis es conocido mundialmente por ser un parásito protozoario y el agente causal de la Giardiasis, la enfermedad gastrointestinal más común en el mundo. Además de la importancia médica, la temprana divergencia de *Giardia* en el linaje eucariota permite postularlo como un excelente modelo para el estudio del metabolismo eucariota basal. El ciclo de vida de este parásito presenta dos formas celulares: el quiste o célula infectiva y el trofozoíto o célula vegetativa del parásito. El estudio de las Modificaciones Postraduccionales (MPTs) en *Giardia*, tales como: las fosfortilaciones, acetilaciones y sumoilaciones, han permitido identificar que estas modificaciones cumplen papeles de regulación en fenómenos celulares como: la enquistación o generación de células infectivas en este protozoario.

Las sirtuinas son un grupo de proteínas envueltas en procesos de deacetilación dependientes de NAD⁺, sobre residuos de lisina en proteínas histónicas y no histónicas. La dependencia de NAD⁺ para la actividad sirtuina, convierte a estas proteínas en un vínculo entre el estado energético-nutricional de la célula y los mecanismos de regulación transcripcional, por su acción deacetilasa sobre factores de transcripción. Actualmente, la mayor fuente información disponible respecto a la función que cumplen las sirtuinas a nivel celular, proviene de los estudios realizados con las sirtuinas humanas. De estas proteínas se conoce, que están involucradas en procesos celulares y metabólicos dependientes de su localización subcelular. Dentro de los procesos mediados por la acción de las sirtuinas se encuentran: regulación y homeostasis metabólica; silenciamiento transcripcional; apoptosis; segregación cromosómica y organización de microtúbulos, por nombrar algunos de estos procesos. Además de la participación de las sirtuinas en procesos de regulación postraduccionales como deacetilasas, estas proteínas han sido su vez identificadas como blancos de MPTs; tal es el caso de las sirtuinas SIRT1 y 2

humanas, las cuales son sustrato de fosforilaciones y sumoilaciones que regulan su actividad y localización sub-celular.

A pesar de la importancia de las sirtuinas para el funcionamiento celular, el estudio de este importante grupo de proteínas en parásitos protozoarios de importancia médica, es un campo hasta ahora poco explorado. El estudio de las sirtuinas de *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Leishmania*, ha permitido dilucidar el rol que cumplen estas proteínas en fenómenos de evasión del sistema inmune, reparación de daños en el DNA (por sus siglas en inglés) y regulación del citoesqueleto, lo cual ha permitido postular a estas proteínas como blancos farmacológicos promisorios en el diseño de fármacos, orientados al control de las enfermedades generadas por esos protozoos. En *Giardia* se han identificado a través de estudios bioinformáticos cinco secuencias candidatas a Sirtuinas en su genoma. El presente trabajo se plantea como un aporte al estudio de las sirtuinas de parásitos protozoarios, mediante una aproximación bioinformática, producción de proteínas recombinantes, determinación de la capacidad de acetilasa, producción de anticuerpos y ensayos de inmunodetección de dos de los cinco candidatos a sirtuinas identificadas de manera bioinformática en el genoma de *G. duodenalis* (GdSir2.1 y GdSir2.2).

1. Marco teórico

En el marco teórico se abordarán algunos aspectos correspondientes a la biología de *Giardia*, características estructurales y funcionales de las Sirtuinas y el conocimiento existente respecto a las sirtuinas en el contexto del parásito de estudio.

1.1. Biología de *Giardia duodenalis*: el organismo de estudio

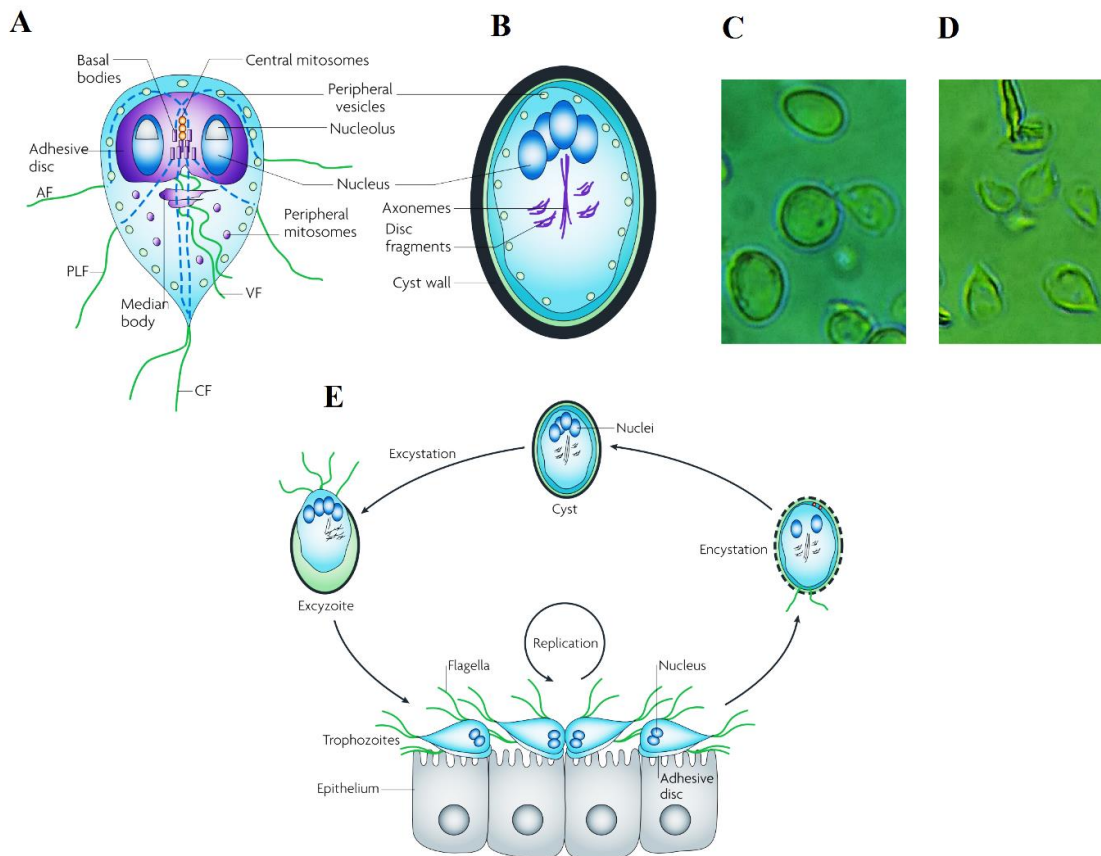
Giardia duodenalis (sinónimos: *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*) es un microorganismo eucariota, unicelular y flagelado. Éste es un parásito intestinal extracelular y el agente causal de la Giardiasis, la enfermedad gastrointestinal más común en el mundo que afecta a seres humanos y mamíferos en general; esta enfermedad se caracteriza por la presencia de diarrea, dolor epigástrico, náuseas, vómito y pérdida de peso¹, afectando aproximadamente a 280 millones de personas a nivel mundial por año, especialmente niños menores a 10 años². En el contexto de la producción animal, esta enfermedad genera un fuerte impacto económico por pérdida de masa corporal en los animales.

Las especies de *Giardia* tienen dos estadios en el ciclo de vida: el quiste (célula transmisible) y el trofozoíto (célula vegetativa) (Fig. 1-1 A y B). El quiste se caracteriza por la presencia de cuatro núcleos y una pared celular rígida, esta última característica hace que la célula presente una prolongada supervivencia en diferentes condiciones ambientales. El trofozoíto, por su parte, se caracteriza por la presencia de dos núcleos, cuatro flagelos y un disco ventral para la unión del parásito al intestino delgado del hospedero, donde se reproduce por fisión binaria y causa los síntomas de diarrea y mala absorción por estrés mecánico^{1,3} sobre las microvellosidades. El ciclo de vida del parásito inicia con la ingesta de un quiste en agua o comida contaminada, luego ingresar el quiste al organismo y de estar expuesto al ambiente ácido del estómago, sufre un proceso de exquistación a trofozoíto en la región próxima al intestino delgado. Para reiniciar el ciclo de

vida, el trofozoíto sufre un proceso de enquistación generando nuevamente quistes, los cuales son liberados en la materia fecal al ambiente^{4,5} y son capaces de infectar a un nuevo hospedero (Fig. 1-1 E).

Figura 1-1: Ciclo de vida de *G. duodenalis*.

(A) Trofozoíto. (B) Quiste. (C y D) Microscopia de luz de Quistes y trofozoítos respectivamente, obtenidos por cultivo *in vitro*, en este trabajo. (E) Ciclo de vida de *G. duodenalis*. (Tomado de Ankarklev *et al*¹).



Además de la importancia médica y pecuaria previamente mencionada, algunas características presentes en *Giardia* permiten considerarlo como un excelente modelo celular. Estudios de biología molecular empleando RNA ribosomal, han permitido considerar a *Giardia* como un organismo que divergió de manera muy basal dentro del linaje de los eucariotas⁶, otras características que apoyan esta hipótesis son: la ausencia de mitocondrias funcionales, peroxisomas y un aparato de Golgi morfológicamente poco

evidente. La ancestralidad de este parásito hace resaltar su importancia en estudios del metabolismo eucariota, debido a su sencillez metabólica. Además de lo ya mencionado, la existencia del genoma completamente secuenciado^{7,8,9} y la posibilidad de llevar a cabo todo su ciclo de vida de manera *in vitro*¹⁰ (Cultivo de trofozoítos y obtención quistes)¹¹ (Fig 1-1 C y D), hacen de *Giardia* una valiosa herramienta en estudios de biología celular², los cuales pueden ser extrapolados a otros eucariotas, incluidos parásitos intestinales como: *Entamoeba*, *Cryptosporidium* y *Toxoplasma* que se propagan por medio de quistes y para los cuales el proceso de enquistación *in vitro* es difícil de realizar¹².

1.2. Deacetilasas de histonas dependientes de NAD⁺ (Sirtuinas).

1.2.1 Acetilación y deacetilación de proteínas

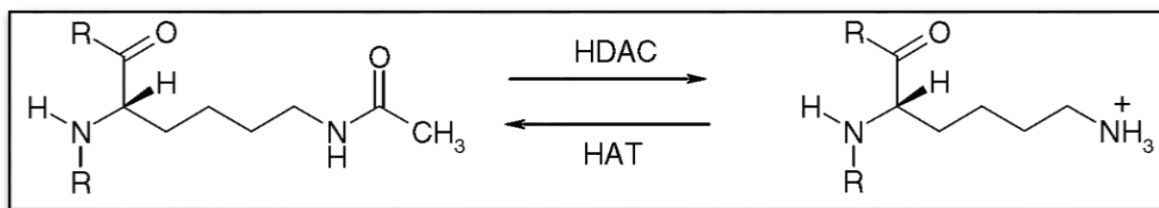
Las modificaciones postraduccionales son mecanismos de regulación llevados a cabo sobre las proteínas, estos procesos de modificación covalente tienen implicación sobre la actividad catalítica, la estabilidad, la localización subcelular entre otros múltiples procesos regulatorios en las proteínas. Dentro de las MPTs más conocidas se encuentran por ejemplo: las fosforilaciones, acetilaciones, metilaciones, sumoilaciones, glicosilaciones y acilaciones, que tiene como finalidad regular a nivel celular la función de las proteínas¹³. Estudios adelantados en *Giardia* han permitido determinar, la importancia de las modificaciones postraduccionales en la regulación de procesos celulares en este parásito, tal es el caso, por ejemplo, de la importancia de las sumoilaciones¹⁴, fosforilaciones¹⁵ y acetilaciones¹⁶ en el proceso de enquistación, por nombrar algunos ejemplos.

La acetilación es un proceso de MPT reversible, que desempeña una función crítica en la modulación de la estructura de la cromatina y en la regulación de la expresión génica¹⁷. En términos generales los procesos de acetilación covalente de histonas modifican la expresión génica por medio de cambios en el empaquetamiento del DNA; la hiperacetilación de histonas tiene como efecto la descondensación de la cromatina y como consecuencia activación de la transcripción. Por el contrario, la hipoacetilación de histonas conduce a una interacción más fuerte entre el DNA y la histona y conduce por tanto, a una condensación de la cromatina y silenciamiento génico¹⁷. Aunque inicialmente la acetilación fue estudiada

en el contexto de la modificación histónica, en la actualidad se conoce que este proceso de modificación tiene como sustrato múltiples proteínas no histónicas. El proceso de acetilación está regulado en primer lugar; por la acción de las acetilasas de histonas (HATs, por sus siglas en inglés) que agregan grupos acetilo, y en segundo lugar; por la acción de las deacetilasas de histonas (HDACs, por sus siglas en inglés), que son proteínas encargadas del clivaje de estos grupos acetilo en los residuos de lisina en las colas N-terminal de las histonas¹⁸, y de la deacetilación de otras proteínas no histónicas tales como enzimas y factores de transcripción¹⁹ (Fig. 1-2). Este trabajo tiene como objeto de estudio una clase de HDACs conocida como la familia Sirtuina, de la que nos ocuparemos a continuación.

Figura 1-2: Deacetilación reversible de residuos de lisina por acetilasas y deacetilasas.

Tomado de Lawson *et al* 2010²⁰.



1.2.2 Deacetilasas de histonas dependientes del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD⁺)-Sirtuinas

Las deacetilasas de histonas (HDACs) son un grupo de proteínas que se encargan del clivaje de los grupos acetilo en residuos de lisina de proteínas histonas y no histónicas como p53²¹ y FOXO¹⁹. A la fecha han sido identificadas cuatro clases de HDACs humanas con base en su homología con deacetilasas de histonas presentes en levaduras. Las clases I, II y IV representan las HDACs clásicas, que actúan mediante un mecanismo catalítico dependiente de zinc para remover los grupos acetilo en las lisinas²⁰.

Las HDACs restantes de la clase III, también conocidas como sirtuinas, son una familia de proteínas relacionadas con el regulador de silenciamiento de información 2 (SIR2), de donde se originó el nombre de la familia y el cual se identificó inicialmente en la levadura

(*Saccharomyces cerevisiae*). En contraste con las HDACs clases I, II y IV la cuales emplean el zinc para su catálisis, produciendo acetato libre y la lisina deacetilada, en las sirtuinas el zinc tiene un rol estructural y no se encuentra involucrado en su mecanismo de catálisis. Otra diferencia significativa de las sirtuinas respecto otras HDACs, es la dependencia NAD⁺ para llevar a cabo su actividad catalítica, la cual genera como productos la lisina deacetilada, nicotinamida y O-cetil-ADP-ribosa²².

La familia sirtuina se encuentra presente en los tres dominios de la vida: *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya*. Análisis de la estructura primaria de muchas sirtuinas, ha permitido determinar que la familia se encuentra subdividida en cinco clases (I, II, III, IV y U), la clases I-IV incluye sirtuinas de eucariotas, mientras que en la restante clase U, se encuentran agrupadas las sirtuinas procariotas²³ y algunos candidatos a sirtuinas de eucariotas como: *Dictyostelium discoideum* y *Plasmodium falciparum*. Actualmente, la mayor fuente información disponible respecto a la función que cumplen las sirtuinas a nivel celular, proviene de los estudios realizados en mamíferos, específicamente con las SIRT1, SIRT2 y SIRT3 humanas (3 de las 7 sirtuinas presentes en humanos). En estos estudios se ha encontrado que estas proteínas se encuentran involucradas en una gran variedad de procesos metabólico y celulares que dependen enormemente de su localización subcelular (SIRT1; Nuclear, SIRT2; Citoplasmática y SIRT3; Mitocondrial). Estos procesos celulares incluyen por ejemplo: regulación y homeostasis metabólica²⁴; silenciamiento transcripcional; apoptosis; segregación cromosómica; organización de microtúbulos; estabilidad del genoma; reparación de DNA²³; modulación de la autofagia²⁵; progresión del ciclo celular; y, finalmente, supervivencia²⁶ (Tabla 1-1).

Tabla 1-1: Localización subcelular y función de las sirtuinas presentes en humanos.Tomado de Wirth 2010²⁷.

Sirtuin	Enzymatic activity	Subcellular localization	Function	Homologues
SIRT1	Deacetylase	Nucleus, (Cytosol)	metabolism (gluconeogenesis, fatty acid oxidation, cholesterol regulation, insulin secretion), differentiation and development, stress responses and apoptosis	Sir2p (<i>S. cerevisiae</i>) Hst1p (<i>S. cerevisiae</i>) SIR-2.1 (<i>C. elegans</i>) dSIR2 (<i>D. melanogaster</i>)
SIRT2	Deacetylase	Cytosol (Nucleus)	tubulin deacetylation Cell cycle control	Hst2p (<i>S. cerevisiae</i>) SIRT2 (<i>D. melanogaster</i>)
SIRT3	Deacetylase	Mitochondria	mitochondrial protein deacetylation, Acetate metabolism, ATP production, fatty-acid oxidation	
SIRT4	ADP-ribosyltransferase	Mitochondria	insulin secretion (pancreatic β -cells)	SIR-2.2 (<i>C. elegans</i>) SIR-2.3 (<i>C. elegans</i>) SIRT4 (<i>D. melanogaster</i>)
SIRT5	Deacetylase	Mitochondria	Urea cycle (liver)	
SIRT6	Deacetylase/ADP-ribosyltransferase	Nucleus	Genome stability (Base excision repair), Telomeric chromatin structure, NF- κ B regulation	SIR-2.4 (<i>C. elegans</i>) SIRT6 (<i>D. melanogaster</i>)
SIRT7	Deacetylase	Nucleus (Nucleolus)	rDNA (PolI) transcription	SIRT7 (<i>D. melanogaster</i>)

1.2.3 Características estructurales y función de las Sirtuinas

La cristalización de sirtuinas presentes en diferentes organismos, ha permitido dilucidar las características estructurales responsables de la actividad sirtuina. Estos estudios de cristalización han permitido determinar que el dominio sirtuina se encuentra constituido por alrededor de 250 aminoácidos, y esta estructuralmente compuesto por dos plegamiento Rossmann de unión al NAD⁺ y un dominio de unión a zinc que contiene cuatro residuos de cisteína muy conservados; el cual está implicado en la especificidad de sustrato de diferentes sirtuinas. El dominio catalítico de estas enzimas se encuentra situado en un canal hidrofóbico entre estos dos dominios, donde se lleva a cabo la deacetilación²² (Fig. 1-3 A).

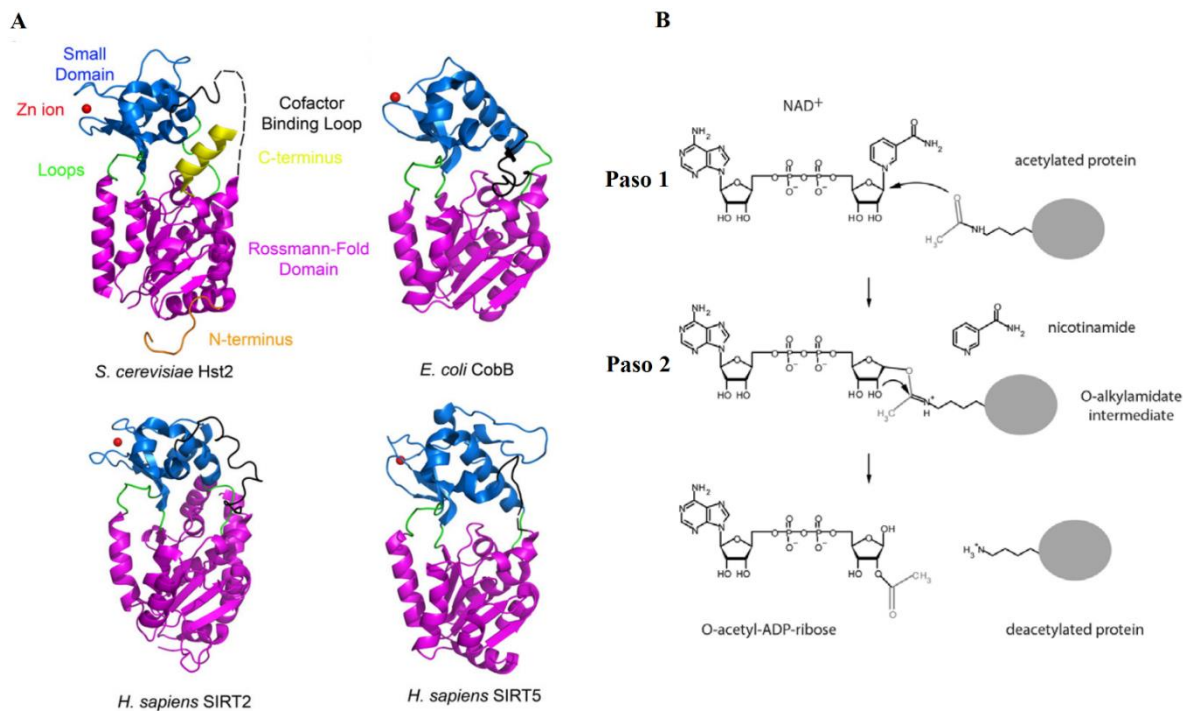
La mayoría de las sirtuinas catalizan la hidrólisis de un enlace amida transfiriendo el grupo acetilo a la ribosa del NAD⁺ a expensas de la hidrólisis de un enlace N-glicosídico. Los productos de esta reacción son nicotinamida, O-acetil-ADP-ribosa (OAADPr) y la lisina

deacetilada^{22,23}. Se ha determinado que la proteína se une en primer lugar a la lisina acetilada y luego al NAD⁺²⁸. En términos generales, la deacetilación ocurre en dos pasos, en el primero la nicotinamida es liberada y se produce un intermediario O-alkilamidato y en el segundo, el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de la nicotinamida ataca el intermediario, generando la lisina deacetilada y la O-acetil-ADP-ribosa (Fig. 1-3B), de estos productos de la actividad enzimática; la nicotinamida actúa como un inhibidor no competitivo. Por su parte, la OAADPr se ha vinculado con la reducción en los niveles de especies reactivas de oxígeno, silenciamiento génico y activación de canales, no obstante, este metabolito ha sido pobremente estudiado²⁸.

Algunas sirtuinas de la clase II, tales como; la SIRT4 humana presentan una actividad ADP-ribosil transferasa adicional a su actividad protein-deacetilasa. La mono-ADP-ribosilación es una MPTs que consiste en la transferencia enzimática de la ADP-ribosa del NAD⁺ a una proteína aceptora. En *Trypanosoma brucei* la ADP-ribosilación de la histona H2A por acción de una sirtuina, está implicada en la relajación de la cromatina y forma parte del sistema de reparación del DNA de este microorganismo.

Figura 1-3: Estructura del dominio sirtuina y mecanismo de deacetilación catalizado por la familia sirtuina.

(A). Estructura del dominio sirtuina presente en estructuras resueltas de sirtuinas de *S. cerevisiae*, *E. coli* y *Homo sapiens*. Magenta; plegamiento tipo rossmann. Azul; dominio pequeño de unión a zinc. Verde: loops. Rojo: Átomo de zinc. (Tomado de Wirth 2010²⁷)
 (B). Mecanismo de deacetilación catalizado por las sirtuinas. La deacetilación ocurre en dos pasos. Paso 1; la nicotinamida es clivada y se produce un intermediario O-alkilamidato. Paso 2; el grupo hidroxilo de la posición 2' de la ribosa de la nicotinamida ataca el intermediario, generando la lisina deacetilada y la O-acetil-ADP-ribosa. (Tomado de Greiss y Gartner 2009²²).



1.2.4 El NAD⁺ y la actividad sirtuina

La dependencia de NAD⁺ para la actividad catalítica de las sirtuinas, convierte a estas proteínas en censoras del estado metabólico, y hace de ellas el vínculo entre el estado nutricional de la célula y la regulación postraduccional de efectores metabólicos y la

expresión génica²⁶. Esta capacidad censora del estado metabólico se debe, en primer lugar, a la regulación intrínseca de la sirtuina ante variaciones en los niveles intracelulares del NAD⁺²⁹, siendo potenciada su actividad en fenómenos de estrés nutricional^{30,31,32}, donde los niveles de NAD⁺ son incrementados intracelularmente. En segundo lugar, la actividad sirtuina es regulada, a su vez, mediante MPTs ejercidas por proteínas activadas por estrés nutricional, tal es el caso de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), la cual fosforila y activa a la SIRT1. Esto trae como consecuencia la deacetilación e inactivación de p53, permitiendo la supervivencia celular ante fenómenos de estrés nutricional²¹ por regulación de este factor de transcripción involucrado en apoptosis.

1.2.5 Sirtuinas de parásitos protozoos

A pesar del importante rol de las sirtuinas en el funcionamiento celular, la función que cumplen estas proteínas en parásitos protozoarios es un campo muy poco explorado, salvo por algunas sirtuinas de *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Entamoeba*. De estas sirtuinas se conoce que la PfSIR2A de *P. falciparum*, se encuentra involucrada en el silenciamiento transcripcional de regiones sub-teloméricas, que codifican para familias de variantes antigénicas, las cuales son usadas por el parásito para evadir el sistema inmune del hospedero y que han mostrado ser estrechamente reguladas por la actividad sirtuina. La TbSir2rp1 de *T. brucei*, se encuentra localizada en el núcleo y tiene como sustratos a las histonas H2A y H2B y es importante para reparación del DNA en este parásito³³. La sirtuina de *L. infantum* (LiSIR2rp1) es la primera en mostrar actividad ADP-ribosilasa α -Tubulina, causando despolimerización e inhibición del ensamblaje de microtúbulos, así como la α -Tubulina deacetilada²³, pudiendo estar involucrada en la regulación del ciclo celular. Al igual que la LiSIR2rp, la EhSir2a de *E. histolytica*, se encuentra involucrada en la deacetilación de α -tubulina y se ha encontrado además, que mutaciones en el dominio catalítico de esta enzima tiene efectos en la estabilidad y número de ensamblajes microtubulares durante el ciclo celular de este protozoario³⁴. Esta diversidad de funciones y su participación en procesos celulares claves hacen de las sirtuinas blancos farmacológicos interesantes, para el control de parásitos protozoarios de importancia médica como *G. duodenalis* y los mencionados anteriormente.

1.3 Giardia duodenalis y sus sirtuinas

Como ya fue mencionado, *G. duodenalis* es conocido a nivel mundial por ser responsable de la Giardiasis, la enfermedad gastrointestinal más común en el mundo y la cual afecta a seres humanos y mamíferos en general. El entendimiento la biología de este parásito, constituye un paso para el desarrollo de herramientas de diagnóstico, prevención y tratamiento de la Giardiasis. Es por ello que en el Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ), nos hemos interesado en el estudio de las sirtuinas (Sir2), las cuales han mostrado ser mediadores claves para el correcto funcionamiento celular y han sido propuestas como blancos farmacológicos en el tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos protozoarios³³. En lo que concierne a las sirtuinas de *G. duodenalis*, estudios bioinformáticos empleando alineamientos múltiples han permitido determinar la presencia de cinco secuencias candidatas a deacetilasas de histonas dependientes de NAD⁺ en el genoma de este parásito, denominadas como: GL50803_10708 (GdSir2.1); GL50803_10707 (GdSir2.2); GL50803_16569 (GdSir2.3); GL50803_11676 (GdSir2.4); GL50803_6942 (GdSir2.5)^{23,35} (Tabla 1-2). En el presente trabajo inicialmente se planteó el estudio e identificación de uno de estos candidatos a sirtuina en el parásito. Adicionalmente, durante el trascurso del mismo, se abordó el estudio de un candidato adicional, constituyéndose entonces como un aporte al conocimiento de las sirtuinas de parásitos protozoarios, mediante el estudio molecular y bioquímico de dos de los cinco candidatos a sirtuinas propuestos bioinformáticamente en el genoma de *G. duodenalis* (GdSir2.1 y GdSir2.2).

Tabla 1-2: Sirtuinas identificadas por alineamientos de estructura primaria en *G. duodenalis*.

Obtenidas de www.giardadb.org. Reportado por Sonda *et al* 2010. --* Relación no determinada. *Parámetros determinados con <http://web.expasy.org/protparam>. PI: punto isoelectrico.

Código reportado http://www.giardadb.org/	Descripción	Clase	Denominación en el presente trabajo.	Longitud secuencia de nucleótidos pb.	Longitud secuencia de aminoácidos	*PM kDa	*PI
GL50803_10708.	Proteína hipotética, dominio Sir2.	Clase I.	GdSir2.1	2043	680	74	5.77
GL50803_10707.	Deacetilasa de histona dependiente de NAD ⁺ - Sir2.	Clase I	GdSir2.2	1680	559	62	5.66
GL50803_16569.	Regulador transcripcional, familia Sir2.	Clase U.	GdSir2.3	1176	391	43,9	6.47
GL50803_11676.	Sirtuina tipo 2.	--*	GdSir2.4	1779	592	66,5	5.80
GL50803_6942.	Proteína familia Sir2.	Clase U.	GdSir2.5	1971	656	73	9.26

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Estudiar *in vitro* e *in vivo* dos candidatos a Sirtuina en *Giardia duodenalis*.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar la actividad enzimática de las proteínas recombinantes candidatos a Sirtuina.
2. Determinar la localización subcelular de las proteínas GdSir2.1 y GdSir2.2 en el parásito.
3. Evaluar la expresión de la proteína GdSir2.2 en el ciclo de vida de *G. duodenalis*.

3. Preguntas de investigación

El presente trabajo de investigación se planteó identificar funcionalmente dos de las cinco sirtuinas hipotéticas en *Giardia duodenalis* (GdSir2.1 y GdSir2.2), con este propósito se desarrollaron estrategias bioinformáticas y experimentales de bioquímica y biología molecular para responder a las siguientes preguntas:

¿Son estos dos candidatos sirtuinas en *Giardia*?

¿Cuál es su localización subcelular en este parásito?

¿Cómo es su expresión durante el proceso de enquistación en este protozoo?

4. Materiales y métodos

La caracterización de los candidatos GdSir2.1 y Gdsir2.2 de *G. duodenalis*, se realizó mediante tres aproximaciones metodológicas; la primera de estas es una aproximación bioinformática orientada al análisis de sus estructuras primarias y terciarias, la segunda es una aproximación *in vitro* enfocada a la obtención de estos candidatos como proteínas recombinantes, determinación de su actividad deacetilasa, junto a la producción de anticuerpos policlonales murinos y aviares contra las proteínas recombinantes obtenidas y, finalmente, la tercera corresponde a un estudio *in vivo* que involucra determinación de la localización subcelular y evaluación de la variación de su expresión durante la enquistación. La metodología abordada para desarrollar esto se muestra a continuación.

4.1 Aproximación bioinformática

Las secuencias de aminoácidos de los candidatos GdSir2.1 y GdSir2.2 con códigos de acceso: GL50803_10708 y GL50803_10707 respectivamente (www.giardiadb.org), fueron empleadas en alineamientos múltiples con las secuencias ortólogas presentes en humanos SIRT1-7 (Códigos Uniprot: Q96EB6, Q8IXJ6, Q9NTG7, Q9Y6E7, Q9NXA8, Q86T7, Q9NRC8 respectivamente) y en parásitos protozoarios: *TbSir2rp1* (*Trypanosoma brucei*), *PfSIR2A* (*Plasmodium falciparum*) y *LiSIR2rp1* (*Leishmania infantum*) (Códigos Uniprot: Q57V41, Q8IE47 y **Q8I6E4** respectivamente). Para los alineamientos múltiples se empleó el servidor T-COFFEE³⁶ y para su visualización fue empleado el programa Geneious version 6.1.6³⁷ o el algoritmo *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) presente en el programa CLC Free Workbench versión 7.6. En la identificación de dominios funcionales se empleó servidor CDD³⁸ disponible en NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>. Las estructuras terciarias se predijeron mediante el

servidor I-TASSER³⁹, para la visualización y comparación de estructuras se empleó el programa UCSF Chimera⁴⁰. La validación de los modelos empleando el gráfico de Ramachandran, se realizó mediante el servidor RAMPAGE⁴¹: <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>.

4.2 Aproximación in vitro

4.2.1 Construcción de los plásmidos pET100-GdSir2.1 y pET100-GdSir2.2

4.2.1.1 Amplificación de las regiones codificantes GdSir2.1 y GdSir2.2

Las secuencias de aminoácidos de los candidatos GdSir2.1 y GdSir2.2 con códigos de acceso: GL50803_10708 y GL50803_10707 respectivamente (www.giardiadb.org), fueron empleadas en alineamientos múltiples con las secuencias ortólogas presentes en humanos SIRT1-7 (Códigos Uniprot: Q96EB6, Q8IXJ6, Q9NTG7, Q9Y6E7, Q9NXA8, Q86T7, Q9NRC8 respectivamente) y en parásitos protozoarios: *TbSir2rp1* (*Trypanosoma brucei*), *PfSIR2A* (*Plasmodium falciparum*) y *LiSIR2rp1* (*Leishmania infantum*) (Códigos Uniprot: Q57V41, Q8IE47 y **Q8I6E4** respectivamente). Para los alineamientos múltiples se empleó: el servidor T-COFFEE³⁶ y para su visualización fue empleado el programa Geneious version 6.1.6³⁷ o el algoritmo *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) presente en el programa CLC Free Workbench versión 7.6. En la identificación de dominios funcionales se empleó servidor CDD³⁸ disponible en NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>. Las estructuras terciarias se predijeron mediante el servidor I-TASSER³⁹, para la visualización y comparación de estructuras se empleó el programa UCSF Chimera⁴⁰. La validación de los modelos empleando el gráfico de Ramachandran, se realizó mediante el servidor RAMPAGE⁴¹: <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>.

4.2.1.2 Clonación de los genes en el vector pET100/D-TOPO®

Los productos de PCR obtenidos con *Pfu polimerasa* de cada uno de los candidatos, se purificaron empleando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System de Promega y se cuantificaron por densitometría empleando el marcador 1Kb GeneRuler™. La reacción de ligación entre el producto de PCR con el vector de expresión pET100/D-TOPO®, se realizó bajo las siguientes condiciones: 1-5 ng Producto de PCR, 1 µL de solución salina (1,2 M NaCl y 0,06 M MgCl₂), 1 µL de vector pET100/D-TOPO®, la reacción se llevó a un volumen final de 6 µL completando con H₂O DEPC. Se mezcló y se incubó durante 30 minutos a 22°C la reacción.

4.2.1.3 Trasformación de células químicamente competentes

Con la reacción de ligación obtenida se transformaron células *E. coli* One Shot Top10 químicamente competentes por choque térmico⁴³ de la siguiente manera: A 50 µL de células competentes se agregó 3 µL de reacción de ligación, mezclando suavemente, la mezcla se incubó a 4 °C durante 30 minutos, pasado este tiempo, las células fueron sometidas a choque térmico de 42 °C por 30 segundos y nuevamente llevadas a 4 °C, 2 minutos. A esta mezcla se le adicionó 250 µL de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM glucosa) (volumen final de 300 µL) y se incubó a 37°C en agitación constante durante 1 hora. Las células transformadas fueron extendidas en cajas con medio agar LB suplementado con ampicilina (100µg/mL) e incubadas a 37°C durante 12 horas.

4.2.1.4 Evaluación de colonias por PCR

La verificación de la adquisición de los plásmidos recombinantes se llevó a cabo por PCR de colonia empleando la *Taq polimerasa*. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: MgCl₂ 1,5 mM, primers 0,2 µM de cada uno, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 0,2 mM cada uno, Buffer PCR 1x (10 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM de KCl y Tritón X-100 al 0,1%), *Taq DNA polimerasa* 2.5 U. Para cada uno de los candidatos se emplearon los ciclos térmicos descritos en el numeral 4.2.1.1. Los controles negativos tuvieron como plantilla H₂O DEPC y los positivos gDNA. Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa 1% p/v en buffer TBE 0,5X y documentados como se mencionó anteriormente⁴³.

4.2.1.5 Purificación de plásmidos recombinantes por lisis alcalina y evaluación por PCR

La extracción de los plásmidos recombinantes de las células transformadas se realizó por lisis alcalina⁴³ de la siguiente manera: inicialmente se realizó un inóculo bacteriano en 10 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100µg/mL) el cual cultivó por 12 horas a 37°C, las células fueron obtenidas por centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos, luego se resuspendieron en 300 µL de una solución de glucosa 50 mM; Tris 25 mM; EDTA 10 mM pH 8 por 5 minutos a 4°C y se les adiciono 300µL de una solución de 0,2 N NaOH; 1% SDS, para lisar las células, la lisis se neutralizó empleando acetato de potasio a pH 4,8. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante fue incubado a 37°C durante 30 minutos con 2µL de RNAasa A. Se adicionó a esta mezcla 1 volumen de PHOH/CHCl₃/alcohol isoamílico (25:24:1) mezclando por inversión. Se centrifugo a 11000 rpm por 5 minutos (se descartó la fase acuosa y la interfase). Se adicionó 2,5 volúmenes de EtOH absoluto (96%) frío y 1/10 del volumen de Na⁺CH₃COO⁻ 3M pH 5,2. Para precipitar el plásmido se incubó a -80°C durante 42 horas. Se centrifugó a 12000 rpm 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con ETOH absoluto y se centrifugó a 12000 rpm, luego se resuspendió en 50µL de H₂O DEPC. Los plásmidos obtenidos fueron empleados como plantillas en reacciones de PCR con *Taq Pol*, bajo las condiciones descritas en el numeral 4.2.14, los amplificados obtenidos se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% p/v en buffer TBE 0,5X.

4.2.1.6 Evaluación por enzimas de restricción de los plásmidos recombinantes pET100-GdSir2.1 y pET100-GdSir2.2

Para determinar la presencia de plásmidos recombinantes o del vector pET100/D-TOPO vacío se monitoreo con digestión empleando la enzima de restricción EcoRV (Thermo Fisher), la reacción se dejó a 37 °C durante 12 horas y la digestión fue evaluada con electroforesis en gel de agarosa 0.8 % p/v en buffer TBE 0,5X⁴³.

4.2.2 Construcción del plásmido pMAL-C5X-GdSir2.2

Para la clonación del candidato GdSir2.2 en el vector pMAL C5X (New England Biolabs), Inicialmente, el fragmento génico GdSir2.2 se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega) y luego se realizó una subclonación al vector de expresión pMAL C5X.

Para la subclonación, se realizó la amplificación por PCR del candidato GdSir2.2 usando gDNA como plantilla y la enzima *Taq polimerasa*. Los “*primers*” usados fueron: **Directo**; (dNotI GdSir2.2): 5´ATAAGAATGCGGCCGCCATGAAATCGGCTCTCG3´ y **Reverso**; (rSall GdSir2.2): 5´GCGTGTCGACTTACTGGCGGATCGG3´, los cuales otorgan sitios de restricción para las enzimas NotI y Sall respectivamente. Las condiciones de la PCR y el ciclo térmico para GdSir2.2 son descritos en el numeral 4.2.1.4 y 4.2.1.1 respectivamente.

El producto de PCR obtenido se evaluó por electroforesis en agarosa y se subclonó en el vector pGEM-T Easy de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega). El producto de la ligación se transformó por choque térmico a células Top10 de acuerdo al numeral 4.2.1.3, las células fueron extendidas en cajas de cultivo LB Agar suplementadas con ampicilina (100µg/mL), Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (0.5 mM) y X-Gal (80 µg/mL) e incubadas a 37°C durante 12 horas. Las células blancas y azules obtenidas fueron evaluadas por PCR empleando los primers arriba mencionados de acuerdo al numeral 4.2.1.4.

Los plásmidos recombinantes pGEM-T Easy-GdSir2.2 obtenidos por lisis alcalina y verificados por PCR (numeral 4.2.1.5), junto al vector pMAL C5X vacío, se sometieron a doble digestión con las enzimas de restricción NotI y Sall por 16 horas a 37°C (Thermo Fisher), la efectividad de la digestión se verificó por electroforesis en agarosa-TBE 0.8% (p/v). El inserto GdSir2.2 y el vector linealizado se purificaron usando el kit comercial DNA Gel Extraction® de acuerdo a las condiciones del fabricante (Millipore) y se ligaron empleando la enzima T4 ligasa (Thermo Fisher), el producto de ligación se transformó por choque térmico a células Top10 (numeral 4.2.1.3). Los plásmidos recombinantes se purificaron por lisis alcalina y se evaluaron por PCR (numeral 4.2.1.5).

4.2.3 Expresión y purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas recombinantes

4.2.3.1 Expresión de las proteínas Hisx6-GdSir2.1, Hisx6-GdSir2.2 y MBP-GdSir2.2

Con los plásmidos recombinantes (pET 100-GdSir2.2, pET100-GdSir2.2 y pMAL C5X-GdSir2.2), se transformaron por choque térmico (numeral 4.2.1.3) células de expresión *E. coli* One Shot BL21 DE3 (Thermo Fisher). Las células individualmente se inocularon y cultivaron en medio LB suplementado con ampicilina (100mg/L) y glucosa al 1% a 37 °C durante 16 horas. Con estos inóculos se realizó una dilución 1:100 en LB+ampicilina+glucosa y la inducción de la expresión de la proteínas se realizó al alcanzarse una OD_{600nm} de 0.5-0.6 con 0.3, 0.5 o 1 mM de IPTG a 18, 25 o 37°C. Se colectaron alícuotas de las células a las 0, 2, 4, 6, 8, o 16 horas postinducción y se les midió en cada tiempo absorbancia a OD_{600nm}, con el fin de normalizar por número de células las comparaciones entre cada tratamiento. Finalmente se colectaron por centrifugación a 6000 rpm x 15 min a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y se determinó peso húmedo de las células⁴³.

4.2.3.2 Lisis celular

Los pellets de células obtenidos fueron resuspendidos en el buffer lisis (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 400mM, KCl 100mM, 10% glicerol, 0.5% Tritón X-100 pH 8,0.) a una relación de 5 mL de buffer por gramo de células húmedas, se adiciono lisozima a una concentración final de 1 mg/μL y se incubaron en agitación contante a 4 °C por 1h. Luego las células fueron lisadas en ausencia de inhibidor de proteasas por sonicación durante 5 min (50% amplitud, 15 s pulso y 15 s reposo) y se centrifugó la muestra a 12000 rpm x 20 min a 4 °C, se separó y conservó el sobrenadante (Fracción soluble) y el pellet (Fracción insoluble)^{43,44}.

4.2.3.3 Monitoreo por SDS-PAGE⁴⁵ y western blot⁴⁶ de la expresión

Las células sin lisar y las fracciones solubles e insolubles, fueron resuspendidas y desnaturalizadas en buffer de carga para SDS-PAGE 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, Glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v), β -mercaptoetanol 100 mM) y calentadas por 15 min a 92 °C. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de acrilamida con un gel concentrador de T-3.9% y separador de T-12%, la corrida electroforética se llevó a 110 V. Las bandas fueron visualizadas por tinción con azul de coomassie R-250⁴⁷.

Para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes por western blot (wb), las muestras separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Fisher) aplicando 200 mA por 2 horas o a 20 mA toda la noche, en buffer de transferencia (Tris 25mM pH 8,3, Glicina 192 mM y Metanol 10 % (V/V))⁴⁸. La membrana fue bloqueada por 2 h con TBS (150 mM NaCl, and 20 mM Tris/HCl pH 7.5) con leche descremada a una concentración de 5% (P/V)⁴⁹. Para la inmunodetección de la proteína recombinante se emplearon anticuerpos primarios anti-Hisx6 (1:5000) junto anticuerpos secundarios anti-ratón IgGs conjugados a biotina (1:8000) y fosfatasa alcalina (1:3000) en TBS o anticuerpos primarios anti-MBP (1:6000) junto con anticuerpos anti-conejo IgGs conjugados a biotina y fosfatasa alcalina en TBS a las concentraciones ya mencionadas⁴⁷. Las membranas fueron reveladas con los sustratos cromogénicos BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt) y NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) en el buffer de reacción (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM) y la reacción se detuvo colocando de las membranas en H₂O destilada¹¹.

4.2.3.4 Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.

La proteína Hisx6-GdSir2.1 presente en la fracción soluble de la lisis celular, se sometió a cromatografía de afinidad a Ni²⁺ (Qiagen). *Unión*: se empleó 1.5 mL de fracción soluble por cada mililitro de resina ProBond™ Nickel-Chelanting (Thermo Fisher) previamente equilibrada en buffer de lisis. La resina y el extracto soluble se incubaron por una hora a 4 C° y agitación constante. La cromatografía se realizó en columna y la resina fue lavada con 6 volúmenes de buffer de lisis suplementado en gradiente con 35, 75 o 150 mM de

imidazol y la proteína se eluyó en el mismo buffer con 300 mM de imidazol, los eluidos obtenidos se dializaron y almacenaron con glicerol al 10% a -80 °C⁴⁷.

La proteína MBP-GdSir2.2 se purificó por cromatografía afinidad a amilosa (New England BioLabs). La resina de amilosa previamente equilibrada en buffer de lisis sin imidazol y la fracción soluble se incubó una hora a 4 °C en agitación constante. La purificación se realizó en columna, se realizaron 10 lavados con buffer de lisis y se eluyó la proteína recombinante en el buffer suplementado con 20 mM de maltosa⁵⁰.

Los procesos de expresión y purificación de las proteínas recombinantes fueron evaluados por SDS-PAGE (numeral 4.2.3.3).

4.2.4 Efecto de las condiciones de inducción en la solubilidad GdSir2.2

Para el valorar el efecto de las condiciones de inducción en la solubilidad de la recombinante Hisx6-GdSir2.2, las células BL21 DE3 transformadas por choque térmico con el vector recombinante pET100-GdSir2.2 (42 °C 30 s), fueron sometidas a ensayos de expresión como en el numeral 4.2.3.1, empleando concentraciones finales de 0,5 o 1 mM de IPTG y 25 o 37 °C como temperaturas de inducción. Las células se colectaron a las 0, 2, 4 y 16 h (ON) y fueron lisadas de acuerdo al numeral 4.2.3.2. Las fracciones solubles e insolubles obtenidas se evaluaron por SDS-PAGE gel separador 12% y wb anti-Hisx6⁴³.

4.2.5 Coexpresión de Hisx6-GdSir2.2 con proteínas chaperonas

Células BI21 DE3 fueron transformadas por choque térmico inicialmente con el vector comercial PG-KJE8 (Takara BIO INC.), con ellas se realizaron células competentes por el método de cloruro de calcio³⁵, la cuales fueron luego transformadas por choque térmico con el vector recombinante pET100-GdSir2.2. Un inóculo de estas células co-transformadas con ambos vectores y se cultivaron por 16 h a 37°C en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (50 µg/mL) y glucosa 1%, se empleó para la expresión de la proteína recombinante de interés. Con este inóculo se realizó una dilución 1:100 en medio nuevo y se favoreció la expresión de la proteínas chaperonas adicionando arabinosa

(1 mg/mL) y tetraciclina (10 ng/mL), las células se cultivaron hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.5 y la inducción de la proteína Hisx6-GdSir2.2 se realizó a 37 °C adicionando IPTG una concentración final de 1 mM. Se tomaron alícuotas de cultivo normalizadas por número de células a las 0, 2, 4 y 16 h (ON) postinducción y se lisaron por sonicación⁵¹. Las fracciones solubles e insolubles obtenidas se monitorearon por SDS-PAGE y wb anti-Hisx6 (numeral 4.2.3.3).

4.2.6 Evaluación de la cepa de expresión en la solubilidad Hisx6-GdSir2.2

El plásmido recombinante pET100-GdSir2.2 fue empleado para transformar por choque térmico células de expresión BI21 Codón Plus DE3 (Agilent) o Shuffle T7 Competent (NEB BioLabs). Las células Codón plus fueron cultivadas en LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (50 µg/mL) y glucosa 1%. Las células Shuffle por su parte fueron cultivadas en LB-ampicilina-glucosa. Ambas células se cultivaron hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ entre 0.5 y 0.6. Las células Codón plus y Shuffle fueron inducidas con 1 o 0,3 mM de IPTG y 22 o 37 °C respectivamente y se colectaron a las 0, 2, 4, 6, y 16 h como se especifica en las respectivas figuras. Las células fueron lisadas como en el numeral 4.2.3.2 y la lisis celular se monitoreo por SDS-PAGE y wb Anti-Hisx6⁴³.

4.2.7 Renaturalización a partir de cuerpos de inclusión de la Hisx6-GdSir2.2

Para llevar a cabo ensayos de renaturalización, células Shuffle transformadas con el vector pET100-GdSir2.2, fueron inducidas por 16 h con una concentración final de 1mM de IPTG. Las células fueron lisadas por sonicación como en el numeral 4.2.3.2 (lisis celular). La fracción insoluble obtenida se resuspendió por acción mecánica empleando un homogenizador de embolo y buffer de resuspensión (20mM fosfatos pH 7.5, 500 mM NaCl y 8 M de urea). La muestra se sometió a centrifugación (8000 rpm x 10 min), para eliminar agregados proteicos sin disolver y evitar taponamiento de la columna. El sobrenadante obtenido del paso anterior se incubó con la resina ProBond™ Nickel-Chelanting (Thermo Fisher) por 1 h a 4 °C y agitación constante, la suspensión fue transferida a una

microcolumna y lavada con el buffer de resuspensión suplementado con 75 mM de imidazol. La resina en la columna fue lavada con buffers de resuspensión con concentraciones decrecientes de urea separados por 0,5 M de urea cada uno, desde una concentración inicial de 8 M hasta una final de 0,5 M de urea. Para la elución se empleó buffer fosfatos 20 mM, 500 mM NaCl sin urea y suplementado con 150 o 300 mM de imidazol⁵².

4.2.7.1 Estandarización de las condiciones de elución de Hisx6-GdSir2.2

Para mejorar la obtención de proteína recombinante renaturalizada, se evaluó el efecto de modificaciones y suplementos al buffer fosfato (20mM fosfatos pH 7.5, 500 mM NaCl, 0,3 mM imidazol) empleado en la elución. Se valió el efecto del aumento en la fuerza iónica (1 mM NaCl), aumento en la concentración de imidazol (0.5 o 1 M), modificación de pH (pH 4.5) y adición de ZnCl₂.

Se realizó la elución de la proteína de con buffer suplementado con 0,5 y 1 M de imidazol, los eluidos obtenidos fueron concentrados mediante filtros Amicom de 10 kDa (EMD Millipore) y sometidos a diálisis a 4 °C por 16 h.

4.2.8 Ensayos de deacetilación

GdSir2.1: La fracción soluble de células BI21 DE3 transformadas y sin transformar, junto con la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.1, fueron sometidas a un ensayo de deacetilación empleando el kit CycLex® SIRT2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit Ver.2 de acuerdo a las condiciones del fabricante (CycLex), la excitación se llevó a cabo a 488nm y la lectura de fluorescencia a 521nm, para la detección de la fluorescencia se empleó el equipo CFX96 Touch *Real-Time* PCR Detection System (BioRad), la reacción llevo a cabo a 37 °C y se monitoreó en el tiempo haciendo medición de fluorescencia cada 30 s por un tiempo total de 1 h.

GdSir2.2: La fracción soluble de células BI21 DE3 transformadas con pMAL C5X-GdSir2.2 y sin transformar, junto a la proteína MBP-GdSir2.2, fueron sometidas a ensayos de

deacetilación empleando el kit comercial CycLex® SIRT2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit Ver.2, en las mismas condiciones ya mencionadas.

Para medir el efecto del buffer de deacetilación sobre la actividad de la proteína GdSir2.2 anclada en la resina ProBond™ Nickel-Chelating (Thermo Fisher), se evaluaron los siguientes buffers: Buffer de deacetilación SIRT1 Kit Cyclex; Buffer de deacetilación SIRT2 Kit Cyclex; Buffer Sirtuina 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂); Buffer HDAC (10mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM NaCl); Buffer de deacetilación SIRT2 (50mM Tris-HCl pH 9.0, 4 mM MgCl₂, 0,2 mM DTT) y Resina sola (control negativo).

La proteína obtenida del proceso de renaturalización (numeral 4.2.7.1), fue sometida a ensayos de deacetilación bajo las condiciones ya mencionadas en el buffer de deacetilación empleado para la SIRT1 humana (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂).

4.3 Aproximación in vivo

4.3.1 Generación, obtención y caracterización de IgGs policlonales murinos e IgYs policlonales aviares

Para la obtención de las proteínas Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2 necesarias como antígenos para la producción de anticuerpos, células BL21 DE3 fueron inducidas con 1 mM de IPTG por 16 h a 37 °C y la fracción insoluble obtenida por lisis celular (numeral 4.2.3.1), la cual contiene los cuerpos de inclusión fue resuspendida mecánicamente en el buffer de lavado 1 (100 mM Tris-HCl pH 7.0, 5mM EDTA, 5 mM Ditioneitol, 2 M de urea, 2% v/v Tritón X 100) a 4 °C por 20 min, con el fin de retirar detritos celulares y proteínas contaminantes provenientes de la células *E. coli* BL21 DE3, la solución obtenida se centrifugó a 12000 rpm por 30 min y el pellet obtenido se sometió a este procedimiento 2 veces⁵³.

El pellet obtenido tras el tercer lavado, se homogenizó a 4 °C por 20 min en el buffer de lavado 2 (100 mM Tris H-Cl pH 7.0, 5 mM de EDTA, 5 mM DTT) y se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4 °C. El pellet obtenido fue homogenizado y resuspendido en el buffer 3

(50 mM TrisHCl pH 7.0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 8 M cloruro de guanidinio), se centrifugó a 14000 rpm durante 1 h a 4 °C. El pellet obtenido se descartó y el sobrenadante fue sometido a diálisis por 24 horas en 2 L de buffer 50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM de NaCl en ausencia de cloruro de guanidinio⁴³. El producto obtenido de la diálisis fue sometido a centrifugación a 12000 rpm por 30 min a 4 °C y el pellet obtenido fue almacenado a -20 °C⁵³.

4.3.1.1 Purificación de las proteínas recombinantes Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2 mediante SDS-PAGE preparativo

Para la purificación de las proteínas, el pellet obtenido por centrifugación del dializado anterior fue sometido a electroforesis SDS-PAGE preparativa para obtener las proteínas con una mayor pureza. El pellet de cada uno de los procesos de purificación de las proteínas, fue resuspendido en PBS, se le adicionó buffer de carga y se desnaturalizó a 92 °C por 15 min. Estas muestras fueron posteriormente separadas en un gel de acrilamida (T-10 %) con un tamaño de 16 x 19 cm. Transcurrida la corrida electroforética y con ayuda de marcador de peso molecular preteñido, se identificaron las bandas de acrilamida con el tamaño aproximado para cada una de las proteínas recombinantes. Estas bandas fueron sometidas a trituración y elución con agua desionizada. El sobrenadante con las proteínas de interés fue cuantificado empleando Bradford con BSA como patrón y la pureza se evaluó mediante SDS-PAGE⁵³. Las proteínas recombinantes Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2 purificadas, fueron empeladas como antígeno y se inocularon a ratones hembra *Mus musculus* BALB-C y gallinas Babcock Brown³⁵.

4.3.1.2 Producción de anticuerpos aviares anti-Hisx6-GdSir2.1: Esquema de Inmunización

El proceso de inoculación de las gallinas se realizó en la zona de la pechuga, se emplearon 2 individuos (Gallina control; PBS y gallina tratamiento; Proteína Hisx6-GdSir2.1), las gallinas fueron inoculadas en cuatro ocasiones; la primera empelando adyuvante completo de Freund y las 3 restantes adyuvante incompleto de Freund con relaciones 1:1 (v/v) de adyuvante y PBS o Hisx6-GdSir2.1 (Tabla 4-1). La gallina inoculada con PBS, fue empelada para la obtención del suero no relacionado⁵³.

Tabla 0-1: Esquema de inmunización hembras Babcock Brown con la proteína recombinante His-GdSir2.1

Inoculación No.	Gallina tratamiento				Gallina control			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Día	0	15	22	40	0	15	22	40
Adyuvante	C	I	I	I	C	I	I	I
Antígeno desnaturalizado (µg)	~100	~100	~100	~100	-----	-	-	-
Vol. de inyección (µl)	300	300	300	300	300	300	300	300

4.3.1.3 Producción de anticuerpos murinos anti-Hisx6-GdSir2.2: Esquema de Inmunización.

El proceso de inoculación de los ratones se realizó vía intraperitoneal empelando 3 individuos por tratamiento (*Tratamiento 1:* Control, *Tratamiento 2:* Proteína Hisx6-GdSir2.2). En el esquema de inmunización (Tabla 4-2): Cada individuo fue inoculado con el antígeno correspondiente cada 8 días hasta completar un total de 4 inoculaciones. En la primera de estas inoculaciones se empleó una mezcla homogénea (1:1 en volumen) de antígeno y adyuvante completo de Freund y en las restantes tres inoculaciones se emplearon mezclas homogéneas (1:1 en volumen) de antígeno y adyuvante incompleto de Freund. Como control de inmunización se empleó una mezcla homogénea (1:1 en volumen) de PBS y el adyuvante correspondiente (completo o incompleto). El control fue empleado para la obtención de suero no relacionado³⁵.

Tabla 0-2: Esquema de inmunización de hembras *Mus musculus* con la proteína recombinante His-GdSir2.2.

Inoculación No.	Ratón tratamiento				Ratón control			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Día	0	8	16	24	0	8	16	24
Adyuvante	C	I	I	I	C	I	I	I
Antígeno desnaturalizado (µg)	~ 50	~ 50	~ 50	~ 50	-----	-	-	-
Vol. de inyección (µl)	300	300	300	300	300	300	300	300

4.3.1.4 Obtención y evaluación de sueros

La toma de las muestras de sangre de gallinas y ratones se llevó a cabo simultáneo a las inoculaciones y 15 días luego de la última inoculación. Al finalizar el esquema de inmunizaciones se obtuvo el suero final de los individuos. Cada una de las muestras se sometió a centrifugación luego de dejar coagular la sangre a 37°C durante media hora y el sobrenadante obtenido con los anticuerpos policlonales se almaceno y se conservó a -80°C con glicerol al 10% (v/v)³⁵.

4.3.1.5 Caracterización de los sueros obtenidos sobre las proteínas recombinantes.

Los anticuerpos obtenidos se caracterizaron empleando las recombinantes Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2 purificadas.

Los sueros preinmune, no relacionado e inmune aviares obtenidos se evaluaron por western blot contra 100 ng de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.1. Los anticuerpos fueron purificados por afinidad empleando la proteína recombinante⁵⁴, y se evaluó su capacidad de reconocer cantidades diferentes de proteína recombinante (50, 25, 12.5, 6.25 y 3 ng) a una dilución constante de 1: 3000 anticuerpo-TBST.

Los sueros murinos anti-Hisx6-GdSir2.2 obtenidos se evaluaron por western blot, se realizaron diluciones de los sueros inmunes (1:2500- 1:10000) manteniendo una concentración fija de 200ng de proteína recombinante. Se evaluó además la capacidad de detección por parte de los sueros a diferentes concentraciones de antígeno (100, 50, 25, 12.5 y 6.25 ng), manteniendo la misma dilución de anticuerpo en TBS-T (Buffer Salino Tris,

Tween-20 al 0.1% V/V). Con el fin de evitar interferencias en el proceso de inmunofluorescencia, los anticuerpos murinos (IgG) se purificaron por afinidad empleando la proteína recombinante⁵⁴ y se evaluó su capacidad de reconocer 10ng de la misma.

4.3.2 Inmunodetección de las proteínas endógenas en extractos de *G. duodenalis*

Para llevar a cabo el proceso de inmunodetección de la sirtuina se partió de un cultivo *in vitro* de trofozoítos de *Giardia* (WB Clon C6) en medio TYI- S-33 suplementado con 10% de suero bovino y 0,5 mg/mL de bilis bovina⁵⁵. El medio fue suplementado con penicilina y estreptomicina. Se cultivaron tubos con células a fase logarítmica media, luego cada tubo se llevó a 4°C sobre hielo y las células se colectaron por centrifugación y lavaron 3 veces con PBS, el pellet final fue cuantificado en cámara de Neubauer. Las células fueron empleadas en la preparación de extractos proteicos totales por resuspensión de los parásitos en buffer de carga para SDS-PAGE 1X y calentamiento a 92 °C⁵⁶. El extracto proteico se sometió a SDS-PAGE y luego western blot para la inmunodetección de las GdSir2.1 y GdSir2.2 endógenas, empleando los anticuerpos policlonales aviares y murinos obtenidos.

4.3.3 Determinación de la localización subcelular por Inmunofluorescencia

Para la determinación de la localización de las proteínas GdSir2.1 y GdSir2.2 se empleó el protocolo realizado por Alvarado 2009 con algunas correcciones⁵⁶, las células obtenidas por centrifugación lavaron 3 veces con PBS. El pellet de células obtenido se resuspendió en PBS (1500 parásitos/ μ l) y se dejó unir las células a la superficie de una lámina de vidrio (30 minutos a 37°C). Las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se bloquearon y permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5% y BSA al 3% en PBS, durante 16h a 4°C. Las células fijas y permeabilizadas se incubaron con el anticuerpo primario, correspondiente a dilución de los sueros IgY o IgG en PBS, por 3 h a 37°C y luego se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgG acoplado a Alexa Fluor 488 (Abcam) a una dilución de 1:2000 y anti-gallina acoplado a FITC (Sigma) a una dilución de 1:200 en PBS durante 2 hora en la oscuridad a 37 °C. Los núcleos fueron marcados con 4',6-diamidino-2-fenilindol

(DAPI) 1µg/µl, por 5 min a temperatura ambiente (~22 °C)⁵⁷. Se observaron y registraron las imágenes con en el microscopio de fluorescencia Nikon C1 plus confocal Nikon C1 Plus ECLIPSE Ti y se analizaron con el software NIS elements AR, con un objetivo de 20X, 40X y 100X.

4.3.4 Evaluación de la expresión de las GdSir2.1 y GdSir2.2 durante la enquistación

4.3.4.1 Detección de la actividad transcripcional de GdSir2.1 y GdSir2.2 en trofozoítos.

4.3.4.1.1 Extracción de RNA de *G. duodenalis*.

Se cultivaron trofozoítos para la extracción de ARN. Se adicionaron 700 µl de Trizol a 60x10⁶ parásitos, los cuales se resuspendieron e incubaron durante 30 min a 25°C, luego se adicionó 140 µl de cloroformo, mezclando e incubando durante 2-3 minutos a 25°C, se centrifugó a 14000 rpm 15 minutos a 4°C. El ARN en la fase acuosa fue precipitado con 350 µl de alcohol isopropílico previamente frío, incubando 30 min a 25°C. El pellet obtenido se lavó con 700 µl etanol al 75% y se centrifugo a 8000g por 5 minutos a 4°C. Finalmente el ARN fue resuspendido en agua DEPC. Este RNA fue empelado como plantilla para la síntesis de cDNA⁵⁸.

Tabla 0-3: Primers diseñados para la detección por RT-PCR de las GdSir2.1 y GdSir2.2.

Primer	Secuencia	Longitud (pb)	Tm (°C)	%GC	Amplificado esperado
Primers / Gen GdSir2.1					
Directo	5'- CACCATGCCTGCTAATTAT -3'	19	54	42.1	980 pb
Reverso	5'-TCATTTACCTGAAGGCTC-3'	18	51	44.4	
Primers Gen GdSir2.2					
Directo	5'- CACCATGAAATCGGCTCTCGAAG -3'	23	75	52.2	350 pb
Reverso	5'- GGAAGCTTCAAGCCCAGGTCAG -3'	22	60.3	59.1	
Primers Gen Dineína-Cadena liviana					
Directo	5'- CGCGGATCCATGAATCCTAACGAGATCAAC-3'	30	61.9	50	550 pb
Reverso	5'- ATAAGAATGCGGCCGCCTAGCACATTGGCAGTACCAATC- 3'	39	68	51.3	

4.3.1.1.2 Producción de cDNA y detección de GdSir2.1 y GdSir2.2 por PCR.

El RNA obtenido (2 µg), fue incubado con 2 U DNAsa I (RQ1, Promega) a 22 °C por 20 min. El RNA luego fue sometido a calentamiento a 70 °C por 5 min. Para la síntesis de cDNA fue empleado el sistema de retrotranscripción ImProm-II (A3800, Promega) y oligo DT (0,5 µg/reacción). En la síntesis se emplearon las siguientes condiciones: Anillaje; (ARN y Oligo DT) a 25 °C durante 5 min. Retrotranscripción a 42°C durante 60 min. Desnaturalización de la retrotranscriptasa a 70 °C durante 15 min. El cDNA sintetizado fue almacenado a -20 °C. Posteriormente, se realizó la reacción de PCR usando el cADN sintetizado, siguiendo las condiciones de PCR: GdSir2.1; T° desnaturalización 95°C, Anillamiento 55°C y Extensión 72°C. GdSir2.2; T° desnaturalización 95°C, Anillamiento 55°C y Extensión 72°C. Dineína (cadena liviana); T° desnaturalización 95°C, Anillamiento 55°C y Extensión 72°C, con

primers diseñados para este proceso (Tabla 4-3). Finalmente el amplificado se monitoreo con un gel de Agarosa-TBE al 1.5% (p/v).

4.3.4.2 Sincronización de parásitos: Enquistación.

La enquistación se llevó a cabo tomando trofozoítos en fase media de crecimiento y exponiéndolos a una alta concentración de bilis y un pH levemente alcalino. Preinóculos parásitos (1×10^6 células) cultivados medio normal de crecimiento TYI-S-33 fueron cultivados por 72h y sometidos al estímulo de enquistación por adición del medio de enquistación (TYI-S-33 pH 7.8, suplementado con 10 mg/ml de bilis bovina). Luego de la inducción se colectaron parásitos a las 0, 6, 12 y 24 horas después del estímulo. A las 24 horas de enquistación se retornó los parásitos a medio normal de crecimiento (TYI-S-33) y se continuó su crecimiento por 24 h, luego de este periodo de tiempo fueron sometidos a lisis hipotónica en agua MiliQ durante 24 h más para eliminar células con enquistación incompleta. Para cada uno de estos tiempos las células fueron centrifugadas a 2500 rpm, lavadas en tres ocasiones con PBS y contadas en cámara de Neubauer. Los pellets se almacenaron a -20°C ⁵⁹.

4.3.4.3 Evaluación de los niveles de expresión proteica de GdSir2.2 en la enquistación.

Las células contadas fueron resuspendidas en buffer 1X para SDS-PAGE como en el numeral 4.3.2. Los extractos proteicos totales obtenidos, fueron cargados en un gel de acrilamida T-12%, electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa, bloqueada con BSA 3% por 16 h en agitación constante. Sobre esta membrana se llevaron a cabo reconocimientos empleando los anticuerpos:

- Anticuerpos policlonales murinos anti-Hisx6-GdSir2.2 (diluciones 1:1500 y 1:3000 x 3h), anti-ratón Biotina (1:10000 x 1h), fosfatasa alcalina (1:3000 x 30 min)
- Anticuerpos policlonales de conejo anti-gCaM (dilución 1:2000 x 1h), anti-conejo Biotina (1:2000 x 1h), fosfatasa alcalina (1:3000 x 30 min)⁴³.

5. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos así como la discusión alrededor de ellos, se detalla a continuación y estará dividida en tres bloques: el primero de estos orientado a los resultados obtenidos en la sección bioinformática, el segundo a los encontrados en la aproximación *in vitro* y, como tercer bloque, los encontrados en la aproximación *in vivo* realizada.

5.1 Aproximación bioinformática de los candidatos a sirtuina GdSir2.1 y GdSir2.2 de *G. duodenalis*

Con el objetivo de caracterizar de manera bioinformática los candidatos a sirtuinas GdSir2.1 y GdSir2.2 de *G. duodenalis*, inicialmente, se realizó una búsqueda de dominios conservados en sus secuencias de aminoácidos, mediante el servidor CDD del NCBI, con esta búsqueda se identificó dentro de ambas secuencias un dominio conservado perteneciente a la superfamilia SIR2 característico de las sirtuinas, el cual presenta una longitud aproximada de 275 aa²³. Para el candidato GdSir2.1, se especifican sitios de unión al sustrato, sitios de unión al NAD⁺ y sitios de unión a zinc (Anexo 1 A y B).

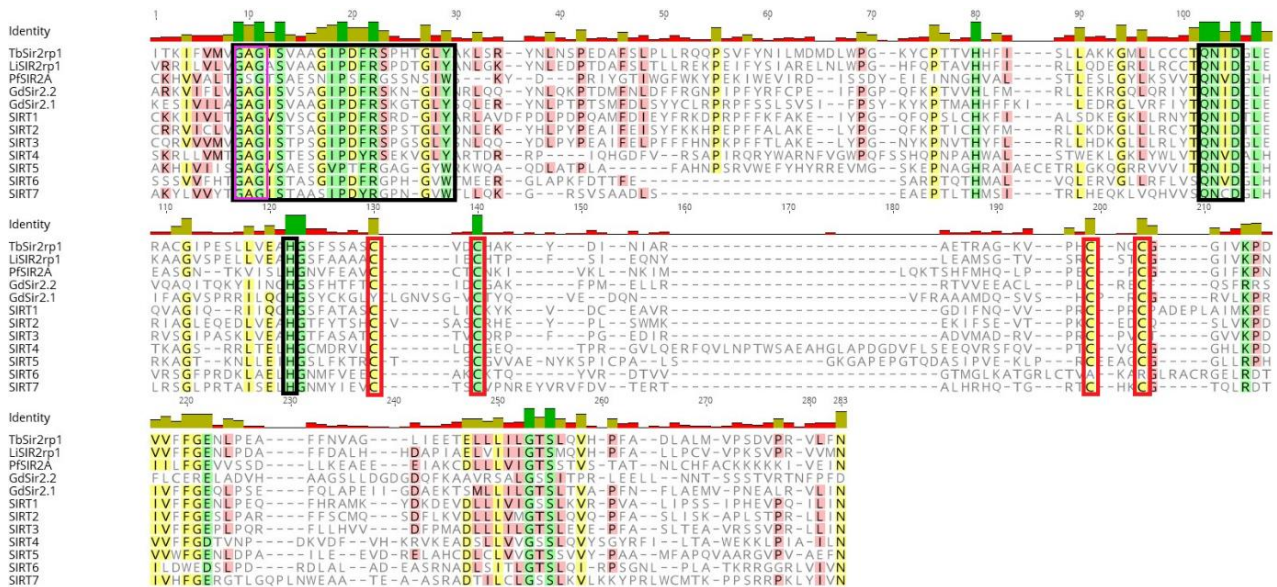
Para continuar con la caracterización e identificación de regiones conservadas a nivel de estructura primaria, se realizaron alineamientos múltiples empleando los algoritmos ClustalW y MUSCLE entre los dominios sirtuina de los candidatos, las 7 sirtuinas presentes en humanos y algunas sirtuinas de parásitos protozoarios. Estos alineamientos permitieron identificar en ambos candidatos la presencia de secuencias conservadas, algunas de las cuales se conoce que están involucradas en la unión al NAD⁺, como el motivo G-X-G; el cual es importante para interacción de los grupos ribosa de esta molécula y la sirtuina^{60,61}. Otra de las características observadas en esta familia de proteínas es la presencia de cuatro

residuos de cisteína muy conservados e involucrados en la unión a zinc (Motivo: Cys-X₂₋₄-Cys-X₁₅₋₄₀-CysX₂₋₄-Cys)⁶² (Fig. 5-1 y Anexo 2).

Además del dominio sirtuina conservado presente en los candidatos, en éstos se encuentran regiones N- y C-terminales las cuales presentan baja identidad respecto a las secuencias ortólogas (Anexos 1 y 3), es conocido que estas regiones fuera del centro catalítico de las sirtuinas, se caracterizan por ser poco conservadas a lo largo de la familia⁶¹, lo cual explica la baja similitud encontrada en estas regiones al realizarse alineamientos entre las secuencias de aminoácidos completas (Anexo 3). Estas regiones terminales en las sirtuinas han sido poco caracterizadas estructuralmente, debido a que la mayoría de las estructuras resueltas por cristalización carecen de ellas. No obstante, se conoce que juegan papeles importantes en regulación de la actividad catalítica⁶³ y que son blanco de modificaciones postraduccionales tales como; fosforilaciones⁶⁴, metilaciones y sumoilaciones, las cuales regulan tanto la actividad enzimática⁶⁵ como la localización subcelular⁶⁶ de estas proteínas. Por tanto, el estudio a futuro de estas regiones, podría ser relevante para dilucidar los mecanismo regulatorios de estas proteínas en *G. duodenalis*.

Figura 5-1: Las estructuras primarias de las GdSir2.1 y GdSir2.2 presentan características conservadas de la familia Sirtuina.

Alineamiento múltiple entre las secuencias de aminoácidos que componen el dominio sirtuina presente en las GdSir2.1 y GdSir2.2 de *G. duodenalis*, sirtuinas humanas (SIRT1-SIRT7), TbSir2rp1 (*T. brucei*), PfSIR2A (*P. falciparum*) y LiSIR2rp1 (*L. infantum*). Recuadro negro: Residuos involucrados en la unión a NAD⁺. Recuadro magenta: Motivo GAG. Recuadro rojo: Residuos de cisteína involucrados en unión a zinc. El porcentaje de identidad es proporcional a la altura de las barras. Color: verde; 100% de similitud, Amarillo; 80-100% de similitud, Rosa; 60-80% de similitud, Sin color; menos del 60% de similitud. Alineamientos en T-Coffe empleando ClustalW y visualización programa Geneious.



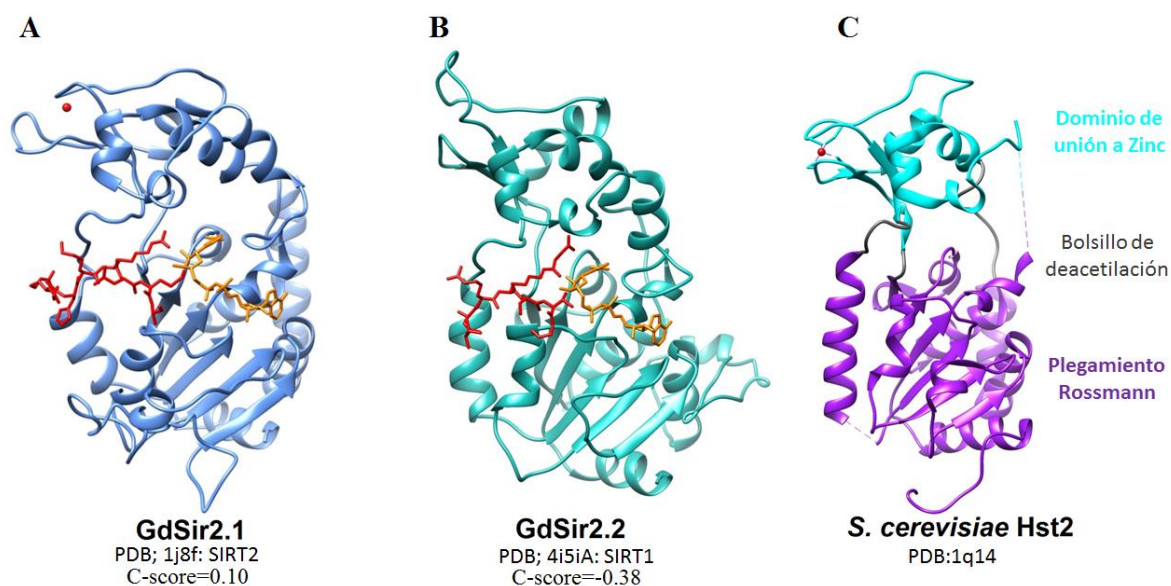
Para la identificación de dominios estructurales en estos candidatos, se realizó inicialmente la predicción de estructura terciaria empleando el servidor I-TASSER³⁹ con toda la secuencia de aminoácidos. Los modelos obtenidos mostraron dominios estructurales característicos de la familia sirtuina, sin embargo, su calidad fue baja; con valores de C-score cercanos a -5 (C-scores GdSir2.1; -3.28 y GdSir2.2; -1.62) (Anexo 4 A y B), y valores del 89.1% y 86,2% de los residuos en las regiones permitidas y favorecidas (GdSir2.1 y GdSir2.2 respectivamente) al ser evaluados con el Gráfico de Ramachandran (Anexo 5 A y B). Estos resultados obtenidos son atribuibles a la baja similitud presentada a nivel de las regiones N- y C-terminal en la familia sirtuina, lo cual disminuye el modelamiento por

homología en las estructuras predichas. Para mejorar las predicciones estructurales, se llevó cabo el modelamiento de los dominios sirtuina predichos a nivel de estructura primaria presentes en los candidatos. Las estructuras tridimensionales generadas presentaron valores de C-score más cercanos a 2 y mayor porcentaje de residuos en las regiones permitidas y favorecidas (GdSir2.1; C-score: 0.1, 97.2% y GdSir2.2; C-score: -0.38, 99.7%), esto permite concluir que los modelos predichos para el dominio sirtuina de los candidatos son más confiables que los generados inicialmente con la secuencia de aminoácidos completa (Anexo 4 C y D y Anexo 5 C y D).

En las estructuras 3D predichas, se identifican dos dominios estructurales típicos de las sirtuinas. El primero de estos es un dominio grande con presencia de dos plegamientos tipo Rossmann, característicos de proteínas de unión a nucleótidos y en este caso de unión a NAD^+ , los cuales están estructuralmente compuestos por láminas beta paralelas rodeadas de hélices alfa y giros aleatorios^{61,67}. El segundo es un dominio pequeño que se caracteriza por la presencia de cuatro residuos de cisteína involucrados en la unión a zinc⁶⁷, el cual no se encuentra directamente involucrado en el proceso de acetilación. Estudios de la función de este dominio han mostrado, que agentes quelantes de zinc o mutaciones de los residuos de cisteína por lisinas, inhiben la actividad sirtuina *in vitro*, por lo que la integridad estructural del dominio de unión a zinc parece ser requerimiento para la función enzimática. Entre los dominios grande y pequeño se ubica un bolsillo hidrofóbico, en el cual se acoplan los sustratos (NAD^+ y péptido acetilado) y se lleva a cabo el proceso de acetilación (Fig. 5-2 A y B)^{22,23,62,68}.

Figura 5-2: Estructuras tridimensionales generadas para el dominio sirtuina presente en los candidatos Gdsir2.1 y GdSir2.2.

(A). Modelo GdSir2.1. (B) Modelo GdSir2.2. (C) Modelo de la sirtuina Hst2 de *S. cerevisiae* obtenida por cristalización (PDB: 1q14)⁶¹, magenta: dominio grande con plegamiento tipo Rossmann de unión al NAD⁺. Azul claro: dominio pequeño de unión a zinc. Gris: bolsillo hidrofóbico de deacetilación. Rojo: Péptido acetilado sustrato o átomo se zinc. Naranja: molécula de NAD⁺. Visualización de estructuras con el programa UCSF Chimera.

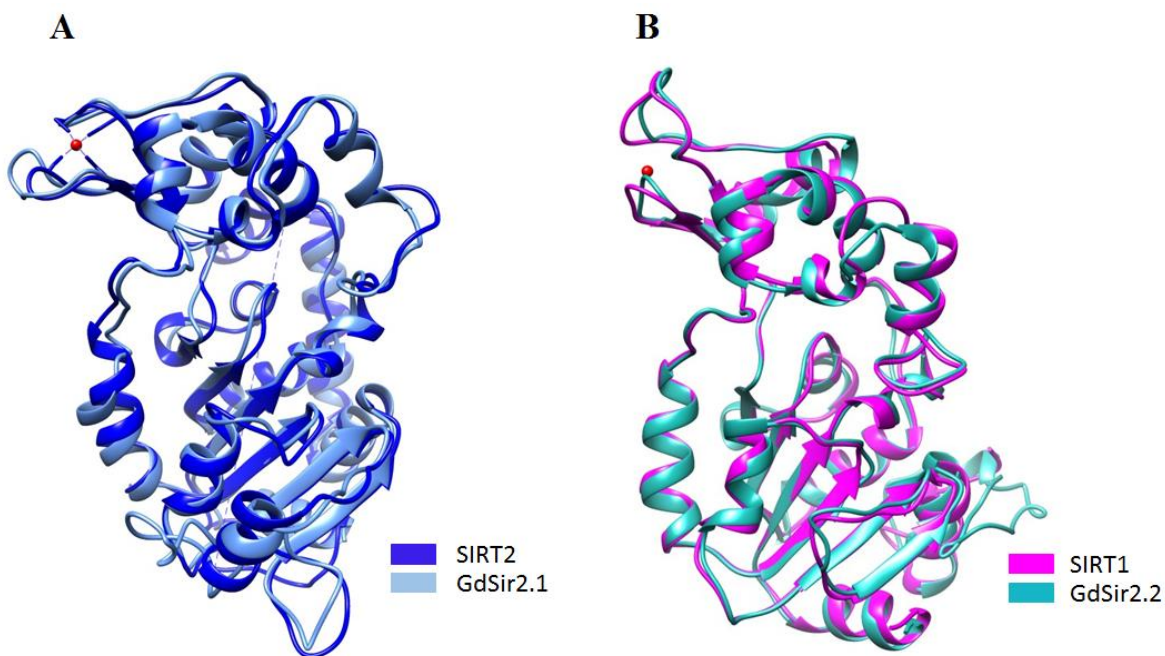


Para continuar con la caracterización bioinformática, se realizó una superposición entre las estructuras predichas para los dominios sirtuinas presentes en los candidatos y las estructuras resueltas de sirtuinas humanas. Este análisis permitió identificar que existe un elevado grado de superposición entre la GdSir2.1 y la SIRT2 humana (PDB: 1j8fa), con la cual tiene un 34% de identidad (Fig. 5-3A). Por su parte el candidato GdSir2.2 tiene un 43% de identidad con respecto al SIRT1 humana (PDB: 4i5iA) (Fig. 5-3 B). Estos análisis muestran el elevado grado de superposición estructural entre las sirtuinas humanas y los modelos aquí predichos, el cual es un fenómeno conocido para la familia⁶¹ y que es congruente con los porcentaje de identidad mostrados. Estos resultados bioinformáticos evidencian la similitud estructural (estructura primaria y terciaria predicha) de las GdSir2.1

y GdSir2.1 con otras sirtuinas y permite postularlas como candidatos a esta familia de proteínas.

Figura 5-3: Superposición de las estructuras tridimensionales predichas para los dominios sirtuina y los modelos resueltos para las SIRT1 y SIRT2 humanas.

(**A**). Superposición de la estructura 3D de la GdSir2.1 y la sirtuina SIRT2 humana (34% de identidad, RMSD: 0.775 Å entre 251 pares de átomos). (**B**). Superposición de la estructura 3D de la GdSir2.2 y la sirtuina SIRT1 humana (39% de identidad, RMSD: 0.849 Å entre 242 pares de átomos). Azul oscuro; SIRT2 (PDB: 1j8fa). Azul claro; estructura predicha para GdSir2.1. Magenta; SIRT1 (4i5iA). Verde: estructura predicha para GdSir2.2. (Visualización y superposición de estructuras con el programa UCSF Chimera 1.8.1).



5.2 Aproximación *in vitro* a la caracterización de los candidatos a sirtuina GdSir2.1 y GdSir2.2 de *G. duodenalis*

Teniendo la aproximación bioinformática como base y con el objetivo de determinar la capacidad de acetilasa de los candidatos a nivel *in vitro*, se diseñaron cebadores o “*primers*” que permitieran su clonación y expresión en el vector pET100/D-TOPO (Tabla 5-1), el cual permite clonar de manera direccionada el inserto de interés en el vector, por acción de un sistema de topoisómeras que reconocen una secuencia CACC en el extremo 5'- del primer directo. Este vector se caracteriza, además, por tener como medio de selección una región codificante de resistencia a ampicilina y por adicionar una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino terminal de la proteína recombinante (etiqueta Hisx6), esta etiqueta es importante para procesos de monitoreo de la expresión mediante western blot con anticuerpos comerciales anti-Hisx6 y para la purificación por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados, para detallar en el esquema del vector ver el Anexo 6 A.

Tabla 5-1: Primers diseñados para la clonación de los candidatos GdSir2.1 y GdSir2.2 en el vector pET100/D-TOPO.

Primer	Secuencia	Longitud	Tm (°C)	%GC
Diseño de primers / Gen GdSir2.1				
Directo	5'- CACCATGCCTGCTAATTAT -3'	19 pb	54	42.1
Reverso	5'-TCATTTACCTGAAGGCTC-3'	18 pb	51	44.4
Diseño de primers / Gen GdSir2.2				
Directo	5'- CACCATGAAATCGGCTCTCGAAG -3'	23 pb	75	52.2
Reverso	5'-TTACTGGCGCGATCGGGGCGT-3'	21 pb	67	66.7

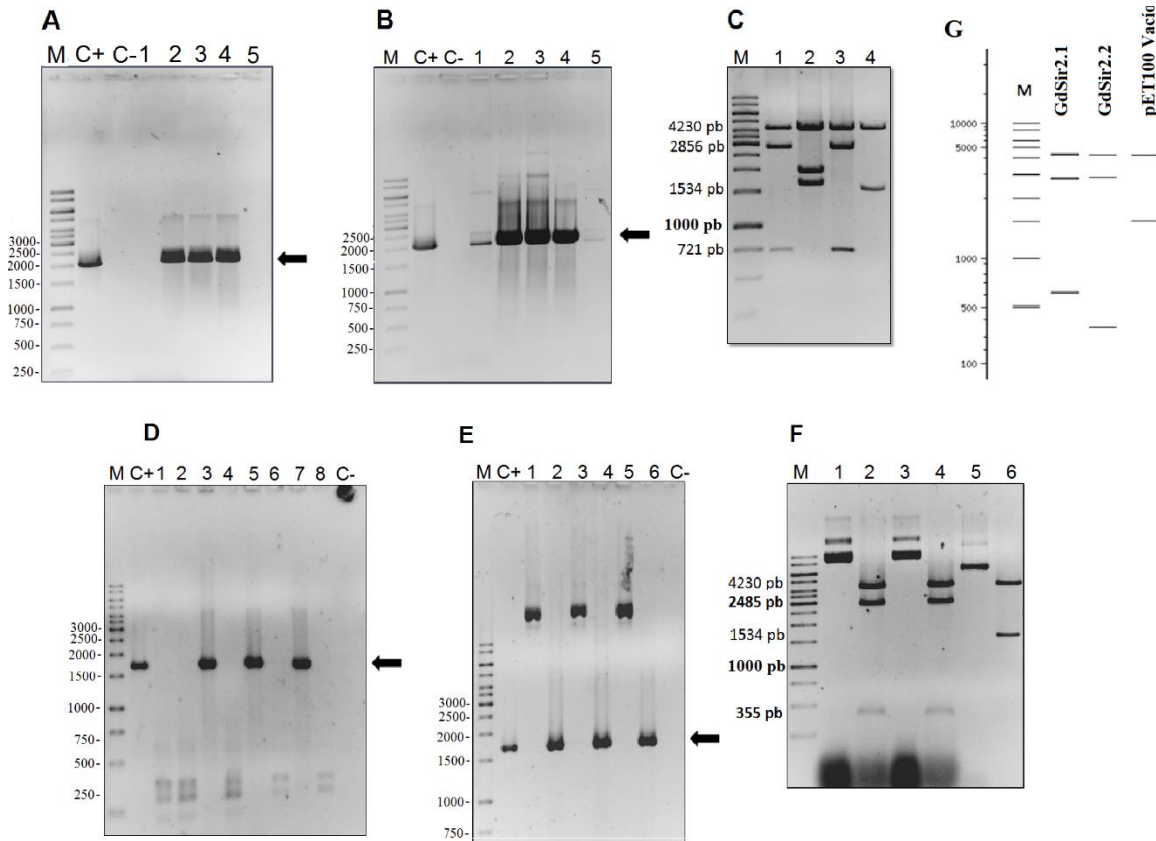
5.2.1 Obtención de los vectores recombinantes pET100-GdSir2.1 y pET100-GdSir2.2

El producto amplificado por PCR desde DNA genómico (gDNA) de trofozoítos de *G. duodenalis* de los candidatos, se ligó en el vector pET100/D-TOPO y con el producto de la ligación se transformaron células de almacenamiento One Shot Top10, las colonias obtenidas de este proceso se evaluaron por PCR; para el candidato GdSir2.1 se evaluaron cinco colonias, tres de las cuales mostraron un amplificado del tamaño esperado (2043 pb) (Tabla 1-1 y Fig. 5-4 A), mientras que para el candidato GdSir2.2 se obtuvo un amplificado de aproximadamente 1680 pb, en tres de ocho colonias evaluadas que corresponde al tamaño esperado (Tabla 1-1 y Fig. 5-4 D).

A las colonias positivas mencionadas anteriormente, se les realizó lisis alcalina y los plásmidos obtenidos se evaluaron por PCR, para ambos candidatos se obtuvieron amplificados que corresponden con el tamaño esperado (2043 y 1680 pb) (Fig. 5-4 B y E). La identidad de los plásmidos obtenidos, fue corroborada empleando digestión con la enzima de restricción EcoRV. Dos de los plásmidos pET100-GdSir2.1, presentaron el patrón de bandas esperado para el vector recombinante (4230, 2485 y 721 pb) (Fig. 5-4 C) y dos plásmidos del vector pET100-GdSir2.2, presentaron también el patrón de bandas esperado (4230, 2485 y 355 pb) (Fig. 5-4 F). El patrón de bandas obtenido para los vectores recombinantes, se diferencia del presentado por el vector pET100/D-TOPO vacío en el que se observan dos bandas de 4230 y 1534 pb (Fig. 5-4 G). Como resultado final de esta fase experimental, se cuenta con los vectores recombinantes pET100-GdSir2.1 y pET100-GdSir2.2 (Anexo 6 A y B), los cuales que permitirán la producción de las proteínas recombinantes Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2 con una etiqueta de histidinas en el extremo N terminal y pesos esperados de 78.7 kDa (GdSir2.1; 74.6 kDa y Hisx6, 4.1 kDa) y 66,9 kDa (GdSir2.2; 62.8 kDa y Hisx6:4.1).

Figura 5-4: Obtención de los vectores recombinantes pET100-GdSir2.1 y pET100-GdSir2.2.

(A, B y C) Clonación del candidato GdSir2.1. (A). PCR de colonia. (1-5, Colonias evaluadas). (B). PCR de plásmidos. (1-5, plásmidos evaluados). (C). Digestión de plásmidos con EcoRv. (1-3, Plásmidos positivos para PCR). 4; Plásmido pET100/D-TOPO vacío. (D, E y F). Clonación del candidato GdSir2.2. (D). PCR de colonia. (1-8, Colonias evaluadas). (E). PCR de plásmido. (1, 3, 5); Plásmidos plantilla. (2, 4, 6); PCR de plásmidos. (F). Digestión plásmidos con EcoRv. (1 y 3); Plásmidos positivos para PCR sin digerir. (2 y 4); Plásmidos positivos para PCR digeridos. (5 y 6); Plásmido pET100/D-TOPO vacío sin digerir y digerido respectivamente. (G). Predicción de los patrones electroforéticos esperados para los cortes realizados por la enzima EcoRV a los vectores recombinantes pET100-GdSir2.1, pET100-GdSir2.2 y pET100/D-TOPO vacío, empleando el servidor en línea NEBcutter2. (C-); Control negativo H2O DEPC como plantilla. (C+); Control positivo gDNA como plantilla. (M); Marcador 1Kb GeneRuler. (←) La flecha negra señala el amplificado esperado. Agarosa-TBE 1% p/v.



5.2.2 Expresión de las proteínas recombinantes Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2

Como se mencionó anteriormente, en términos generales, el vector pET100/D-TOPO se caracteriza por la adición de una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino terminal de la proteína recombinante, esta etiqueta es importante para la purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína y para el monitoreo de la expresión y purificación de la misma. Con los vectores recombinantes pET100-GdSir2.1 y pET100-GdSir2.2 obtenidos, verificados y purificados, se transformaron células de expresión *E. coli* BI21 DE3 y se monitoreó por SDS-PAGE y western blot la expresión de las proteínas recombinantes.

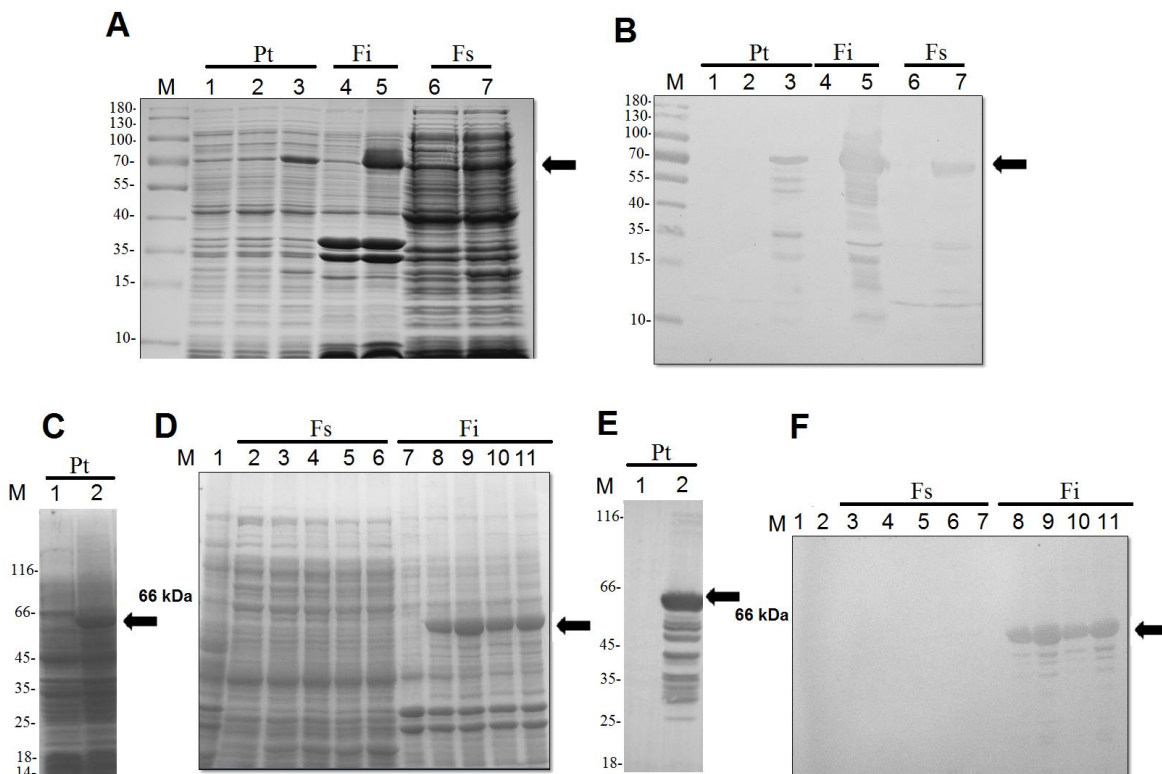
La figura 5-5 A muestra el resultado de la expresión de la proteína recombinante Hisx6-Gdsir2.1 en *E. coli* BI21 DE3, en ella se observa la expresión diferencial de una banda con un peso de 70 kDa (aproximado al tamaño esperado), presente en células inducidas respecto a los controles: bacterias no inducidas y sin transformar, tanto en extractos totales, como fracción soluble e insoluble respectivamente. La evaluación por western blot empleando anticuerpos dirigidos contra la etiqueta de histidinas, confirmó que la banda corresponde a la Hisx6-Gdsir2.1 siendo expresada tras la inducción (Fig. 5-5 B). La presencia de la GdSir2.1 en la fracción soluble, será el punto de partida para la purificación y caracterización *in vitro* de la proteína.

El monitoreo de la expresión de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.2 en *E. coli* BI21 DE3, permitió determinar la presencia de una banda con un peso aproximado de 64 kDa la cual corresponde al tamaño esperado, en células inducidas respecto de células sin inducir a nivel de proteínas totales (Fig. 5-5 C y E). Al evaluar la solubilidad de la proteína GdSir2.2 a diferentes tiempos de inducción en la fracción soluble e insoluble por SDS-PAGE y western blot, se encontró que la proteína expresa mayoritariamente de forma insoluble (Fig. 5-5 D y F). La expresión de la proteína de forma insoluble o en cuerpos de inclusión, que son agregados proteicos cuyo contenido principal es la proteína de interés mal plegada⁶⁹, es un fenómeno habitual en la producción de proteínas heterólogas. Esto ocurre debido a que la proteína recombinante expresada en *E. coli*, puede estar siendo sometida a un

microambiente que en términos de pH, osmolaridad, potencial redox, cofactores y mecanismos de plegamiento⁷⁰, pueden no ser los óptimos para su expresión de forma soluble, este comportamiento es una característica intrínseca de la proteína en cuestión, lo cual se ve reflejado en la solubilidad de la GdSir2.1 y en la insolubilidad de la GdSir2.2 al ser expresadas en *E. coli*. En la siguiente sección se abordan las estrategias experimentales y resultados obtenidos en el proceso de solubilización de la proteína GdSir2.2 producida en *E. coli*, en aras a la obtención de proteína soluble para ensayos de purificación y determinación de actividad.

Figura 5-5: Expresión de las proteínas recombinantes Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2 en *E. coli* BI21 DE3.

(A y B). Hisx6-GdSir2.1. 1; Pt sin transformar. 2; Pt 0h de inducción. 3; Pt 4h postinducción. 4; Fi 0h de inducción. 5; Fi 4h postinducción. 6; Fs 0h postinducción. 7; Fs 4h postinducción. **(A)** SDS-PAGE 12%, Azul Coomassie. **(B)**. Wb con anticuerpo anti-histidinas. Nitrocelulosa-peroxidasa. **(C y E).** Hisx6-GdSir2.2. 1; Pt sin inducir. 2; Pt 8h postinducción **(C)** SDS-PAGE 10%, Azul Coomassie. **(E)**.Wb anti-histidinas. Nitrocelulosa- peroxidasa. **(D y F).** Hisx6-GdSir2.2. 1; Pt sin transformar. (2-6); Fs 0, 2, 4, 6 y 16h postinducción respectivamente. (7-11); Fi 0, 2, 4, 6 y 16h postinducción respectivamente. **(F)** SDS-PAGE 10%. Azul Coomassie. **(F)**. Wb anti-histidinas. Nitrocelulosa-peroxidasa. (wb); Western blot. (M); Marcador kDa. (←); La flecha negra señala la banda de la proteína recombinante o su reconocimiento en el western blot. (Pt); Proteínas totales. (Fs); Fracción soluble. (Fi): fracción insoluble. (h): horas.



5.2.3 Estandarización de la condiciones de expresión de la proteína recombinante GdSir2.2 en *E. Coli*

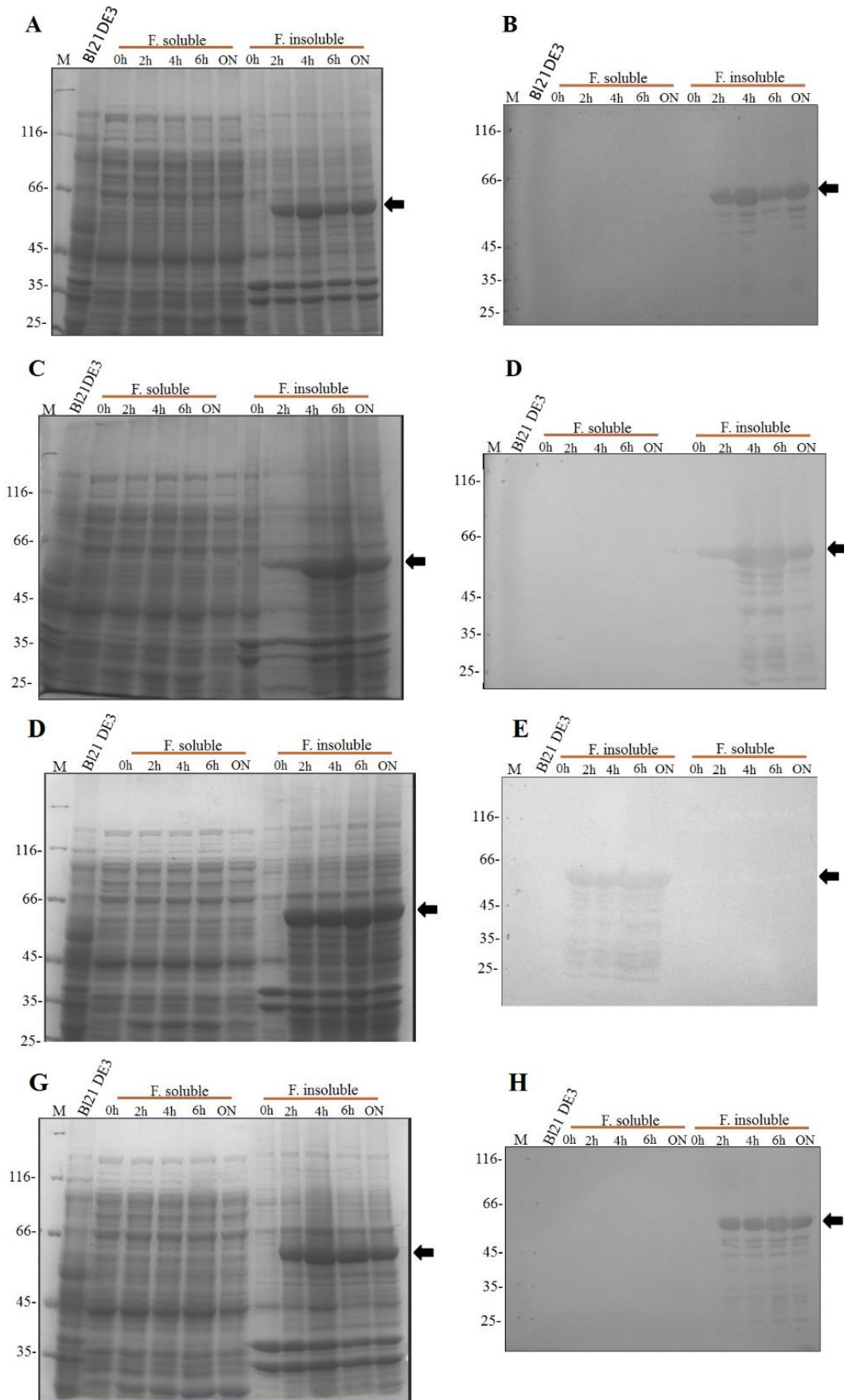
Para la lograr la obtención de la proteína Hisx6-GdSir2.2 soluble necesaria para ensayos de purificación y actividad *in vitro*, se evaluó el efecto de diferentes estrategias metodológicas reportadas bibliográficamente, las cuales han mostrado generar aumento en solubilidad de proteínas recombinantes, estas estrategias incluyen por ejemplo: la variación de las condiciones de inducción, de las cepas de expresión y la adición de etiquetas fusión a la recombinante^{71,72}. A continuación se mostrarán en detalle los resultados obtenidos al evaluar estas condiciones y su efecto en la solubilidad de la proteína GdSir2.2 expresada en *E. coli*.

Teniendo el clon de expresión BI21 DE3-GdSir2.2 como base, se buscó evaluar inicialmente el efecto de condiciones de inducción tales como: la concentración de inductor, y el tiempo y la temperatura de inducción en la solubilidad de la proteína de interés, estas variaciones

en las condiciones de inducción tienen como objetivo evaluar como la tasa de producción de la recombinante afecta su solubilidad. Disminuciones en las temperaturas y concentraciones de agente inductor (IPTG en este caso), son empleadas para reducir la velocidad de síntesis proteica y la activación transcripcional sobre el vector, esta disminución en la velocidad de generación de la proteína recombinante, conlleva a un aumento en el tiempo de plegamiento por proteína⁷⁰, favoreciendo el correcto plegamiento de la misma y disminuyendo las interacciones hidrofóbicas que propician y estabilizan el cuerpo de inclusión⁶⁹. La figura 5-6 muestra los resultados obtenidos para la expresión de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.2 a diferentes tiempos de inducción, concentración de agente inductor (0.5 y 1 mM de IPTG) y temperatura (22 y 37 °C), en esta figura se observa que las condiciones abordadas experimentalmente no generaron el aumento en la solubilidad de la proteína recombinante, la cual se observa presente de manera mayoritaria en la fracción insoluble de la lisis celular.

Figura 5-6: Evaluación de la solubilidad de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.2 bajo diferentes condiciones de inducción en la cepa BL21 DE3.

Columna izquierda: SDS-PAGE 10%-Azul coomassie. Columna derecha: wb anti-Hisx6-nitrocelulosa-Peroxidasa de rábano. (A y B). 1 mM IPTG a 25°C. (C y D). 1 mM IPTG a 37°C. (E y F). 0,5 mM IPTG a 37°C. (G y H). 0,5 mM IPTG a 25°C. M; Marcador de peso molecular en kDa. Pt BL21 DE3; Pt BL21 DE3 sin transformar. Fs 0, 2, 4, 6 y 16 h postinducción respectivamente. Fi 0, 2, 4, 6 y 16h postinducción respectivamente. (←); La flecha negra señala la banda de la proteína recombinante o su reconocimiento en el wb. (wb); Western blot (Pt); Proteínas totales. (Fs); Fracción soluble. (Fi); Fracción insoluble. (h); horas.



Debido a que la variación de las condiciones de inducción no favoreció la obtención de proteína recombinante soluble, se buscó entonces, evaluar el efecto de la coexpresión de proteínas chaperonas y del cambio de la cepa de expresión en la solubilidad de la proteína.

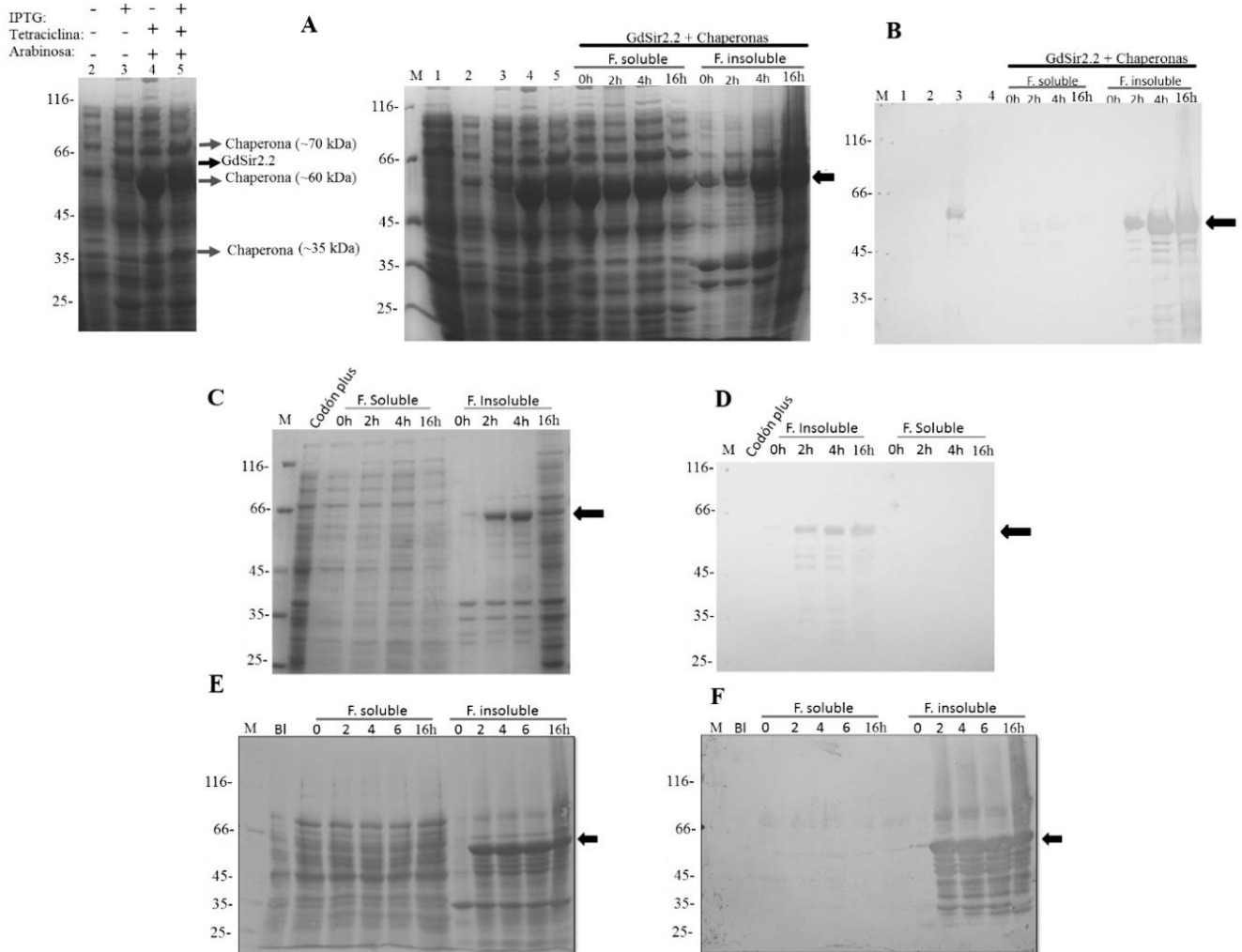
Para evaluar el efecto solubilizador de la coexpresión de la GdSir2.2 con proteínas chaperonas, se realizó su expresión en la cepa de BI21 DE3 co-transformada con el vector comercial PG-KJE8, el cual codifica para 5 chaperonas moleculares (dnaK, dnaJ, grpE, groES y groEL), las cuales son expresadas de manera natural en *E. coli*. Las proteínas dnaK, dnaJ y grpE hacen parte de la familia Hsp70 y se encuentran involucradas en reparación de daño en proteínas inducido por temperatura⁷³, mientras que groES y groEL forman un complejo con función chaperonina que media también el correcto plegamiento de las proteínas sintetizadas⁷⁴. La coexpresión constitutiva de estas proteínas junto a la proteína de interés tiene como objetivo contribuir al plegamiento de la misma, evitando interacciones hidrofóbicas aumentando su solubilidad. No obstante, al evaluar la coexpresión de la Hisx6-GdSir2.2 junto con estas proteínas, no se detectó un aumento significativo de la misma en la fracción soluble de la lisis celular en ninguno de los tiempos evaluados, la cual permaneció mayoritariamente insoluble (Fig. 5-7 A y B).

Siguiendo con la evaluación del efecto de la cepa de expresión y el tiempo de inducción en la solubilidad, se transformaron células de expresión BI21 Codón Plus DE3 y Shuffle con el plásmido recombinante pET100-GdSir2.2. Las células BI21 Codón Plus DE3, se diferencian de las células BI21 DE3, por presentar un set de tRNAs adicionales que permiten la producción de proteínas con codones raros, las cuales han mostrado mejores resultados en la obtención de proteínas solubles respecto otras cepas BI21⁷⁵, aunque la Hisx6-GdSir2.2 fue encontrada del tamaño esperado y la región codificante no presenta codones raros, se evaluó esta cepa como opción para mejorar su solubilidad. Por su parte las células *E. coli* K12 Shuffle, son empleadas en la producción de proteínas con presencia de cisteínas en su estructura primaria, ya que promueven la formación de puentes disulfuro en el citoplasma por expresión constitutiva de la proteína disulfuro isomerasa (DsbC), la cual presenta capacidad chaperona y favorece el replegamiento de proteínas oxidadas y mal plegadas^{76,77}, esto permite su obtención soluble, considerando que la GdSir2.2 presenta 16 residuos de cisteína en su estructura primaria, 14 de los cuales se encuentran en el dominio catalítico del candidato (Anexo 7), la evaluación de esta cepa podría ser promisorio, debido que la formación de puentes disulfuro incorrectos podría ser la causa de la insolubilidad

observada. A pesar de la variación de la cepa de expresión, la producción de manera soluble de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.2 en estas células, no mostro verse afectada positivamente (Fig. 5-7 C y D y Fig. 5-7 E y F).

Figura 5-7: Evaluación de la solubilidad de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.1 en diferentes cepas de expresión.

(**A y B**). Coexpresión con chaperonas 1mM IPTG a 37°C. SDS-PAGE 10%-Coomassie y wb anti-Hisx6 nitrocelulosa-Peroxidasa de rábano respectivamente. 1; Proteínas totales BL21 DE3 sin transformar. 2; células sin inducir. 3; Inducción de Hisx6-GdSir2.2. 4; inducción de chaperonas (arabinosa y tetraciclina). 5; Inducción Hisx6-GdSir2.1 y chaperonas 16H. Inducción Hisx6-GdSir2.1 y chaperonas: Fs 0, 2, 4 y 16h postinducción respectivamente y Fi 0, 2, 4 y 16h postinducción respectivamente. (**C y D**). Células BL21 Codón Plus DE3 1mM IPTG a 37°C. SDS-PAGE 10% y anti-Hisx6 nitrocelulosa-Peroxidasa de rábano respectivamente. Codón plus; Pt Codón Plus sin transformar. Fs 0, 2, 4 y 16h postinducción respectivamente. Fi 0, 2, 4 y 16h postinducción respectivamente. (**E y F**). Células SHuffle 0.3 mM IPTG a 22°C. Membrana rojo Ponceau y wb anti-Hisx6 nitrocelulosa-peroxidasa de rábano respectivamente. Bl; Pt SHuffle sin transformar. Fs 0, 2, 4, 6 y 16h postinducción respectivamente. Fi 0, 2, 4, 6 y 16h postinducción respectivamente. (wb); Western blot (Pt); Proteínas totales. (Fs); Fracción soluble. (Fi); Fracción insoluble. (h); horas. (←); La flecha negra señala la banda de la proteína recombinante o su reconocimiento en el western blot.



Debido a que no fue posible incrementar la solubilidad de la Hisx6-GdSir2.2 expresada desde el vector pET100/D-TOPO, aunque experimentalmente se modificaron condiciones de la inducción, se coexpresó el candidato con proteínas chaperonas y se varió la cepa de expresión⁷⁰, se optó por evaluar el efecto de etiquetas que al ser fusionadas a las proteínas han mostrado aumento en su solubilidad, para ello mediante servidores en línea (SolPro⁷⁸, ProSoll⁷⁹ y ESPRESSO⁸⁰), se predijo la solubilidad de la GdSir2.2 al ser fusionada a etiquetas otorgadas mediante su clonación en otros vectores disponibles en nuestro grupo de investigación, dentro de las etiquetas evaluadas se encuentran; la glutatión transferasa (GST), Sumo, tioredoxina (Trx) y la proteína de unión a maltosa (MBP)^{70,81,72}.

El análisis bioinformático permitió estimar el efecto de estas proteínas fusión en la solubilidad de la GdSir2.2, encontrándose que la etiqueta MBP otorgado por el vector pMAL

C5X a la GdSir2.2, predice el mayor efecto solubilizador de las etiquetas evaluadas de manera uniforme en los tres servidores empleados (Tabla 5-2). La MBP con un peso de 42.5 kD es usada además de su efecto en la solubilidad, para purificar la proteína recombinante obtenida por cromatografía de afinidad a amilosa, así como para monitorear la expresión y el proceso de purificación de la misma por western blot empleando anticuerpos anti-MBP. El proceso de clonación, expresión y obtención de la proteína MBP-GdSir2.2 se detalla a continuación.

Tabla 5-2: Predicción de efecto solubilizador de etiquetas fusión en la solubilidad de la GdSir2.2.

Porcentaje de solubilidad predicho para cada uno de los constructos de la proteína GdSir2.2 fusionadas a las etiquetas MBP, GST, 6xHis, SUMO, TrX de manera independiente. Porcentajes mayores a 50%, predicen proteína soluble.

Vector	SolPro	ProSo II	ESPRESSO	Etiqueta
pMAL C5X-GdSir2.2	61,6%	64%	64,3%	MBP
pGEX 4T2- GdSir2.2	38%	70,8	----	GST
pET 100- GdSir2.2	20,7%	55,6%	54,3%	6xHis
pET SUMO- GdSir2.2	26,2%	58,1%	52%	SUMO
pBAD202- GdSir2.2	35,5%	51,2%	51%	TrX

5.2.4 Obtención del vector recombinante pMAL C5X-GdSir2.2 y expresión de la proteína recombinante BMP-Gdsir2.2 soluble

Para corroborar experimentalmente el efecto positivo predicho en la solubilidad de la GdSir2.2 al ser fusionada a la proteína MBP como un constructo de 106.3 kDa, se llevó a cabo su clonación en el vector pMAL C5X, el cual tiene como antibiótico de selección a la ampicilina y al IPTG como agente inductor de la expresión. Este proceso de clonación se

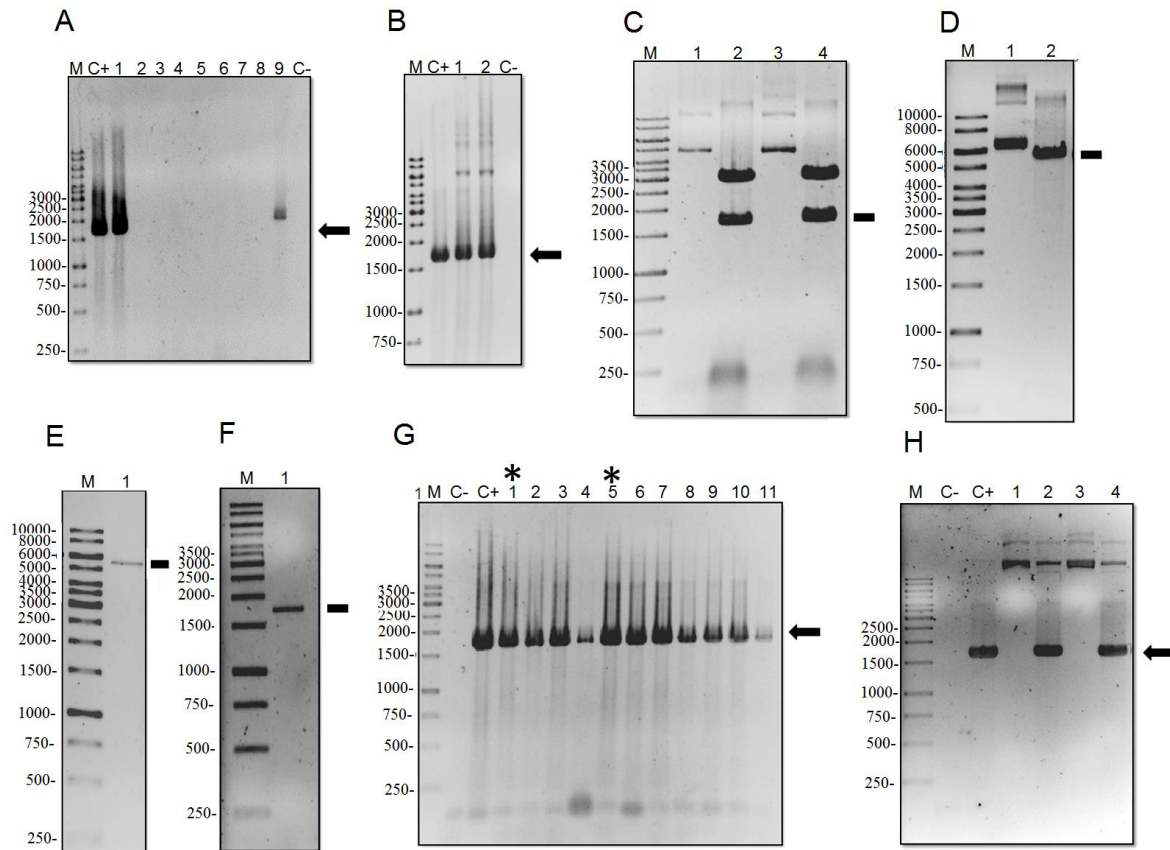
dividió en dos etapas, la primera estuvo dirigida a obtener el vector recombinante pGEM-T Easy-GdSir2.2 para subclonación empleando enzimas de restricción y la segunda busco la obtención del vector recombinante pMAL C5X-GdSir2.2 a partir del anterior.

Para la clonación de la *GdSir2.2* en el vector pGEM-T Easy, se diseñaron primers que otorgarán sitios de restricción para las enzimas Sall y NotI (numeral 4.2.2). El amplificado del candidato obtenido por PCR usando *Taq polimerasa* desde gDNA de trofozoítos de *Giardia*, se ligó en el vector pGEM-T Easy y se transformó en células de *E. coli* Top10, las cuales fueron evaluadas por PCR y dos de ellas presentaron un amplificado del tamaño esperado (1990pb) (Fig. 5-8 A). Estas colonias positivas, se sometieron a lisis alcalina y el PCR de los plásmidos obtenidos nuevamente mostro una banda de entre 1500 y 2000 pb, que corresponde con el tamaño esperado (Fig. 5-8 B).

Los plásmidos pGEM-T Easy-GdSir2.2 y el vector pMAL C5X vacío, fueron sometidos a doble digestión con las enzimas Sall y NotI, este proceso permitió la liberación de los fragmento de tamaño esperado: 1687 pb para el fragmento GdSir2.2 y 5677 pb para el vector pMAL C5X linearizado (Fig. 5-8 C y D respectivamente). Una vez verificada la digestión, se realizó una corrida electroforética, se cortaron en el gel de agarosa las bandas de los tamaños esperados y se purificó el inserto GdSir2.2 liberado y del vector pMAL C5X linarizado empleando el kit comercial DNA Gel Extraction® (Fig. 5-8 E y F respectivamente), estos purificados se emplearon en una reacción de ligación, con la cual se transformaron células de *E. coli* Top10, 11 de las colonias obtenidas fueron evaluadas por PCR y todas mostraron el amplificado con el tamaño esperado (1990pb) (Fig. 5-8 G). Dos de estos plásmidos recombinantes purificados por lisis alcalina, al ser evaluados por PCR mostraron nuevamente el amplificado esperado (Fig. 5-8 H).

Figura 5-8: Obtención del vector recombinantes pMAL C5X-GdSir2.2.

(**A, B y C**). Clonación de GdSir2.2 en pGEM T-Easy. (**A**) PCR de colonia. (1-9); Colonias evaluadas. (**B**). PCR plásmidos pGEM T-EASY-GdSir2.2. (1 y 2); Plásmidos obtenidos. (**C**). Digestión con NotI y Sall de plásmidos pGEM T-EASY-GdSir2.2. (1 y 3); Plásmidos sin digerir. (2 y 4); Plásmidos digeridos NotI y Sall. (**D**). Digestión con NotI y Sall plásmido pMAL C5X vacío. 1; Plásmido sin digerir. 2; Plásmido digerido. (**E**). Purificado. 1; Purificado plásmido pMAL C5X digerido NotI y Sall. (**F**). Purificado.1; inserto GdSir2.2 de la digestión de NotI y Sall del vector pGEM T-Easy-Gdsir2.2. (**G y H**). Clonación de GdSir2.2 en pGEM T-Easy. (**G**). PCR colonia. (1-10); Colonias evaluadas. (**H**). PCR plásmido. (1 y 3); Plásmidos plantilla. (2 y 4); Plásmidos evaluados por PCR. (C-); Control negativo H2O DEPC como plantilla. (C+); Control positivo gDNA como plantilla. (M); Marcador 1Kb GeneRuler. (←); La flecha negra señala el amplificado esperado. (-); El guion señala los fragmentos liberados de la digestión con NotI y Sall, para la ligación y obtención del vector pMAL C5X-GdSir2.2. (*) Los asteriscos señalan las colonias pGEM T-EASY-GdSir2.2 sometidas a lisis alcalina. Agarosa-TBE 1% P/V.



Con el plásmido recombinante pMAL C5X-GdSir2.2 purificado por lisis alcalina, se

transformaron células de expresión BL21 DE3. En la evaluación de la expresión se observó una banda con un peso aproximado a 100 kDa en células inducidas que corresponde con el tamaño esperado para MBP-GdSir2.2, la cual a su vez es reconocida por anticuerpos dirigidos contra la etiqueta MBP (Fig. 5-9 A y C), como control positivo del reconocimiento sobre MBP, se empleó la proteína PfNMNAT de *P. falciparum* fusionada a esta etiqueta (MBP-PfNMNAT). Adicionalmente, para corroborar la identidad de esta banda, se realizó un western blot con anticuerpos murinos anti-Hisx6-GdSir2.2 donde la proteína fue reconocida (anticuerpos producidos en este trabajo como se mencionara posteriormente). Confirmando que la proteína recombinante expresada corresponde a la GdSir2.2 unida a la etiqueta MBP.

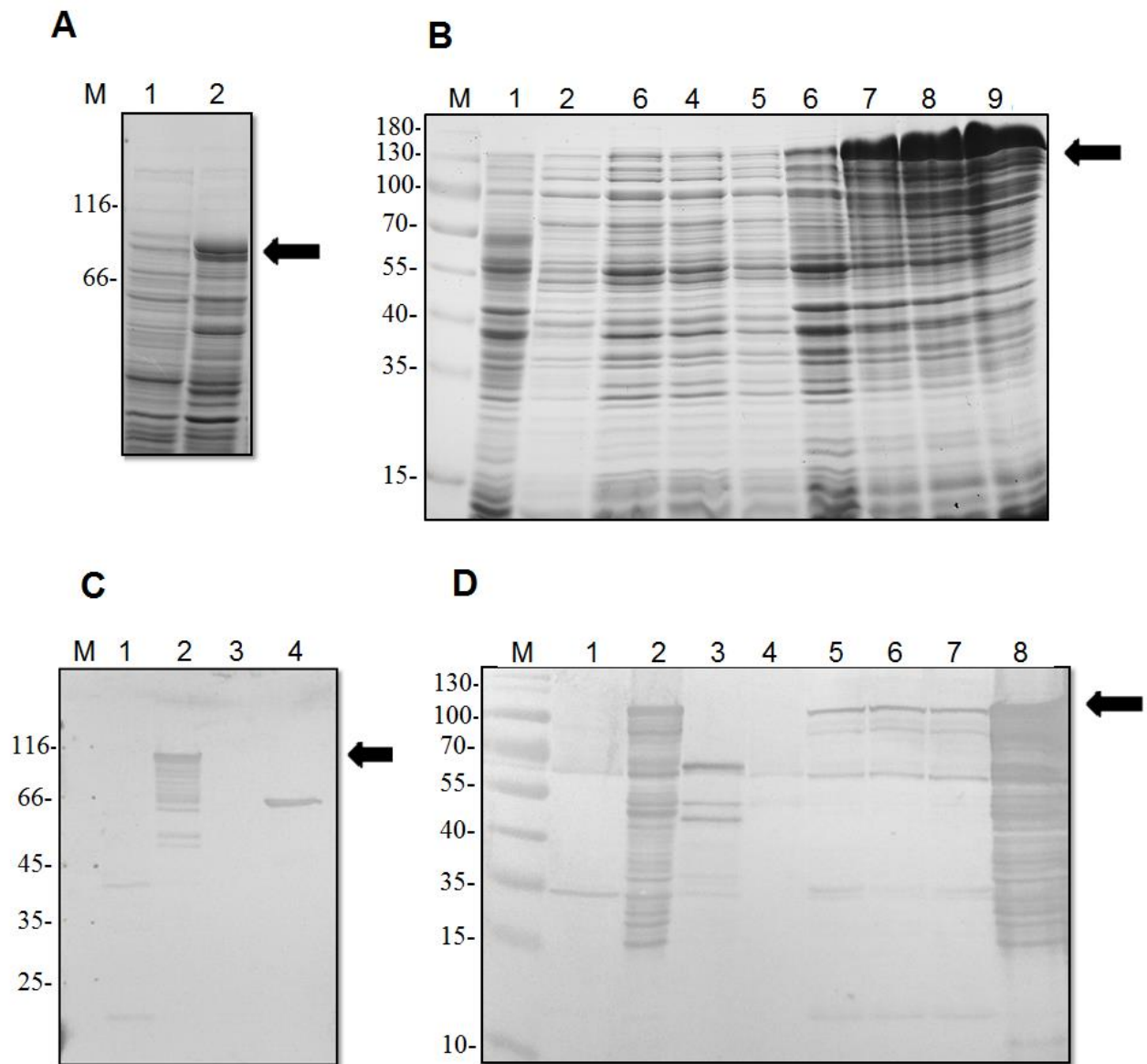
La evaluación de la expresión de esta proteína en la fracción soluble por western blot empleando anticuerpos anti-Hisx6GdSir2.2, mostró que la proteína es expresada de forma soluble a las 3, 6 y 16 horas postinducción (Fig. 5-9 B y D). Estos resultados permiten corroborar la predicción bioinformática del efecto solubilizador de la etiqueta MBP a la proteína recombinante. Dentro de las explicaciones a este fenómeno se describe que MBP, por medio de una actividad chaperona intrínseca, media el correcto plegamiento del polipéptido en crecimiento durante la traducción en los ribosomas, lo cual se ve reflejado en el aumento en la solubilidad de la proteína de interés⁷⁰. También se ha propuesto que MBP actúa en el reclutamiento de proteínas chaperonas adicionales que facilitan el correcto plegamiento.

La estrategia experimental anteriormente desarrollada permitió la obtención de los vectores pET100-GdSir2.1 y pMAL C5X- Gdsir2.2, desde los cuales es posible la expresión soluble de las proteínas recombinantes Hisx6-GdSir2.1 (78.7 kDa) y MBP-GdSir2.2 (106.3 kDa), lo cual es requisito para estudios funcionales *in vitro* de estas proteínas.

Figura 5-9: Expresión de la proteína recombinante MBP-GdSir2.2 en células BL21 DE3.

(A). Evaluación de la expresión de la proteína recombinante MBP-GdSir2.2. 1; Pt sin inducir. 2; Pt 16h postinducción. SDS-PAGE 12%, Azul Coomassie. **(B).** Evaluación de la expresión en la lisis celular. 1; Pt sin inducir. (2-5); Fs 0, 3, 6 y 16h postinducción respectivamente. (6-9); Fi 0, 3, 6 y 16h postinducción respectivamente. SDS-PAGE 12%, Azul Coomassie. **(C).** Wb anti-MBP. 1; Pt BL21 DE3 sin transformar. 2; Pt 16h postinducción. 3; 100ng Hisx6-GdSir2.2 purificada por SDS-PAGE preparativo. 4; 200ng proteína recombinante MBP-PfNMNAT. PVDF-Fosfatasa alcalina **(D).** Wb anti-Hisx6-Gdsir2.2. 1; Pt BL21 DE3 sin

transformar. 2; Pt 16h postinducción. 3; 100ng Hisx6-GdSir2.2 purificada por SDS-PAGE preparativo. 4; 200ng de MBP-PfNMNAT. (5-7); Fs 3, 6 y 16h postinducción. 8; Fi 3h postinducción. Marcador de peso molecular preteñido. PVDF-Fosfatasa alcalina. (wb); Western blot (Pt); Proteínas totales. (Fs); Fracción soluble. (Fi); Fracción insoluble. (h); horas. (M); marcador de peso molecular. (←); La flecha negra señala la banda de la proteína recombinante o su reconocimiento en el western blot.



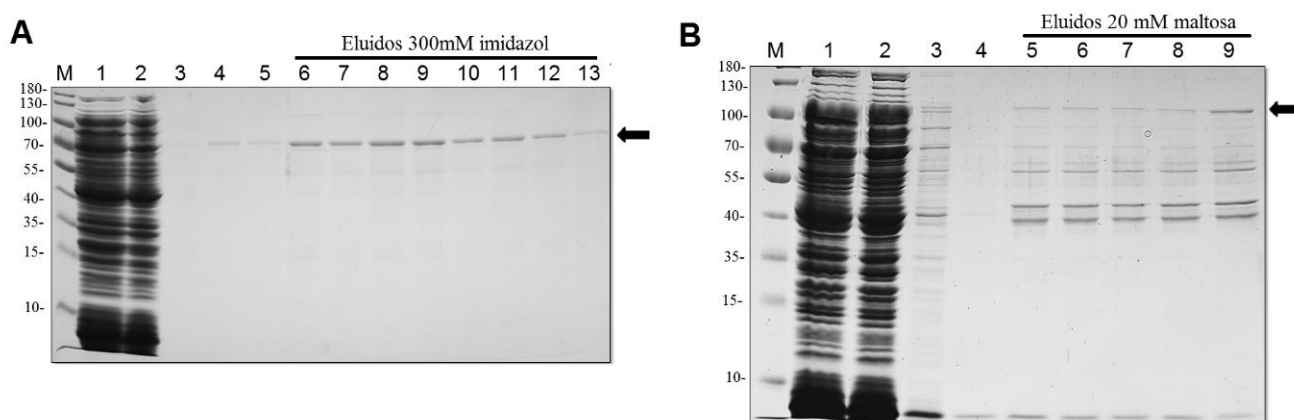
5.2.5 Purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas recombinantes Hisx6-GdSir2.1 y MBP-GdSir2.2 y ensayo de actividad in vitro

Una vez obtenida y verificada la expresión soluble de las proteínas Hisx6-GdSir2.1 y MBP-GdSir2.2, estas se sometieron a ensayos de purificación con el objetivo de obtener las proteínas para los ensayos de actividad. Para esto se realizaron inducciones en medio LB de células BI21 DE3 transformadas con los vectores recombinantes respectivos por 4 horas, la células se colectaron por centrifugación, se lisaron por sonicación en ausencia de inhibidores de proteasas y la fracción soluble se empleó en el proceso de purificación. La figura 5-10 A muestra la purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.1 (64 kDa), en ella se muestra como la proteína es obtenida parcialmente purificada tras su elución con 300 mM de imidazol.

La figura 5-10 B muestra la purificación por cromatografía afinidad a amilosa de la proteína recombinante MBP-GdSir2.2 (106 kDa), la cual es obtenida parcialmente purificada tras la elución con 20 mM de maltosa. Las bandas observadas de tamaño inferior a la MBP-GdSir2.2 corresponden a productos de degradación del constructo MBP-GdSir2.2, los cuales son debidos a la inestabilidad intrínseca de la GdSir2.2 evidenciada en inmunoreconocimientos anteriores (Fig. 5-9 C y D). La aparición de bandas de degradación en el proceso de purificación por cromatografía de afinidad a amilosa, ha sido encontrada en otros estudios como un producto espontáneo de degradación del constructo con MBP^{7,827,83} y ha sido observado en la producción de la proteína recombinante MBP-PfNMNAT en nuestro laboratorio⁵⁰.

Figura 5-10: Purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas Hisx6-GdSir2.1 y MBP-Gdsir2.2.

(A). Cromatografía de afinidad a níquel-purificación de la proteína Hisx6-GdSir2.1. 1; Fracción soluble lisis celular. 2; Proteínas no unidas 3; Lavado 35 mM imidazol. 4; Lavado 75 mM imidazol. 5; Lavado 150 mM imidazol. (6-13); Eluidos 300 mM imidazol. (B). Cromatografía de afinidad a amilosa-purificación de la proteína MBP-GdSir2.2. 1; Fracción soluble lisis celular. 2; Proteínas no unidas 3; Lavado 1 buffer de lisis. 4; Lavado 2 buffer de lisis. (5-9). Eluidos 20 mM de maltosa. (←); La flecha negra señala la banda de la proteína recombinante. SDS-PAGE 10%. Azul Coomassie. (M); Marcador kDa.



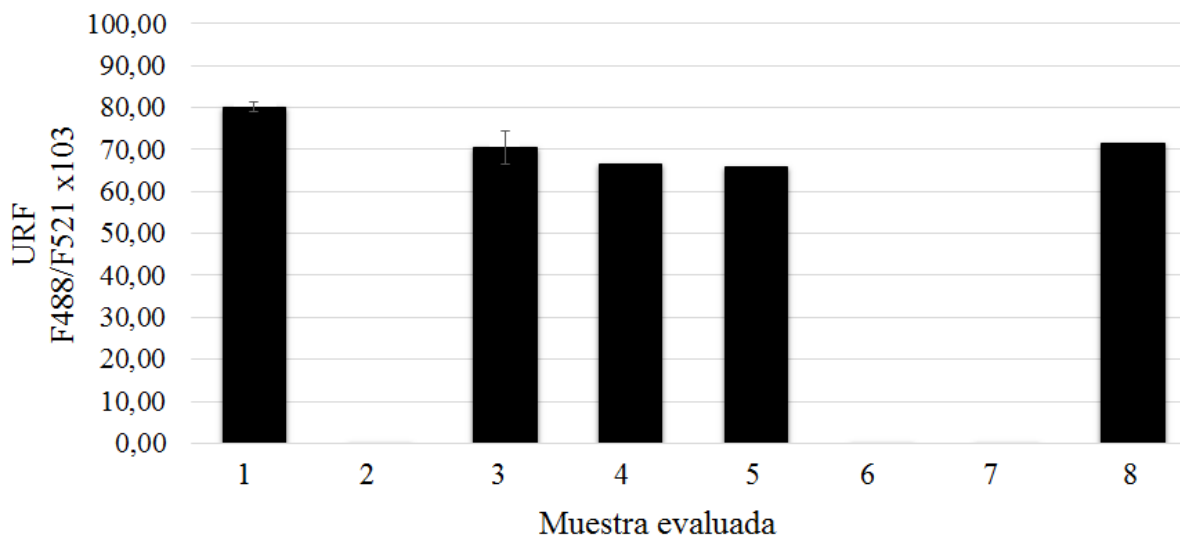
El ensayo empleado para determinar la actividad deacetilasa, consiste en un péptido acetilado acoplado a un fluoróforo y a un *quencher*, el cual al ser deacetilado por la actividad sirtuina, es sustrato de la acción de una peptidasa, liberándose el fluoróforo del *quencher*. La excitación a 488 nm y medición de la fluorescencia emitida a 521 nm, es una medida de la actividad deacetilasa de la proteína evaluada. La ausencia de inhibidor proteasas durante la lisis celular es recomendada por la casa comercial para evitar inhibición de la péptidasa empleada en el ensayo de actividad.

La figura 5-11 muestra como la fracción soluble BI21 DE3 con sobre-expresión de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2,1, presenta mayor emisión de fluorescencia que la fracción soluble de células BI21 DE3 sin transformar, para corroborar que la responsable de la deacetilación del péptido sustrato acetilado fuese la proteína Hisx6GdSir2.1, esta recombinante se sometió a un ensayo de deacetilación en presencia o ausencia de NAD⁺, los resultados muestran que la proteína recombinante es capaz de llevar a cabo la deacetilación del péptido sustrato en presencia de NAD⁺, pero en ausencia de esta molécula

su capacidad deacetilasa se reduce de manera drástica, lo cual es característico de las deacetilasas dependientes de NAD^+ (Sirtuinas). Tomados en conjunto estos resultados es posible entonces concluir, que el candidato GdSir2.1 de *G. duodenalis* es una sirtuina, la cual pertenece a la familia de las deacetilasas histonas clase III.

Figura 5-11: Evaluación de la capacidad deacetilasa del candidato GdSir2.1.

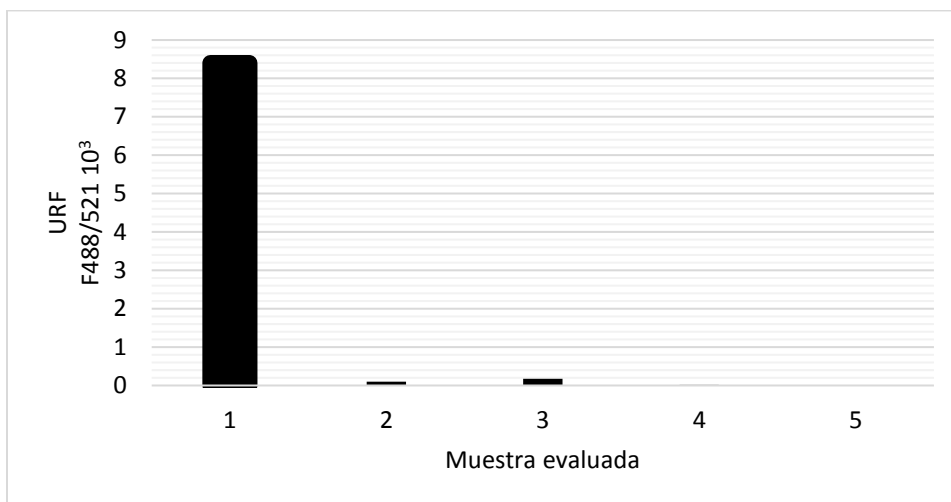
1; Fracción soluble de la lisis celular pET100/D-TOPO-GdSir2.1. (31.4ng) 2; Fracción soluble de células BL21 DE3 sin transformar (22.1ng). (3-5); Diferentes cantidades de proteína recombinante obtenida por purificación de afinidad a níquel 1.7, 0.85, 0.425ng respectivamente. 6; 1.7ng de proteína recombinante Hisx6-GdSir2.1 sin NAD^+ en la reacción. 7; 5ul de buffer de elución 300mM de imidazol. 8; Control positivo de deacetilación, proteína recombinante SIRT2 humana otorgada por el kit.



Los ensayos de actividad empleando la proteína MBP-GdSir2.2 purificada, no arrojaron resultados concluyentes de su capacidad deacetilasa, pese a que la fusión de la proteína MBP a la GdSir2.2 permitió su solubilización y su purificación por cromatografía de afinidad (Fig. 5-12). La inactividad catalítica del constructo MBP-GdSir2.2 podría atribuirse a que la etiqueta de la MBP (42.5 kDa) e intrínsecamente el tamaño del constructo MBP-GdSir2.2 (106.3 kDa), generó modificaciones en la estructura activa de la proteína de interés, alterando su actividad enzimática.

Figura 5-12: Evaluación de la capacidad deacetilasa del candidato GdSir2.2.

1; Control positivo de deacetilación, proteína recombinante SIRT2 humana otorgada por el kit. 2; Fracción soluble de células BL21 DE3 sin transformar 3; Fracción soluble de la lisis celular pMAL C5X-GdSir2.2. 4; Fracción soluble de la lisis celular pMAL C5X-GdSir2.2 sin NAD⁺ en la reacción. 5; 200 ng de proteína MBP-GdSir2.2.



Debido al aparente efecto negativo de la etiqueta MBP sobre la actividad catalítica de las GdSir2.2 y a los problemas de solubilidad inicialmente mencionados, se decidió abordar una estrategia de renaturalización de la proteína Hisx6-Gdsir2.2 a partir de cuerpos de inclusión presentes en la fracción insoluble de células Shuffle. Como se mencionó anteriormente, la aparición de cuerpos de inclusión durante la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* es un fenómeno muy corriente⁸⁴. Este hecho ha generado el desarrollo de estrategias experimentales que aprovechan la expresión mayoritaria de la proteína de interés en estos agregados proteicos insolubles, para obtener proteína soluble y catalíticamente activa⁸⁵. En términos generales estos ensayos consisten en la desnaturalización y solubilización de las proteínas del cuerpo de inclusión por acción de agentes desnaturalizantes como la urea o el cloruro de guanidinio, seguido de la purificación de las mismas empelando por ejemplo cromatografía de afinidad y un paso final en el que se retira en agente desnaturalizante y se propicia el replegamiento de la proteína. Estos

ensayos de renaturalización a partir de cuerpos de inclusión, han mostrado ser efectivos para la obtención de sirtuinas⁸⁶ y otras proteínas catalíticamente activas⁸⁷.

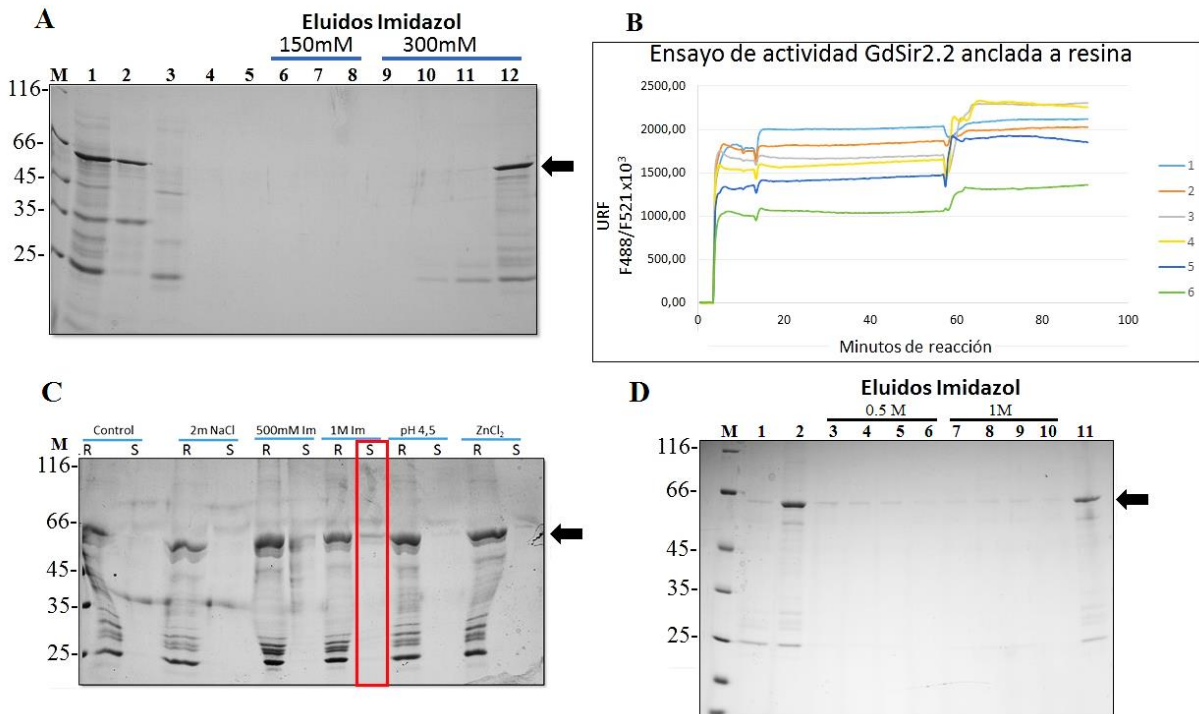
Con el objetivo de obtener proteína Hisx6-GdSir2.2 soluble, se empleó la fracción insoluble de los clones Shuffle-GdSir2.2 en ensayos de renaturalización. Las proteínas fueron desnaturalizadas en buffer fosfatos con 8 M de urea y los cuerpos de inclusión fueron disgregados mecánicamente en un homogenizador de embolo, las proteínas solubilizadas fueron sometidas a cromatografía de afinidad a níquel, donde fueron renaturalizadas ancladas a la resina mediante el paso secuencial a través de la columna de buffers de renaturalización como se describe en la sección de metodología. La Figura 5-13 A muestra la renaturalización y purificación en columna de la proteína Hisx6-GdSir2.2 y en ella se observa que al final de la purificación la proteína permanece anclada mayoritariamente a la resina y no es obtenida en los eluidos empleando 150 y 300 mM de imidazol.

Para mejorar la elución de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.2 de la resina, se evaluaron modificaciones en términos de fuerza iónica, concentración de imidazol, pH y la presencia de zinc en el buffer de elución. La figura 5-13 C muestra que en las condiciones evaluadas, el incremento en la concentración de Imidazol (0,5 y 1 M) mejora la obtención de proteína soluble, pese a que esta continua mayoritariamente anclada a la resina, la obtención de eluidos con esta concentración de imidazol permitió la obtención de la proteína recombinante soluble y purificada (Fig. 5-13 D)

Con el supuesto de que la renaturalización hubiese sido exitosa, aunque no fue posible la elución, se realizaron ensayos de deacetilación evaluando el efecto de diferentes buffers en la actividad catalítica de la Hisx6-GdSir2.2 anclada a la resina y con la proteína obtenida luego de la estandarización de las condiciones de elución. Al realizar estos ensayos no fue posible determinar la actividad catalítica de este candidato (Fig. 5-13 B), estos resultados pueden ser debidos a una renaturalización incompleta de la proteína.

Figura 5-13: Renaturalización de la proteína Hisx6-GdSir2.2 a partir de cuerpos de inclusión y evaluación de actividad.

(A). SDS-PAGE- Coomassie. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína Hisx6-GdSir2.2. 1; proteínas solubilizadas con 8 M de urea. 2; Proteínas no unidas. 3; Lavado 1 con 75 mM de imidazol y 8 M de urea. 4; Lavado 8 con 75 mM de imidazol y 8 M de urea. 5; lavado con 0,25 M de urea. 6-8; Eluidos con 150 mM de imidazol. 9-12; Eluidos con 300 mM de imidazol. 12; Resina luego de la elución. **(B).** Ensayo de actividad con la proteína unida a la resina de cromatografía de afinidad a níquel bajo diferentes buffer de deacetilación. 1; Buffer de deacetilación SIRT1 Kit Cyclex 2; Buffer de deacetilación SIRT2 Kit Cyclex 3; Buffer Sirtuina. 4; Buffer de acetilación. 5; Buffer SIRT2 6; Resina sola, control negativo. **(C).** SDS-PAGE- Coomassie. Evaluación de las condiciones para la elución de Hisx6-GdSir2.2 empleando el buffer 20 mM fosfatos, 500 mM NaCl pH: 7,4 modificado con: 2M NaCl, 500 mM o 1 M de imidazol, cambio a pH 4.5 y adición de 5 mM ZnCl₂ como se indica en la figura. R; resina. S; Sobrenadante. **(D).** SDS-PAGE- Coomassie. Elución con imidazol de la Hisx6-GdSir2.2. 1; 300 mM, 2; Resina. (3-6); 0.5M. (7-10); 1 M. 11; Resina luego de la purificación.



Los resultados hasta ahora abordados permiten identificar a la proteína GdSir2.1 de *G. duodenalis* como una deacetilasa dependiente de NAD⁺, la cual hace parte de la familia sirtuina. La presencia en la fracción soluble de la lisis celular y la purificación por cromatografía de afinidad de la Hisx6-GdSir2.1, son importantes para trabajos futuros no abordados en este escrito, los cuales irán orientados a caracterizar *in vitro* la actividad enzimática de esta proteína deacetilasa.

Al momento de la elaboración de este escrito no se ha determinado la capacidad deacetilasa *in vitro* de la GdSir2.2 por parte de nuestro grupo de investigación. No obstante, recientemente Wang *et al* 2016, publicaron un artículo en el cual se hace mención a la clonación y determinación de la capacidad deacetilasa del candidato GdSir2.2, renaturalizado a partir de cuerpos de inclusión⁵², la renaturalización permite determinar la capacidad deacetilasa pero impide conocer la cantidad de proteína GdSir2.2 realmente activa en el ensayo y por lo tanto dificulta determinar las constantes enzimáticas reales de la proteína, por esta razón nosotros buscamos en este trabajo mejorar las condiciones de solubilidad de la proteína en aras de caracterizarla mejor enzimáticamente en el futuro. A pesar de que la actividad de la GdSir2.2 de *G. duodenalis* ya ha sido determinada, nuestro laboratorio ha dado un gran paso al lograr su expresión y purificación de forma soluble al adicionarle la etiqueta MBP, aunque su capacidad deacetilasa permanezca por ser determinada por nuestra parte.

Los resultados mostrados hasta este momento permiten concluir, como lo surgieron los resultados de caracterización bioinformática y se ha corroborado experimentalmente, que las GdSir2.1 y GdSir2.2 de *G. duodenalis*, son proteínas con capacidad deacetilasa dependiente de NAD⁺ pertenecientes a la familia sirtuina. Este trabajo ha aportado a la ciencia la identificación del segundo miembro de la familia sirtuina (GdSir2.1) hasta hora descrito para *Giardia* y permitió la solubilización del primero (GdSir2.2) mediante su fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP).

5.3 Aproximación *in vivo* a la caracterización de las sirtuinas GdSir2.1 y GdSir2.2 de *G. duodenalis*

Para continuar con la caracterización a nivel *in vivo* y llevar a cabo el reconocimiento inmunológico y la determinación de la localización subcelular de las proteínas GdSir2.1 y GdSir2.2 en *G. duodenalis*, se desarrollaron anticuerpos policlonales aviares anti-Hisx6-GdSir2.1 y policlonales murinos anti-Hisx6-GdSir2.2, empleando las proteínas purificadas a partir de cuerpos de inclusión obtenidos tras su expresión en células BI21 DE3. El proceso de generación y obtención de los anticuerpos, así como los resultados obtenidos se describen a continuación.

5.3.1 Generación, obtención y caracterización de los IgYs aviares anti-Hisx6-GdSir2.1 e IgGs murinos anti-Hisx6-GdSir2.2

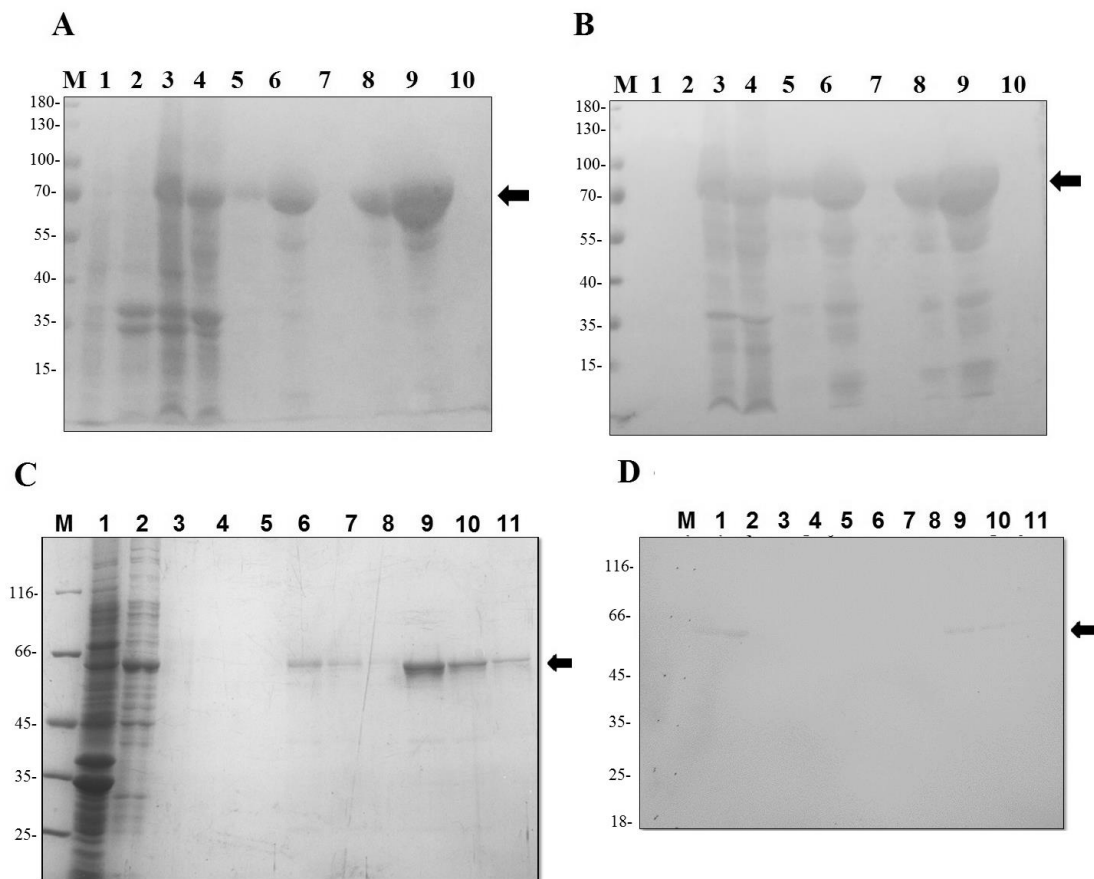
Para la generación de anticuerpos policlonales, se purificaron de manera independiente las proteínas Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2 a partir de la fracción insoluble obtenida en la lisis celular de células BI21 DE3. En este proceso de purificación los cuerpos de inclusión presentes en la fracción insoluble y enriquecidos con las proteínas de interés, se lavaron con buffers que contienen: urea, DTT y Tritón X-100, a fin de eliminar contaminantes provenientes de detritos celulares tales como: fosfolípidos de la membrana celular, proteínas citoplasmáticas, componentes ribosomales y ácidos nucleicos (RNA y DNA)⁸⁵, los cuales pueden generar reacción inmunológica al ser inoculados en los animales. Posterior a los lavados, los cuerpos de inclusión con las proteínas parcialmente purificadas, fueron resuspendidos con 8 M de cloruro de guanidinio, luego de lo cual se sometieron estas muestras a diálisis para obtener las proteínas de interés en el pellet. Con el propósito de aumentar la pureza, el pellet de la diálisis fue resuspendido en PBS y se sometió a SDS-PAGE preparativo. Las bandas en el gel de acrilamida del tamaño aproximado a las proteínas, se identificaron empleando marcador preteñido y fueron luego cortadas, maceradas e incubadas en agua desionizada, para obtener finalmente las proteínas Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2 solubles purificadas.

La figura 5-14 A, resume el proceso de purificación de la proteína Hisx6-GdSir2.1 y en ella se observa como la recombinante es purificada desde la fracción insoluble. Debido a que

la proteína fue obtenida a una baja concentración (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Fig. 5-14 A Línea 8), fue necesario concentrarla mediante centrifugación empleando filtros Amicom de 10 kDa (EMD Millipore), este proceso permitió obtener la proteína recombinante concentrada en el retentado luego de la centrifugación (0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Fig 5-14 A línea 9). El western blot empleando anticuerpos anti-Hisx6 permitió identificar que la banda concentrada y purificada corresponde a la Hisx6-GdSir2.1, la cual sufre procesos de degradación tras la purificación, evidenciado en los reconocimientos de tamaño molecular menor a 70 kDa (Fig 5-14 B). La figura 5-14 C por su parte, muestra el proceso de purificación de la proteína Hisx6-GdSir2.2 partir de la fracción insoluble de la lisis celular. El western blot empleando anti-histidinas permitió identificar que la banda obtenida tras la elución con agua desionizada corresponde a la Hisx6-GdSir2.2 purificada (Fig. 5-14 D). Estas proteínas recombinantes purificadas fueron empleadas en la inoculación de gallinas Babcock Brown para el caso de la proteína Hisx6-GdSir2.1 o en ratones BALB-C para la proteína Hisx6-GdSir2.2.

Figura 5-14: Purificación de Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2 por SDS-PAGE preparativa a partir de cuerpos de inclusión de BL21 DE3.

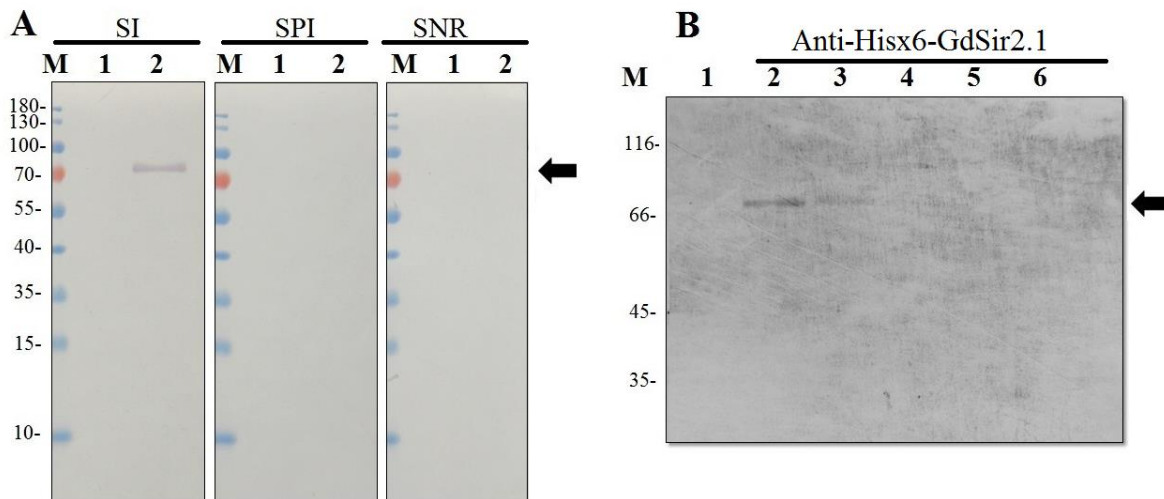
(A). Monitoreo de la purificación Hisx6-GdSir2.1, membrana de nitrocelulosa – Rojo Ponceau. 1; Pt células sin transformar. 2; Fi células sin inducir. 3; Fi células 16h postinducción. 4; Cuerpo de inclusión, pellet diálisis 8M de cloruro de guanidinio. 5-9; Análisis lavados bandas de acrilamida. 5; Bm. 6; Retentato bm. 7; Filtrato bm. 8; Bi. 9; Retentato bi 10; Filtrato bi. (B). Wb anti-His sobre la membrana mostrada en A. (C y D). Monitoreo de la purificación de Hisx6-GdSir2.2 (C). SDS-PAGE, azul de Coomassie. (D) Wb anti-His-Nitrocelulosa. 1; Fi células 16h postinducción. 2; Cuerpo de inclusión, pellet diálisis 8M de cloruro de guanidinio. (3-11) lavados de la acrilamida y purificación de la proteína recombinante. (wb); Western blot. (M); Marcador kDa. (bm); Banda media (bi); Banda inferior (bs); Banda superior. (←); La flecha negra señala la banda de la proteína recombinante o su reconocimiento en el western blot. (Pt); Proteínas totales. (Fs); Fracción soluble. (Fi): fracción insoluble. (h): horas.



A continuación, se describen los resultados de la caracterización por western blot de los sueros obtenidos de la inoculación de estas proteínas a los animales. La evaluación de los sueros aviares anti-Hisx6-GdSir2.1 mostro que el suero inmune obtenido es capaz de reconocer 100 ng del eluido 2 de la proteína purificada por cromatografía de afinidad (Fig. 5-10 A, Fig. 5-17 A línea 2) a una dilución de 1:5000, mientras que los sueros no relacionado (gallina inoculada con el vehículo) y preinmune, no reconocen esta cantidad de recombinante (Fig. 5-15 A). Para mejorar la especificidad de los anticuerpos, se realizó un proceso de purificación del suero inmune obtenido por afinidad a la proteína Hisx6-GdSir2.1 desnaturalizada y anclada a una membrana de nitrocelulosa. Estos anticuerpos purificados evaluados fueros capaces de reconocer 25ng de proteína recombinante a una dilución de 1:3000 (Fig. 5-15 B).

Figura 5-15: Caracterización de los anticuerpos policlonales aviares anti-Hisx6-GdSir2.1

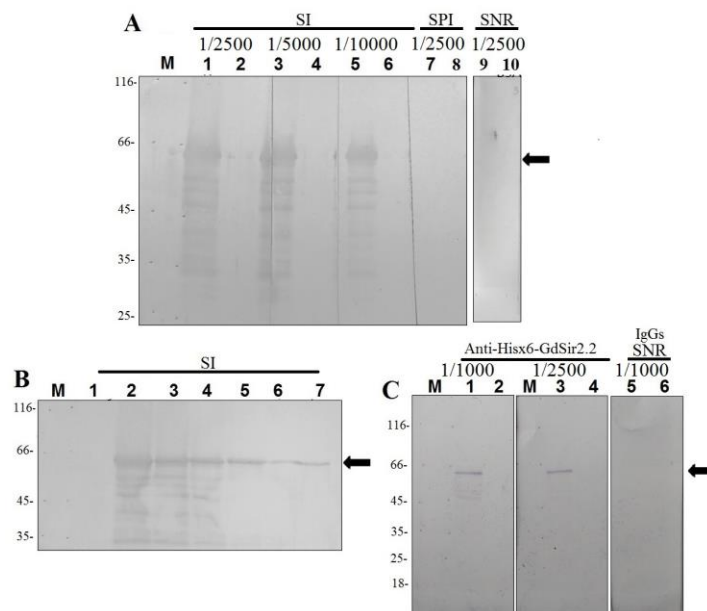
(A). Evaluación de los sueros obtenidos de gallinas inoculadas contra 100 ng de la proteína Hisx6-GdSir2.1 y 100ng de BSA. SI; Suero inmune anti-Hisx6-GdSir2.1 dilución 1/5000. SPI: Suero preinmune dilución 1:5000. SNR: Suero no relacionado dilución 1:5000. 1; 100 ng de la proteína Hisx6-GdSir2.1. 2; 100 ng de BSA (B). Evaluación por wb de los anticuerpos anti- Hisx6-GdSir2.1 purificados. 1; 100 ng de BSA. (2-6); 50 a 3 ng de proteína recombinante Hisx6-GdSir2.1 respectivamente. (←); La flecha negra señala la banda de la proteína recombinante o su reconocimiento en el western blot. M; Marcador de peso molecular.



Por su parte, en la evaluación de los sueros murinos anti-Hisx6-GdSir2.2, se encontró que el suero inmune obtenido es capaz de reconocer 200ng de la proteína recombinante purificada por SDS-PAGE preparativo (Fig. 5-14 C. Fig. 5-17 A línea 1), hasta una dilución de 1/10.000, mientras que el suero preinmune y el suero no relacionado (ratón inoculado con el vehículo), a una dilución de 1/2500 no reconocen esta cantidad de proteína (Fig. 5-16 A). Para evaluar la cantidad mínima de proteína recombinante capaz de ser reconocida por el suero inmune, se realizó un western blot empleando diferentes cantidades de proteína recombinante con una dilución constante del suero (1/10000), con lo cual el suero obtenido es capaz de reconocer hasta 6ng de proteína (Fig. 5-16 B). El suero inmune fue purificado empleado la proteína recombinante y este purificado fue capaz de reconocer 10 ng de esta proteína en diluciones de 1/1000 y 1/2500, mientras que el purificado del suero no relacionado no detecto la proteína (Fig. 5-16C).

Figura 5-16: Caracterización de los anticuerpos policlonales murinos anti-Hisx6-GdSir2.2

(A). Evaluación del suero inmune (SI) en diluciones 1/2500 (1 y 2), 1/5000 (3 y 4) y 1/10000 (5 y 6) contra 200ng de proteína: Hisx6-GdSir2.2 (1, 3, 5, 7 y 9) y BSA (2, 4, 6, 8 y 10). (7 y 8); Suero preinmune (SPI) 1/2500. (9 y 10); Suero no relacionado (SNR) 1/2500. (B). Evaluación por wb del SI 1/10000. 1; 200ng de BSA. (2-7); 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 ng de recombinante. (C). Wb con los anticuerpos purificados del SI diluciones 1/1000 (1 y 2) y 1/2500 (3 y 4) y SNR 1/1000 (5 y 6) 10ng recombinante y 200ng BSA. (M); Marcador kDa. (←); La flecha negra señala la banda de la proteína recombinante o su reconocimiento en el western blot. (SI); Suero inmune. (SNR); Suero no relacionado. (SPI); Suero preinmune.

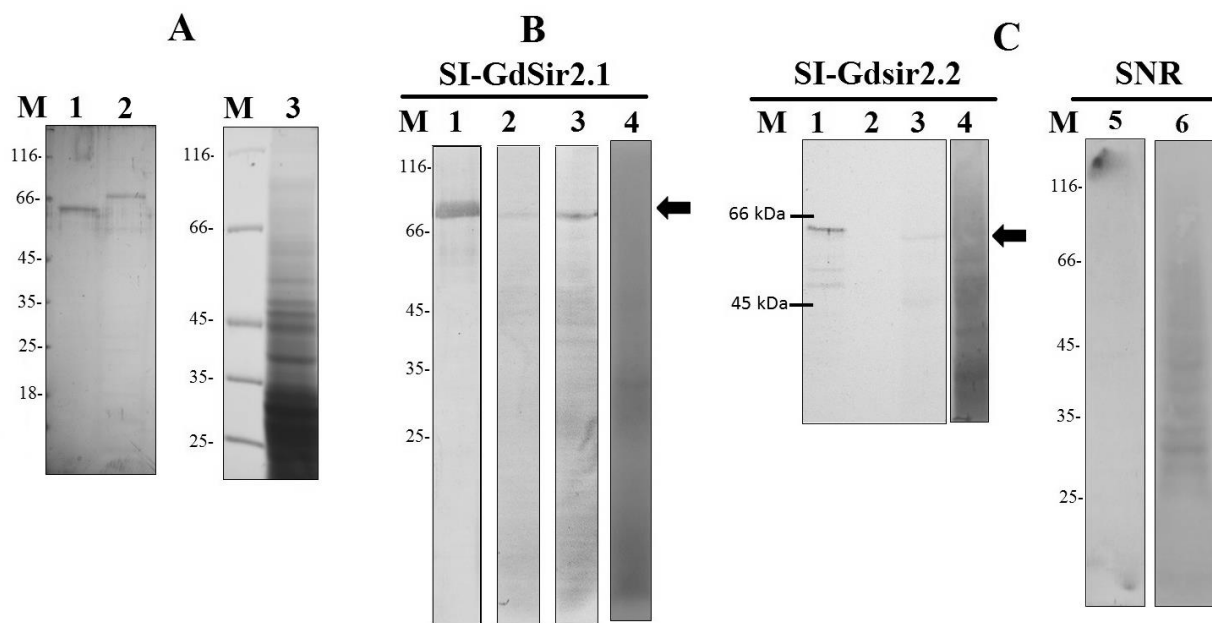


5.3.1 Inmunodetección y localización subcelular de las proteínas GdSir2.1 y GdSir2.2 endógenas de *G. duodenalis*.

Con los anticuerpos purificados y evaluados por western blot, se llevó cabo la inmunodetección de las proteínas GdSir2.1 y GdSir2.2 a nivel de proteínas totales de trofozoítos de *G. duodenalis* WB resuspendidos en buffer de carga 1X para SDS-PAGE (Fig. 5-17 A), el western blot de estos extractos proteicos con los anticuerpos aviares generados y purificados, permitió el reconocimiento específico de una banda superior a 64 kDa, la cual corresponde con el peso aproximado esperado para la proteína endógena GdSir2.1 del parásito (74 kDa) (Fig. 5-17 B). Los inmunoreconocimientos llevados a cabo con los anticuerpos murinos purificados del suero inmune, sobre los extractos de proteínas totales de *Giardia*, reconocieron específicamente una banda con un peso aproximado de 62 kDa el cual es el peso esperado para la proteína GdSir2.2 endógena, los anticuerpos purificados del suero no relacionado no reconocieron banda específica en el western blot (Fig. 5-17 C). Como controles positivos se emplearon las proteínas recombinantes purificadas. Estos resultados de inmunodetección permiten concluir que las sirtuinas GdSir2.1 y GdSir2.2 son traduccionalmente activas en *Giardia*, las cuales presentan los tamaños esperados en el parásito (GdSir2.1; 74 kDa y GdSir2.2; 62 kDa).

Figura 5-17: Inmunodetección de GdSir2.1 y GdSir2.2 en extractos de proteínas totales de *G. duodenalis*

(A). Verificación de los extractos de proteínas totales de trofozoítos de *G. duodenalis*. 1; Hisx6-GdSir2.2 (200 ng) 2; Hisx6-GdSir2.1 (200 ng) 3; Proteínas obtenidas por resuspensión de trofozoítos en buffer de carga para SDS-PAGE 1X. (B). Inmunodetección de GdSir2.1 empleando IgYs purificados. 1; 50 ng de Hisx6-GdSir2.1 dilución 1:250. 2-3; Extractos celulares, IgYs dilución 1:500 y 1:250. 4; Rojo Ponceau del extracto celular. (C). Inmunodetección de GdSir2.2 empleando IgGs purificados. 1; 6 ng de Hisx6-GdSir2.2. 2; 200 ng BSA. 3; IgGs dilución 1:1000. 4; Rojo Ponceau del extracto celular antes del reconocimiento. 5; Suero no relacionado (SNR). 6; Rojo de Ponceau. 2×10^6 parásitos por carril. (M); Marcador de peso molecular en kDa. Membrana de Nitrocelulosa-Fosfatasa alcalina. (←); La flecha negra señala la banda de la proteína recombinante o su reconocimiento en el western blot.



Los anticuerpos generados fueron empleados en ensayos de inmunofluorescencia indirectos cuyo objetivo fue determinar la localización subcelular de estas proteínas en trofozoítos del parásito. La figura 5-18 muestra la localización subcelular de la proteína GdSir2.1, los resultados obtenidos muestran un reconocimiento citoplasmático para esta proteína con el suero inmune, mientras que los sueros preinmune y no relacionado no mostraron señales en el parásito. Por su parte la determinación de la localización subcelular de la proteína GdSir2.2, empleando los anticuerpos policlonales murinos, arrojo una localización principalmente nuclear en el parásito (Fig. 5-19).

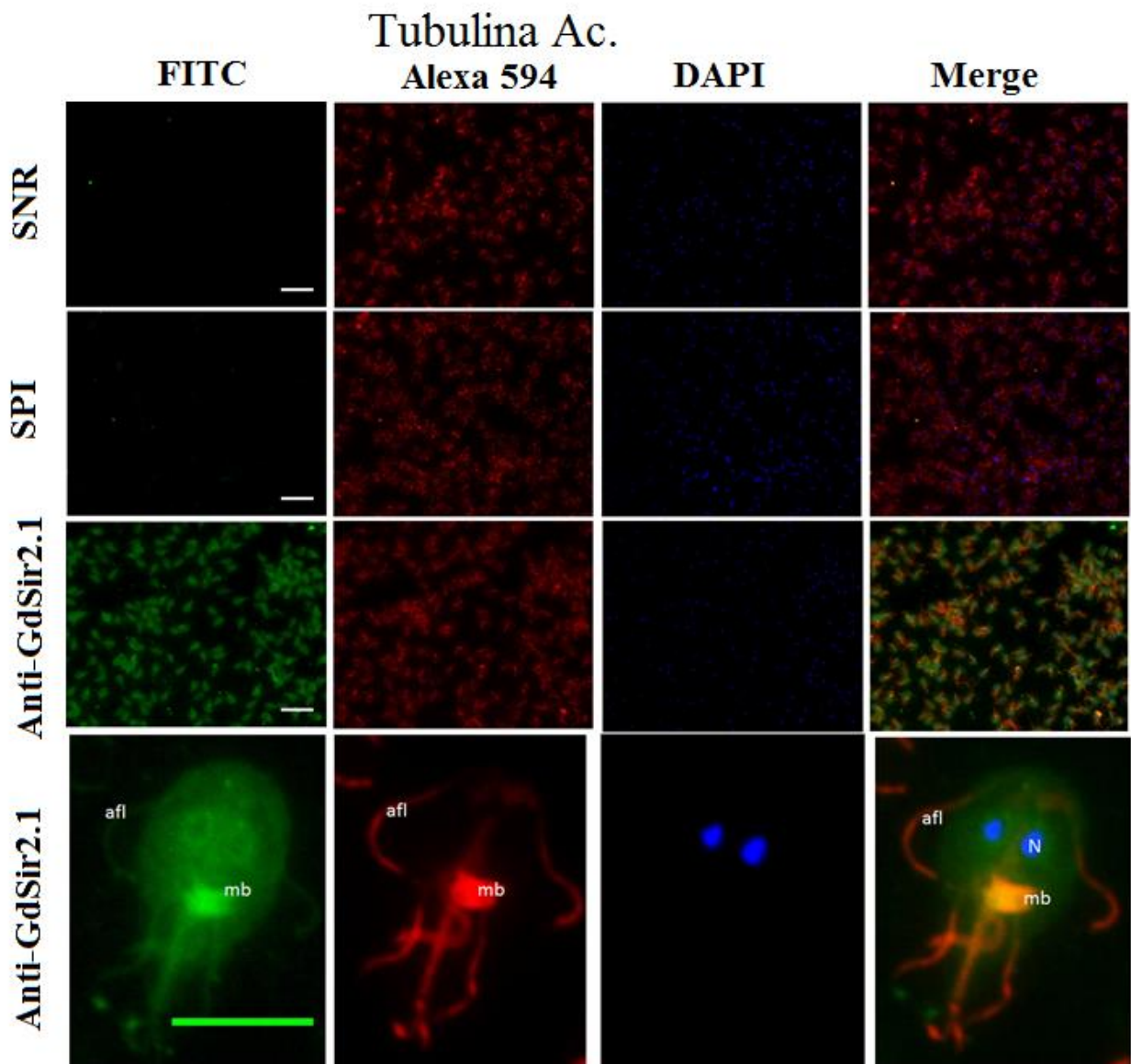
Con respecto a la localización de estas proteínas en *Giardia*, en un trabajo desarrollado y publicado por Carranza y colaboradores en el 2016⁸⁸, se ha determinado por medio de sobreexpresión en trofozoítos una localización citoplasmática y nuclear de las proteínas GdSir2.1 y GdSir2.2 respectivamente, al ser expresadas desde el vector pTUB-NT unidas a una etiqueta de hematoglutinina en el parásito (HA) (Fig. 5-20). Esta determinación de la localización subcelular por sobreexpresión arrojo al igual que nuestros resultados de localización de la proteína endógena, una distribución citoplasmática de la GdSir2.1 en el parásito, no obstante nuestros resultados sugieren de manera adicional, una asociación entre la Gdsir2.1 y estructuras del citoesqueleto, tales como los flagelos y el cuerpo mediano

en *Giardia*, reconocidos con anticuerpos anti-tubulina acetilada. La aparente interacción entre la Gdsir2.1 y el cuerpo mediano del parásito es interesante teniendo en cuenta que esta estructura ha sido propuesta como un reservorio de tubulina, la cual puede ser importante para el ciclo celular de este parásito⁸⁹.

Los resultados experimentales obtenidos están en concordancia con los encontrados en la sección bioinformática, en la cual se mostró que el modelo tridimensional predicho para la GdSir2.1, es homólogo a la estructura resuelta para la SIRT2 humana, una proteína típicamente citoplasmática asociada a citoesqueleto y con capacidad α -tubulin deacetilasa. Aunque los resultados de sobreexpresión y nuestros resultados muestran una localización principalmente citoplasmática para esta proteína en *G. duodenalis*, no puede descartarse una distribución nuclear de la misma en contextos celulares específicos, tal y como ocurre con la SIRT2 humana, la cual es importante en regulación del ciclo celular y cambia de su localización citoplasmática a una nuclear al ser importada durante la mitosis. Aún permanece por determinarse experimentalmente, si al igual que las proteínas citoplasmáticas SIRT2 humana⁹⁰, LiSIR2rp1 de *L. infantum*⁹¹ y EhSir2a de *E. histolytica*³⁴, la sirtuina GdSir2.1 de *G. duodenalis* tiene como sustrato de deacetilación a la α -Tubulina, como nuestros resultados de inmunolocalización lo sugieren.

Figura 5-18: La GdSir2.1 de *G. duodenalis* es una proteína con localización citoplasmática.

Los sueros; no relacionado (SNR), preinmune (SPI) e inmune, fueron empleados en un ensayo de inmunofluorescencia indirecto para determinar la localización subcelular de la proteína GdSir2.1 en el parásito. Verde; Localización de la proteína GdSir2.1 empleando anticuerpos aviares purificados. Rojo; Localización de la α -tubulina acetilada empleando anticuerpos murinos comerciales. Azul; DAPI, localización de los núcleos. Barras blancas; 50 μ M. Barra verde; 5 μ M. afl; Flagelo anterior lateral. mb; Median body. SPI; Suero preinmune. SNR; Suero no relacionado. SI: Suero inmune Anti-GdSir2.1.



Con respecto a la localización de GdSir2.2 como se mencionó anteriormente, nuestros resultados sugieren una localización nuclear (Fig. 5-19), lo cual también ha sido observado en dos trabajos independientes recientemente publicados, empleando inmunolocalización de la proteína con anticuerpos desarrollados en conejo⁵² y sobre-expresión⁸⁸ respectivamente (Fig. 5-20 B). Estas tres aproximaciones experimentales permiten establecer una localización nuclear para la GdSir2.2 de *Giardia*.

Los resultados experimentales obtenidos son congruentes con los encontrados bioinformáticamente, en donde se evidencia la similitud estructural del dominio 3D predicho para la sirtuina GdSir2.2 y la SIRT1 humana, la cual al igual que esta sirtuina de *Giardia* presenta una localización nuclear. Esta similitud en términos de estructura predicha y localización subcelular entre las GdSir2.2 y SIRT1, puede dar indicio de papel funcional que cumple esta proteína en *Giardia*, la SIRT1 es una proteína envuelta en fenómenos de supervivencia celular, bajo condiciones de estrés energético-nutricional por inhibición de la apoptosis mediante regulación negativa de p53²¹. La similitud hasta ahora encontrada, permite postular que la GdSir2.2 podría verse involucrada en mecanismos de supervivencia celular en este parásito. No obstante, a pesar de esta inferencia, la función biológica y una posible translocación citoplasmática de la GdSir2.2 permanecen por ser determinadas experimentalmente.

Los resultados discutidos hasta este momento, indican la presencia de múltiples sirtuinas funcionales en *G. duodenalis*, las cuales al estar localizadas en compartimientos subcelulares diferentes, (Gdsir2.1; citoplasmática y GdSir2.2; nuclear) pueden ejercer funciones metabólicas diferenciales en este parásito, tal y como ya menciono que ocurre en el caso de las sirtuinas presentes en humanos, de las cuales; la SIRT1 es una proteína nuclear con papel en la reparación del DNA, inhibición de apoptosis y supervivencia celular. Mientras que la SIRT2 es una proteína típicamente citoplasmática, involucrada en la deacetilación de α -tubulina^{92,90}, regulación del citoesqueleto y control del ciclo celular⁹³. La determinación de los procesos metabólicos y regulatorios en los cuales se encuentran involucradas la GdSir2.1, la GdSir2.2 y los demás candidatos a sirtuinas en *G. duodenalis*, permanecen por ser resueltos.

Figura 5-19: La GdSir2.2 de *G. duodenalis* es una proteína con localización nuclear.

Los sueros; no relacionado (SNR), preinmune (SPI) e inmune, fueron empleados en un ensayo de inmunofluorescencia indirecto para determinar la localización subcelular de la

proteína GdSir2.2 en Giardia. Verde; Localización de la proteína GdSir2.2 empleando los IgGs murinos producidos y purificados o la detección de α -tubulina acetilada empleando anticuerpos comerciales producidos en ratón como control positivo de proceso de inmunodetección. Azul; DAPI, localización de los núcleos. SNR; Suero no relacionado. SPI: Barras blancas; 50 μ M.

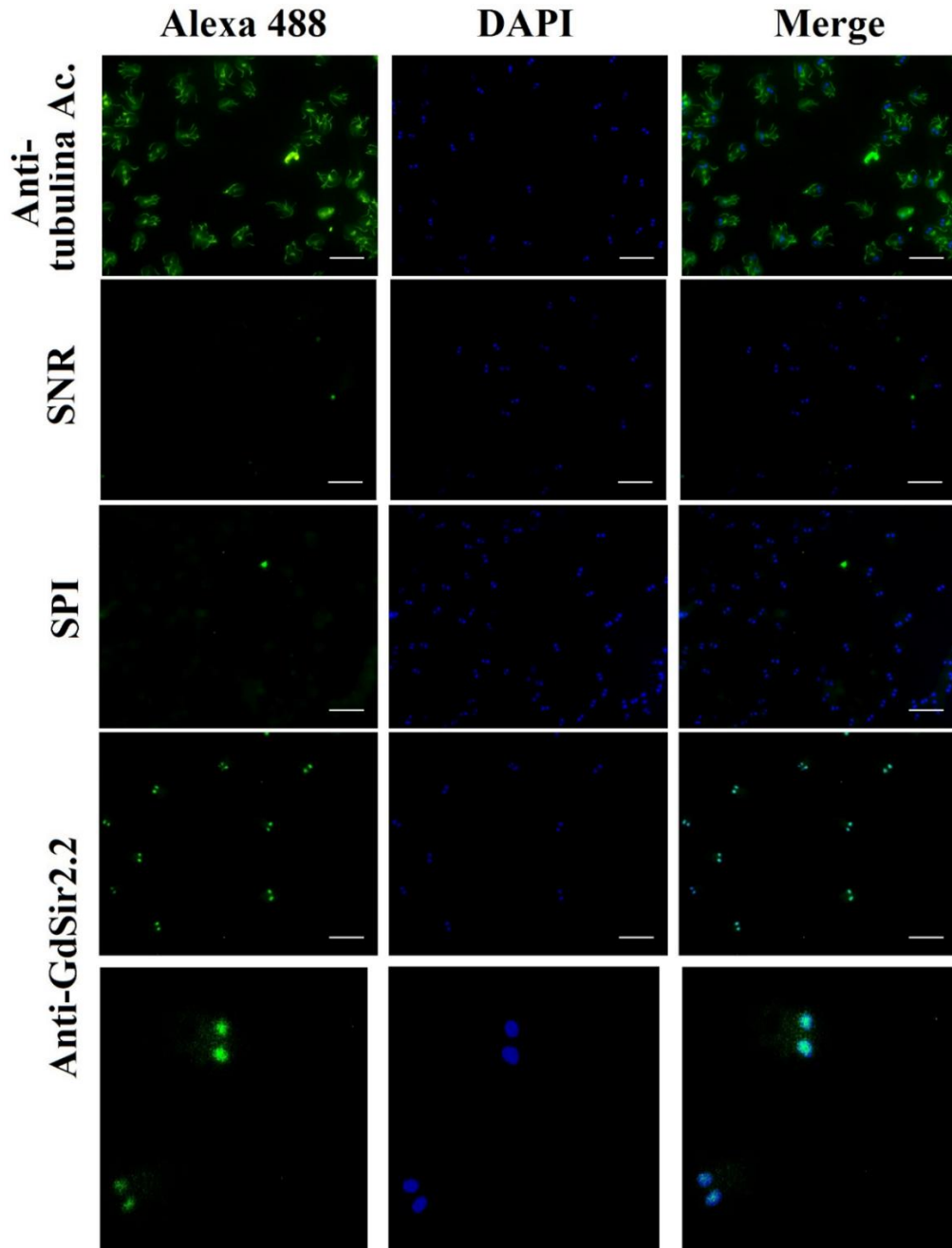
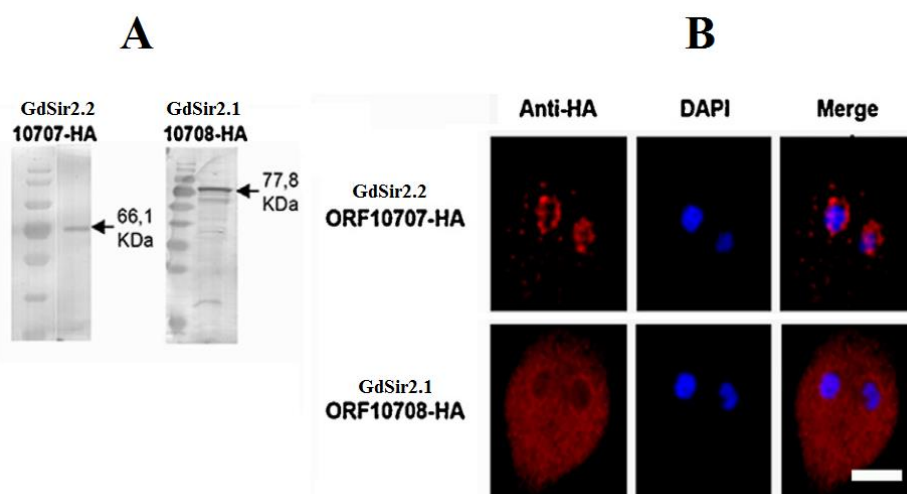


Figura 5-20: Determinación por sobre-expresión de la localización subcelular de las proteínas GdSir2.1 y GdSir2.2 en *Giardia*.

(A). Detección de las proteínas sobre-expresadas en trofozoítos transfectantes de *Giardia* empleando anticuerpos anti-HA. (B). Determinación de la localización subcelular empleando anticuerpos anti-HA. Adaptado de Carranza y colaboradores 2016⁸⁸. ORF10708: GdSir2.1 y ORF10707: GdSir2.2.



5.3.3 Evaluación de la expresión de las GdSir2.1 y GdSir2.2 en el ciclo de vida de *G. duodenalis*.

Para continuar con la caracterización de las GdSir2.1 y GdSir2.2, se realizaron experimentos orientados a detectar la expresión a lo largo del proceso de enquistación en el parásito. Como se mencionó en la sección de marco teórico, *Giardia* es un parásito protozoario que se caracteriza por presentar dos estadios en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste. La infección de un hospedero inicia con la ingesta del quiste, el cual sufre un proceso de exquistación en la región próxima al intestino para dar lugar al trofozoíto, donde éste es responsable de los síntomas generados por la Giardiasis, estos trofozoítos presentes en el intestino se diferencian a quiste mediante el proceso de enquistación, el quiste es entonces liberado al medio ambiente para infectar un nuevo hospedero^{59,3}.

El proceso de formación de quistes (enquistación), involucra cambios fuertes en la expresión génica a nivel transcripcional y traduccional, los cuales se ven reflejados en modificaciones estructurales. En términos generales este proceso puede ser dividido en una fase temprana y una tardía. La primera de estas fases se caracteriza estructuralmente por la pérdida del disco adhesivo y el desensamblaje del citoesqueleto⁴, junto con el inicio de la generación de vesículas secretoras de enquistación (ESV) cargadas con proteínas de la pared del quiste (CPW). La fase tardía se caracteriza por la división de los núcleos, replicación de DNA y una maduración completa de la pared^{3,10}.

El estudio del proceso de enquistación en *Giardia*, no solo es importante como un aporte al conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan este proceso en el parásito, sino que también aporta información extrapolable a otros parásitos tales como: *Entamoeba*, *Toxoplasma* y *Cryptosporidium*¹², los cuales tienen una fase quística u oocística propagativa en su ciclo de vida, pero que a diferencia de *Giardia* no puede llevarse a cabo a nivel *in vitro*.

5.3.4 Detección de la actividad transcripcional de las GdSir2.1 y GdSir2.2 de *G. duodenalis*.

Para evaluar la expresión a nivel transcripcional de estas sirtuinas, se realizó la extracción de RNA total de trofozoítos de la cepa WB obtenidos por cultivo *in vitro* (Fig. 5-21 A). El RNA obtenido (2µg) fue utilizado como plantilla en la síntesis de DNA complementario (cDNA), el cual fue empleado en reacciones de PCR con primers diseñados para la amplificación de los mRNAs de dineína (gen control), GdSir2.1 y GdSir2.2 (Tabla 5-2). Como control positivo en la PCR se empleó gDNA de trofozoítos y como controles negativos se usaron ensayos sin retrotranscriptasa y ensayos con agua DEPC en lugar de plantilla.

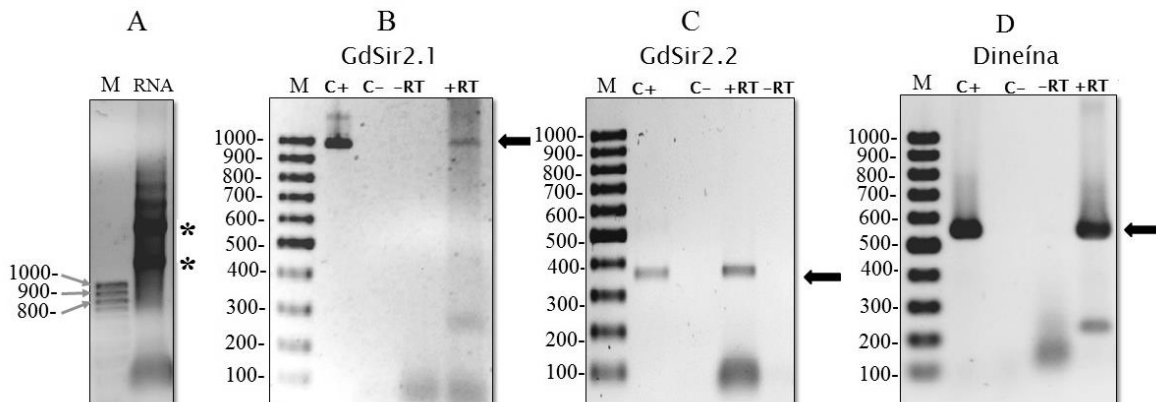
La figura 5-21 B muestra el resultado tras la evaluación del cDNA obtenido con los primers para GdSir2.1, en donde se observa un amplificado del tamaño esperado (980 pb). Por su parte, para la GdSir2.2 la PCR permitió identificar una banda de alrededor 350 pb, la cual corresponde con el tamaño esperado para el fragmento de mensajero amplificado (Fig. 5-21 C). En el análisis del gen de expresión constitutiva en trofozoítos de *Giardia* (dineína), se observó de igual forma el amplificado esperado (550pb) (Fig. 5-21 D). Los resultados

hasta este momento mostrados, permiten concluir que las GdSir2.1 y GdSir2.2 son expresadas transcripcional y traduccionalmente en trofozoítos (Fig. 5-17 B y C).

La actividad transcripcional de estos genes en trofozoítos también ha sido reportada mediante ensayos de RNA-Seq^{94,95}, en los cuales se ha podido determinar que la GdSir2.1 es transcripcionalmente más activa que la GdSir2.2 en este estadio (<http://giardiadb.org>).

Figura 5-21: Detección de la actividad transcripcional de las GdSir2.1 y GdSir2.2 de *G. duodenalis*.

(A). Perfil electroforético de RNA total extraído. (B). Amplificado GdSir2.1. (C). Amplificado GdSir2.2. (D). Amplificado Dineína. C+; Control positivo, plantilla gDNA. C-; Control negativo, plantilla H₂O DEPC. +RT; RNA tratado con retrotranscriptasa. -RT; RNA no tratado con retrotranscriptasa. *; muestra los rRNAs 28s y 18s presente en el RNA total extraído⁹⁶. (M); marcador de peso molecular en pares de bases.

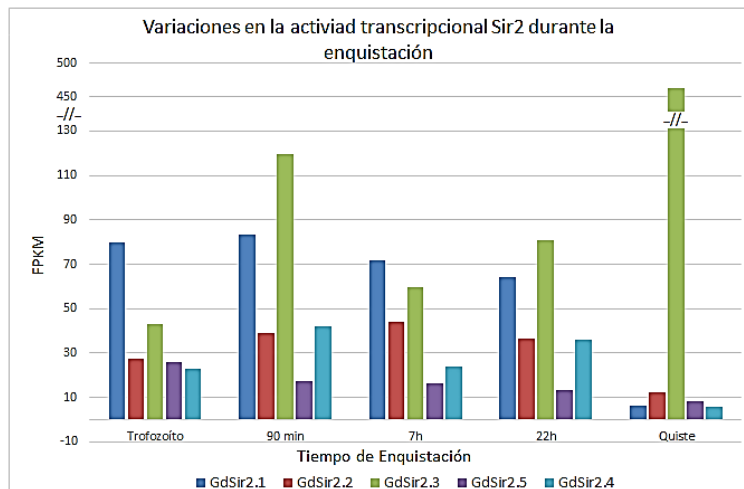


5.3.5 Expresión transcripcional de las GdSir2.1 y GdSir2.2 durante la enquistación en *Giardia*.

Como se mencionó en el apartado anterior, el análisis por PCR acoplado a retrotranscriptasa permitió identificar los mRNAs de las GdSir2.1 y GdSir2.2 en trofozoítos de *Giardia*. Para analizar los patrones de expresión de estos genes durante la enquistación, se emplearon datos recientemente publicados en los cuales se realizó un análisis por RNA-Seq del transcriptoma de *Giardia* WB C6 durante este proceso¹⁰. La figura 5-22 muestra la variación en los niveles mRNA para GdSir2.1, GdSir2.2 y los demás candidatos a sirtuina durante el proceso de enquistación, en ella se observa que existe una tendencia a la disminución en la actividad transcripcional para estos genes durante el proceso. Puntualmente para las GdSir2.1 y GdSir2.2 se observa una disminución en la expresión en quistes respecto a trofozoítos de alrededor de 13 y 2.2 veces respectivamente, lo que puede sugerir que su función celular se localiza en eventos celulares durante la fase de trofozoíto en el parásito. Adicionalmente, en el caso del candidato GdSir2.3, el cual no se abordó en el presente trabajo, se observa un aumento de 10 veces en los niveles de mRNA en quiste respecto a trofozoítos, este aumento en la actividad transcripcional podría sugerir un rol funcional de este candidato en quistes de *G. duodenalis*.

Figura 5-22: Niveles de los mRNAs para las sirtuinas durante la enquistación en *Giardia*.

Datos tomados de la información suplementaria de Einarsson *et al* 2016¹⁰. FPKM: Fragmentos por millón de kilobases.

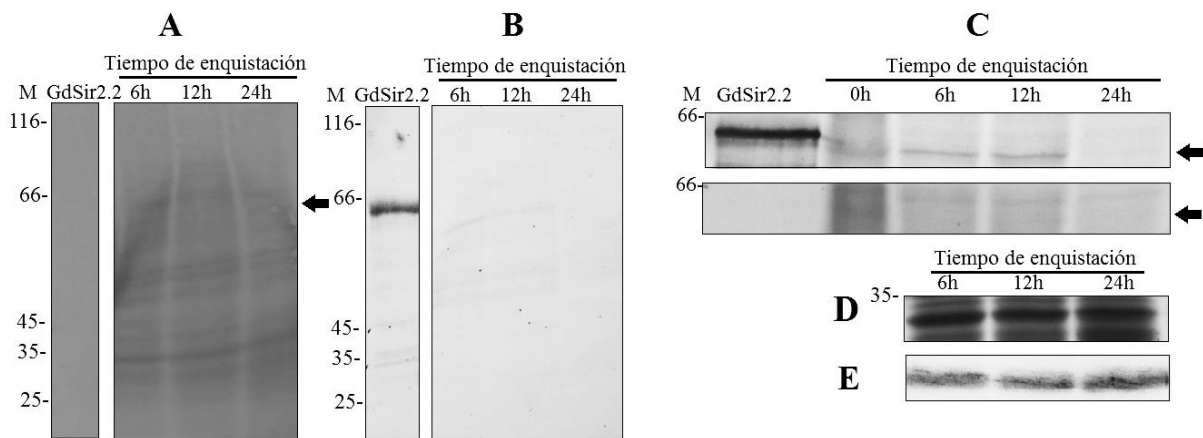


5.3.6 Expresión proteica de GdSir2.2 durante la enquistación en *Giardia*

El análisis de la variación a nivel proteico durante la enquistación se realizó únicamente para la sirtuina nuclear GdSir2.2, para esto, inicialmente se llevó a cabo la inducción de enquistación a trofozoítos de *Giardia* a nivel *in vitro* (Fig. 1-1 C y D) y se colectaron células a las 0, 6, 12 y 24 horas postinducción. Las células obtenidas se cargaron en un gel SDS-PAGE normalizando cada tiempo por número de células (2×10^6 células por carril). Sobre estas células se llevó a cabo el western blot empleando los anticuerpos policlonales murinos anti-Hisx6-GdSir2.2, este ensayo permitió determinar que la proteína es expresada en trofozoítos (Fig. 5-17C), y a las 6 y 12 horas post-enquistación, pero su expresión se ve reducida a las 24 horas (Fig. 5-23 A, B y C), como controles de carga se usaron: calmodulina de *Giardia* (17 kDa), la cual no presenta variación durante el ciclo celular en el parásito⁵⁶ y una proteína con un peso de alrededor de 35 kDa. Debido al reducido número de quistes obtenidos durante el proceso de enquistación, no fue posible determinar el nivel de expresión proteico en este estadio final, no obstante, durante el proceso se observó la disminución tanto a nivel mRNA como a nivel proteico a las 24 horas inducida la enquistación, lo cual sugiere que la proteína es más abundante en trofozoítos respecto a quistes.

Figura 5-23: Evaluación de la expresión proteica de la GdSir2.2 durante la enquistación en *Giardia*.

(A y B). Rojo Ponceau y wb anti-Hisx6-GdSir2.2 (1:3000) respectivamente. (C). Evaluación de la enquistación. Superior; wb anti-Hisx6-GdSir2.2 (1:1500). Inferior; Membrana nitrocelulosa-Rojo Ponceau antes de reconocimiento. (D). Control de carga; SDS-PAGE-Azul Coomassie, proteína tomada como control de carga (~35 kDa). (E). Control de carga; gCalmodulina (17 kDa), wb anti-Hisx6-gCaM con anticuerpos policlonales producidos en conejo. 1×10^6 células tiempo evaluado.



Ha sido previamente reportado que los patrones de acetilación en *Giardia* son importantes para el proceso de enquistación; Sonda y colaboradores en el 2010 encontraron que la inhibición en la deacetilación generada por deacetilasas de histonas no dependientes de NAD^+ bloquea potencialmente la formación de quistes en este parásito¹⁶, en un trabajo posterior se ha demostrado que la actividad sirtuina generada en las primeras etapas de la enquistación, también es importante en la regulación de este proceso⁸⁸. Nuestros resultados sugieren una disminución en el nivel de proteína GdSir2.2 a las 24 horas de enquistación, no obstante, debido a que en nuestro trabajo no se evaluaron tiempos menores a 6 horas de enquistación, permanece por determinarse si la GdSir2.2 por su localización nuclear, tiene función en el silenciamiento génico característico de las primeras etapas de la enquistación, debido a que la adición de nicotinamida (inhibidor de las Sir2), en las fases tempranas de este proceso potencialmente lo bloquea⁸⁸. Finalmente, es importante mencionar que el proceso de enquistación parece estar regulado por la acción

conjunta de histona deacetilasas dependientes e independientes de NAD⁺.

Con respecto a la proteína GdSir2.1, la evaluación de los niveles de expresión proteica durante la enquistación permanecen por ser determinados, futuros trabajos orientados a determinar a la α -tubulina como sustrato de esta proteína, y su papel en eventos de desensamble del citoesqueleto en etapas tempranas de la enquistación, permanecen por ser abordados experimentalmente.

6. Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

6.1.1 Generales

1. Se identificó a la proteína GdSir2.2 como el segundo miembro descrito para la familia sirtuina en *G. duodenalis*, mediante ensayos de deacetilación *in vitro*.
2. Se determinaron las localizaciones subcelulares: citoplasmática para la proteína GdSir2.1 y nuclear para la GdSir2.2 de *G. duodenalis* mediante inmunodetección empleando los anticuerpos aviares y murinos desarrollados.
3. Se verificó la expresión a nivel de mRNA de las GdSir2.1 y GdSir2.2 empleando retrotranscripción.
4. Se verificó la variación en los niveles de expresión proteica de GdSir2.2 durante la enquistación.

6.1.2 Específicas

- El análisis bioinformático de las estructuras primarias y terciarias predichas, permitió identificar características estructurales conservadas y universales de familia sirtuina en las GdSir2.1 y GdSir2.2.
- Se generó la expresión soluble de GdSir2.2 unida a la etiqueta MBP.
- Se determinó a nivel *in vitro* la actividad deacetilasa dependiente de NAD⁺ de la proteína recombinante Hisx6-GdSir2.1.
- Se desarrollaron anticuerpos aviares y murinos policlonales contra las proteínas Hisx6-GdSir2.1 y Hisx6-GdSir2.2, los cuales fueron fundamentales para detectar la actividad traduccional de las proteínas presentes en *Giardia*.
- Se determinó la localización subcelular de las sirtuinas en *Giardia*; citoplasmática para la GdSir2.1 y nuclear para la GdSir2.2.
- Se detectaron los mRNAs de las GdSir2.1 y GdSir2.2 en trofozoítos mediante ensayos de RT-PCR.
- Se encontró que la expresión proteica de GdSir2.2 disminuye a las 24 horas de enquistación.

6.2 Perspectivas

El desarrollo de esta tesis permitió la obtención de herramientas valiosas para trabajos futuros orientados a determinar la función biológica en la cual se encuentran involucradas estas dos sirtuinas en el parásito, a nivel de perspectivas se proponen:

- Estudiar las interacciones proteína-proteína y blancos de deacetilación sustrato de estas sirtuinas en *Giardia*, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, empleando las herramientas inmunológicas desarrolladas en este trabajo de investigación.
- Evaluar los mecanismos de regulación postraduccional y los efectos regulatorios a los que son sometidas estas enzimas en *Giardia*.
- Evaluar los niveles de expresión de la GdSir2.1 durante la enquistación en *Giardia*.

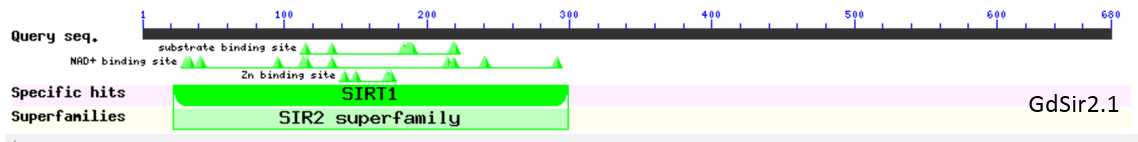
-
- Explorar el papel funcional de estas proteínas en *Giardia*, mediante su evaluación (expresión y localización) en contextos celulares, como la mitosis, la restricción calórica, el estrés oxidativo y la temperatura de crecimiento.
 - Realizar la caracterización enzimática de la proteína Hisx6-GdSir2.1, buscando determinar sus parámetros enzimáticos y las condiciones óptimas para su actividad.

Anexos

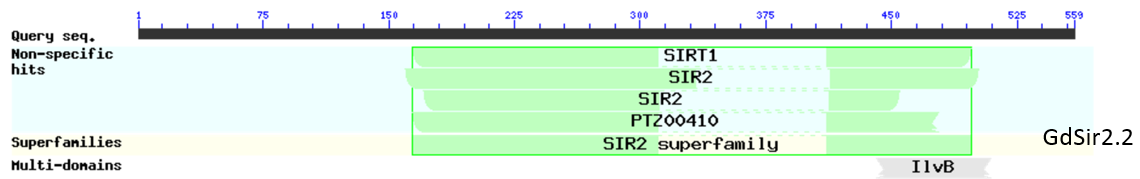
Anexo 1. Predicción de dominios conservados usando el servidor CDD del NCBI.

(A). Predicción de dominios para el candidato GdSir2.1. (B). Predicción de dominios para el Candidato GdSir2.2.

A

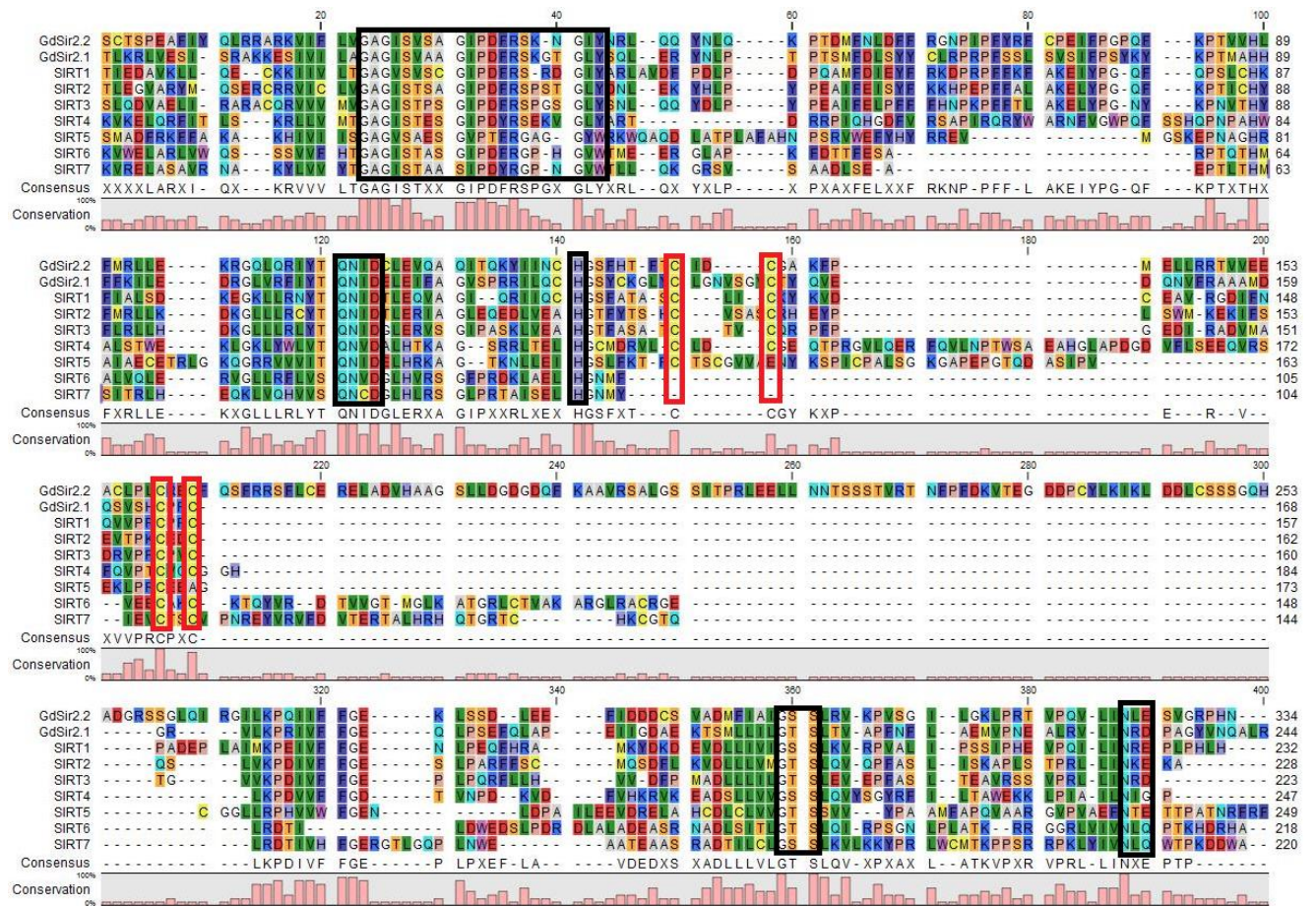


B



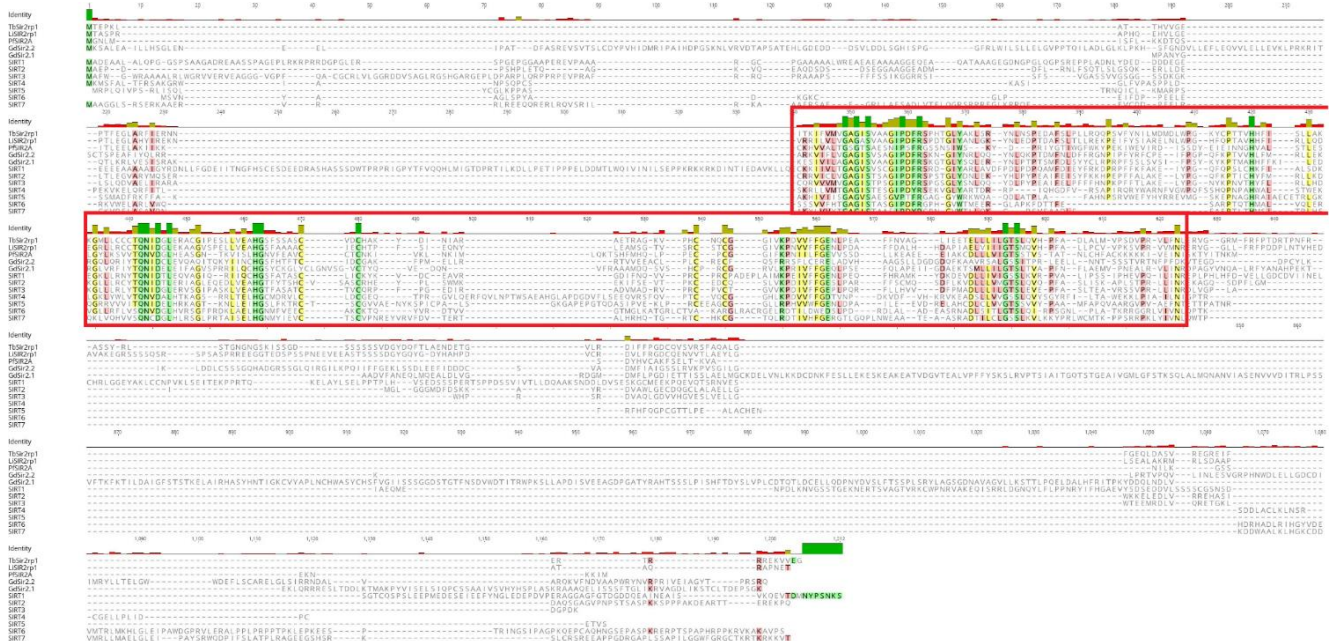
Anexo 2. Alineamiento múltiple del dominio sirtuina presente en los candidatos GdSir2.1, GdSir2.2 y las 7 sirtuinas humanas.

Alineamiento múltiple empleando el algoritmo *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) presente en el programa CLC Free Workbench versión 7.6. Negro: aminoácidos involucrados en la unión al NAD⁺. Verde: residuos de cisteína involucrados en la unión a zinc. La altura de la barras indica el grado de conservación del residuo entre las secuencias.



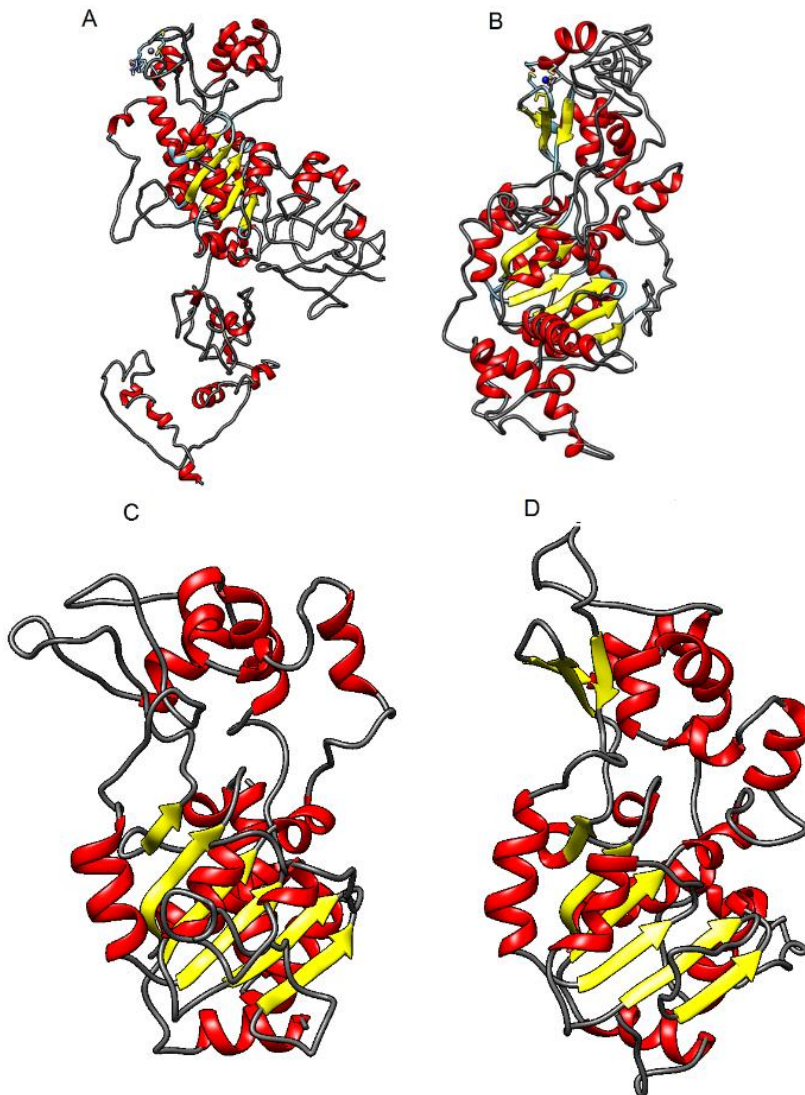
Anexo 3. Alineamiento de las estructuras primarias completas de las GdSir2.1, GdSir2.2 y sirtuinas ortólogas.

GdSir2.1, GdSir2.2 de *G. duodenalis*, sirtuinas humanas (SIRT1-SIRT7), TbSir2rp1 (*T. brucei*), PfSIR2A (*P. falciparum*) y LiSIR2rp1 (*L. infantum*). Recuadro rojo: Dominio sirtuina conservado presente en las secuencias. El porcentaje de identidad es proporcional a la altura de las barras. Color: verde; 100% de similitud, Amarillo; 80-100% de similitud, Rosa; 60-80% de similitud, Sin color; menos del 60% de similitud. Alineamientos en T-Coffee, algoritmo CluslaW y visualización programa Geneious.



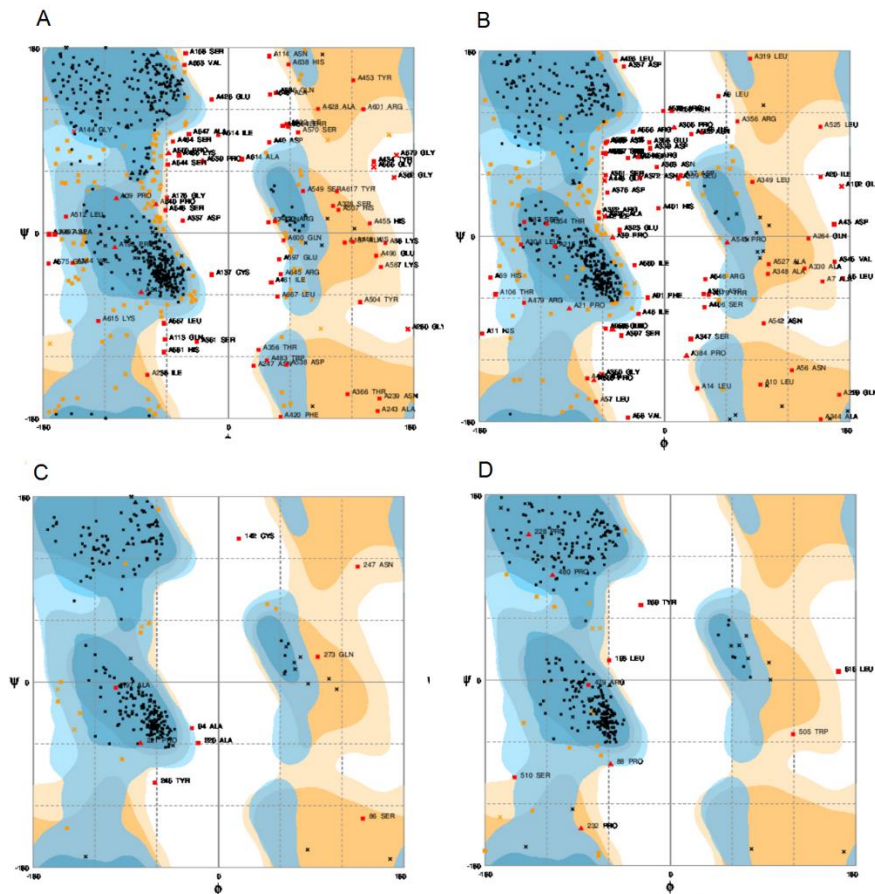
Anexo 4. Modelos de la estructura tridimensional predicha de los candidatos, obtenidos con el servidor I-TASSER.

(A). Modelo de la secuencia de aminoácidos completa del candidato GdSir2.1. C-score -3.28, plantilla SIRT2 Humana (PDB: 1j8fa). (B). Modelo de la secuencia de aminoácidos completa del candidato GdSir2.2. C-score -1.62 plantilla SIRT1 Humana (PDB: 4i5iA). (C). Modelo del dominio sirtuina del candidato GdSir2.1 C-score 0.10, plantilla SIRT2 Humana (PDB: 1j8fa). (D). Modelo del dominio sirtuina del candidato GdSir2.2. C-score -0.38 plantilla SIRT1 Humana (PDB: 4i5iA). Rojo: Hélices alfa. Amarillo: Laminas beta. Gris: Loops o giros aleatorios.



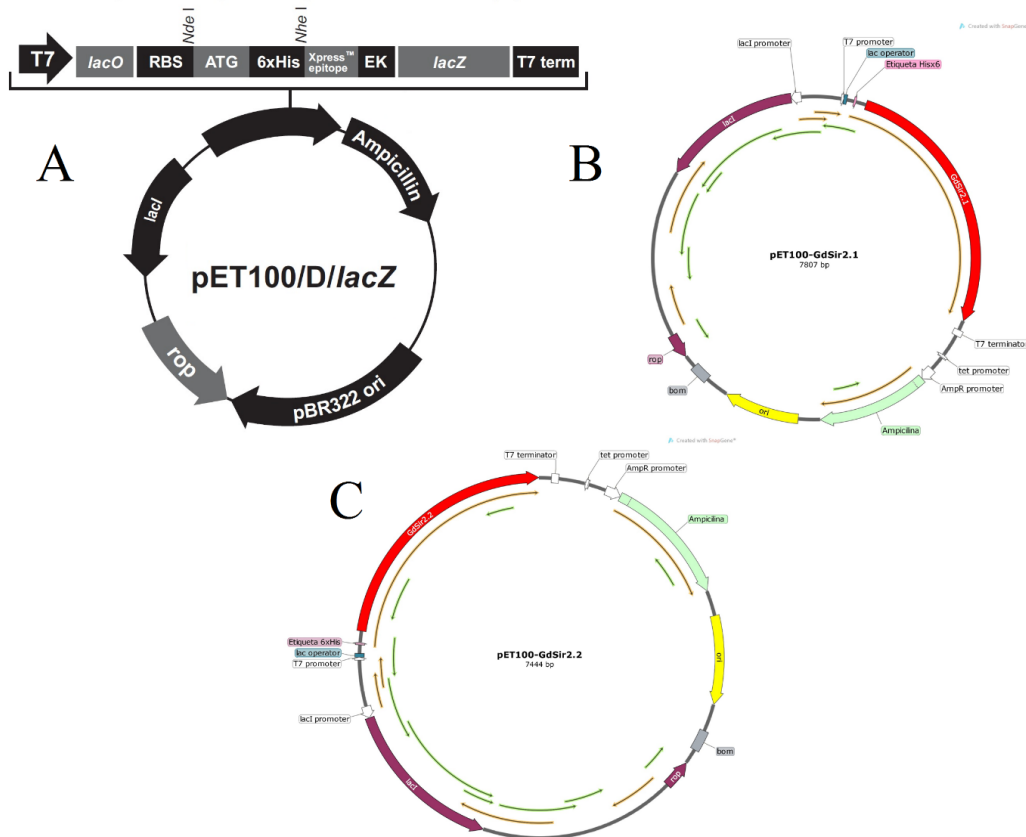
Anexo 5. Evaluación mediante Gráfico de Ramachandran de los modelos de estructura tridimensional predicha para la GdSir2.1 y GdSir2.2.

(A) Modelo secuencia completa GdSir2.1 residuos en región favorecida 69.8%, residuos en región permitida 19.3%, residuos en región no permitida 10.9%. (B) Modelo secuencias completa GdSir2.2, residuos en región favorecida 69.1%, residuos en región permitida 17.1%, residuos en región no permitida 13.8%. (C) Modelo dominio GdSir2.1 residuos en región favorecida 92.3%, residuos en región permitida 4.8%, residuos en región no permitida 2.8%. (D) Modelo dominio GdSir2.2, residuos en región favorecida 92.3%, residuos en región permitida 4.7%, residuos en región no permitida 3.0%. Modelos generados con el servidor I-TASSER. Gráficos generados mediante el servidor RAMPAGE.



Anexo 6. Vectores pET100/D-TOPO (A), pET-100-GdSir2.1 (B) y pET-100-GdSir2.1 (C).

Visualización empleando el programa SnapGene. En rojo: las secuencias correspondientes a las GdSir2.1 y GdSir2.2 en el sitio de clonación de vector pET100. Ampicilina como antibiótico de selección. Promotor T7. Etiqueta Hisx6.



Anexo 7. Cisteínas presentes en el candidato GdSir2.2.

Azul: Domino sirtuina presente en el candidato. Rojo: Residuos de cisteína de unión a zinc. Amarillo: Cisteínas.

MKSALEAILLHSGLENEELIPATDFASREVSVTSL C DYPVHIDMRIPAIHDPGSKNLVRVDT
APSATEHLGDEDDDSVLDDLSGHISPGGFRLWILSLELGVPPTQILADLGLKLPKHSFGN
DVLLEFLEQVVLELLEVKLPRKRITS C TSPEAFIYQLRRARKVIFLVGAGISVSAGIPDFRSK
NGIYNRLQQYNLQKPTDMFNLDFFRGNPIPFYRF C PEIFPGPQFKPTVVHLFMRLLEKRG
QLQRIYTQNID C LEVQAQITQKYIIN C HGSFHTFT C ID C GAKFPMELLRRTVVEEA C LPL C
RE C FQSFRRSFL C CERELADVHAAGSLLDGDGDQFKA AVRSALGSSITPRLELLNNTSS
STVRTNFPFDKVTEGRDDP C YLKIKLDDL C SSSGQHADGRSSGLQIRGILKPQIIFFGEKL
SSDLEEFIDDD C SVADMFIAGSSLRVKPVSGILGKLPRTVPQVLI NLESVGRPHNWDLEL
LGD C DIIMRYLLELGGWWDEFSL C CARELGLSIRRN DALVARQKVFNDVAAPWRYNVRPR
IVEIAGYT PRSRQ

Bibliografía

1. Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K. & Svärd, S. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 413–422 (2010).
2. Prucca, C. G. & Lujan, H. D. Antigenic variation in Giardia lamblia. *Cell. Microbiol.* **11**, 1706–1715 (2009).
3. Adam, R. D. Biology of Giardia lamblia. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 447–475 (2001).
4. Gillin, F. D., Reiner, D. S. & McCaffery, J. M. Cell biology of the primitive eukaryote Giardia lamblia. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 679–705 (1996).
5. Manning, G. *et al.* The minimal kinome of Giardia lamblia illuminates early kinase evolution and unique parasite biology. *Genome Biol.* **12**, R66 (2011).
6. Carranza, P. G. & Lujan, H. D. New insights regarding the biology of Giardia lamblia. *Microbes Infect.* 71–80 (2010).
7. Franzén, O. *et al.* Draft genome sequencing of Giardia intestinalis assemblage B isolate GS: Is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog.* **5**, (2009).
8. Jerlström-Hultqvist, J. *et al.* Genome analysis and comparative genomics of a Giardia intestinalis assemblage E isolate. *BMC Genomics* **11**, 543 (2010).
9. Morrison, H. G. *et al.* Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite Giardia lamblia. *Science* **317**, 1921–1926 (2007).
10. Einarsson, E. *et al.* Coordinated Changes in Gene Expression Throughout Encystation of Giardia intestinalis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1–22 (2016).
11. Alvarado, M. E. & Wasserman, M. Analysis of phosphorylated proteins and inhibition of kinase activity during Giardia intestinalis excystation. *Parasitol. Int.* **59**, 54–61 (2010).
12. Lauwaet, T., Davids, B. J., Reiner, D. S. & Gillin, F. D. Encystation of Giardia lamblia: A model for other parasites. **10**, 554–559 (2009).
13. Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S. & Gatto, G. J. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **44**, 7342–7372 (2005).
14. Vranych, C. V. *et al.* SUMOylation and deimination of proteins: Two epigenetic modifications involved in Giardia encystation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 1805–1817 (2014).
15. Ellis IV, J. G., Davila, M. & Chakrabarti, R. Potential involvement of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in encystation of a primitive eukaryote, Giardia lamblia: Stage-specific activation and intracellular localization. *J. Biol. Chem.* **278**,

- 1936–1945 (2003).
16. Sonda, S. *et al.* Epigenetic mechanisms regulate stage differentiation in the minimized protozoan *Giardia lamblia*. *Mol. Microbiol.* **76**, 48–67 (2010).
 17. Mai, A. *et al.* Histone deacetylation in epigenetics: An attractive target for anticancer therapy. *Med. Res. Rev.* **25**, 261–309 (2005).
 18. Scarpa, M. & Stylianou, E. Epigenetics: Concepts and relevance to IBD pathogenesis. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**, 1982–1996 (2012).
 19. Voelter, S. & Mahlknecht, U. Cloning, chromosomal characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1. *Int. J. Mol. Med.* **17**, 59–67 (2006).
 20. Lawson, M. *et al.* Inhibitors to understand molecular mechanisms of NAD⁺-dependent deacetylases (sirtuins). *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1799**, 726–739 (2010).
 21. Lau, A. W., Liu, P., Inuzuka, H. & Gao, D. SIRT1 phosphorylation by AMP-activated protein kinase regulates p53 acetylation. **4**, 245–255 (2014).
 22. Greiss, S. & Gartner, A. Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. *Mol. Cells* **28**, 407–415 (2009).
 23. Religa, A. A. & Waters, A. P. Sirtuins of parasitic protozoa: In search of function(s). *Mol. Biochem. Parasitol.* **185**, 71–88 (2012).
 24. Yu, J. & Auwerx, J. The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1173**, 10–19 (2009).
 25. Ng, F. & Tang, B. L. Sirtuins' modulation of autophagy. *J. Cell. Physiol.* **228**, 2262–2270 (2013).
 26. Wang, Z. & Sun, Y. Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy. *Transl. Oncol.* **3**, 1–12 (2010).
 27. Wirth, M. Functional analysis of mitochondrial sirtuins in *C. elegans* and mammalian cells. (Georg August University Göttingen, 2010).
 28. Feldman, J. L., Dittenhafer-Reed, K. E. & Denu, J. M. Sirtuin catalysis and regulation. *J. Biol. Chem.* **287**, 42419–42427 (2012).
 29. Skoge, R. H., Dölle, C. & Ziegler, M. Regulation of SIRT2-dependent α -tubulin deacetylation by cellular NAD levels. *DNA Repair (Amst.)* **23**, 33–38 (2014).
 30. Bordone, L. & Guarente, L. Sirtuins and β -cell function. *Diabetes, Obes. Metab.* **9**, 23–27 (2007).
 31. Speakman, J. R. & Mitchell, S. E. Caloric restriction. *Mol. Aspects Med.* **32**, 159–221 (2011).

32. Chalkiadaki, A. & Guarente, L. Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nat Rev Endocrinol* **8**, 287–296 (2012).
33. Zheng, W. Sirtuins as emerging anti-parasitic targets. *Eur. J. Med. Chem.* **59**, 132–140 (2013).
34. Dam, S. & Lohia, A. Entamoeba histolytica sirtuin EhSir2a deacetylates tubulin and regulates the number of microtubular assemblies during the cell cycle. *Cell. Microbiol.* **12**, 1002–1014 (2010).
35. Jutinico, L. Evaluación in vitro e in vivo de un candidato de la Quinasa del Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida de Giardia intestinalis (GINADK). (Universidad Nacional de Colombia, 2015).
36. Tommaso, P. Di, Moretti, S., Xenarios, I., Orobity, M. & Notredame, C. T-Coffee : a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. **39**, 13–17 (2011).
37. Kearse, M. *et al.* Geneious Basic : An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinforma. Appl. NOTE* **28**, 1647–1649 (2012).
38. Marchler-Bauer, A. *et al.* CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* **43**, D222–D226 (2015).
39. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40 (2008).
40. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
41. Lovell, S. C. *et al.* Structure validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation. *PROTEINS Struct. Funct. Genet.* **50**, 437–450 (2003).
42. Gibbs, R. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *Anal. Chem.* **62**, 1202–1214 (1990).
43. Sambrook, J. & Rusell, D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Protocols, 2001).
44. Contreras, L. E. & Ramirez-Hernandez, M. H. Aproximación al metabolismo del Dinucleótido de de Nicotinamida y Adenina (NAD⁺) en leishmania. *Rev. la Asoc. Colomb. Ciencias Biológicas* **22**, 97–108 (2010).
45. Roy, S. & Kumar, V. A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *Int. J. Sci. Res.* **3**, 955–960 (2014).
46. Mahmood, T. & Yang, P. C. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **4**, 429–434 (2012).
47. Walker, J. M. *The Protein protocols Handbook*. (Humana Press, 2002).

48. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 4350–4354 (1979).
49. Contreras, L. E., Neme, R. & Ramírez, M. H. Identification and functional evaluation of *Leishmania braziliensis* Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase. *Protein Expr. Purif.* **115**, 26–33 (2015).
50. Alfonso, C. & Clavijo, N. Análisis estructural y funcional de la Nicotinamida / Nicotinato mononucleótido adenililtransferasa de *Plasmodium falciparum* (PfNMNAT) Análisis estructural y funcional de la Nicotinamida / Nicotinato mononucleótido adenililtransferasa de *Plasmodium falciparum* (PfNMNAT). 1–83 (2016).
51. Thomas, J. G., Ayling, A. & Baneyx, F. Molecular Chaperones , Folding Catalysts , and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnology* **66**, 197–238 (1997).
52. Wang, Y.-H., Zheng, G.-X. & Li, Y.-J. *Giardia duodenalis* GISir2.2, homolog of SIRT1, is a nuclear-located and NAD⁺-dependent deacetylase. *Exp. Parasitol.* **169**, 28–33 (2016).
53. Moreno, P. A., Díaz, G. & Ramírez, M. H. Production and purification of avian antibodies (IgYs) from inclusion bodies of a recombinant protein central in NAD⁺ metabolism. **42**, 12–20 (2013).
54. Smith, D. & Fisher, P. Identification Developmental Regulation and Response to Heat Shock of Two Antigenically Related Forms of a Major Nuclear Envelope Protein in *Drosophila* Embryos: Application of an Improved Method for Affinity Purification of Antibodies Using Polypeptides I. *Cell Biol.* **99**, 20–28 (1984).
55. Keister, D. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **77**, 487–488 (1983).
56. Alvarado, M. E. Estudio de la expresión de calmodulina y detección de posibles cambios en transducción de señales durante los dos procesos de diferenciación del parásito *Giardia intestinalis*. 155 (2009).
57. Tovar, J. *et al.* Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**, 172–176. (2003).
58. Prada, L. F. Análisis de Elementos de la Maquinaria de Deubiquitinación en Trofozoitos de *Giardia intestinalis*. (UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA Análisis, 2012).
59. Lujan, H. D. & Svard, S. *Giardia A Model Organism*. Springer Wien New York (2011). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
60. Parenti, M. D., Bruzzone, S., Nencioni, A. & Del Rio, A. Selectivity hot-spots of sirtuin catalytic cores. *Mol. Biosyst.* **11**, 2263–72 (2015).

61. Sanders, B. D., Jackson, B. & Marmorstein, R. Structural basis for sirtuin function: What we know and what we don't. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**, 1604–1616 (2010).
62. Moniot, S., Weyand, M. & Steegborn, C. Structures, substrates, and regulators of mammalian Sirtuins - opportunities and challenges for drug development. *Front. Pharmacol.* **3 FEB**, (2012).
63. Zhao, K., Chai, X., Clements, A. & Marmorstein, R. Structure and autoregulation of the yeast Hst2 homolog of Sir2. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 864–871 (2003).
64. Sasaki, T. *et al.* Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS One* **3**, (2008).
65. Gerhart, Z. *et al.* The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD⁺. *Mol Cell* **44**, 851–863 (2012).
66. Flick, F. & L??scher, B. Regulation of sirtuin function by posttranslational modifications. *Front. Pharmacol.* **3 FEB**, 1–13 (2012).
67. North, B. J. & Verdin, E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol.* **5**, 224 (2004).
68. Avalos, J. L. *et al.* Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide. *Mol. Cell* **10**, 523–535 (2002).
69. Carrió, M. & Villaverde, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* **96**, 3–12 (2002).
70. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 1–17 (2014).
71. Choi, J. H., Keum, K. C. & Lee, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli. *Chem. Eng. Sci.* **61**, 876–885 (2006).
72. Esposito, D. & Chatterjee, D. K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 353–358 (2006).
73. Schröder, H., Langer, T., Hartl, F. U. & Bukau, B. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* **12**, 4137–44 (1993).
74. Keskin, O., Bahar, I., Flatow, D., Covell, D. G. & Jernigan, R. L. Molecular mechanisms of chaperonin GroEL-GroES function. *Biochemistry* **41**, 491–501 (2002).
75. Assadi, F., Patry, S. & Markley, J. Efficient and rapid protein expression and purification of small high disulfide containing sweet protein brazzein in E. coli. *Protein Expr Purif.* **144**, 263–268 (2008).
76. Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J. & Georgiou, G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13703–13708 (1999).

77. Chen, J. *et al.* Chaperone activity of DsbC. *J. Biol. Chem.* **274**, 19601–19605 (1999).
78. Magnan, C., Randall, A. & Baldi, P. SOLpro: accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics* **25**, (2009).
79. Smialowski, P., Doose, G., Torkler, P., Kaufmann, S. & Frishman, D. PROSO II – a new method for protein solubility prediction. *FEBS J.* **279**, 2192–2200 (2012).
80. Hirose, S. *et al.* Statistical analysis of features associated with protein expression / solubility in an in vivo Escherichia coli expression system and a wheat germ cell-free expression system. **150**, 73–81 (2011).
81. Jia, B. & Jeon, C. O. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. *Open Biol.* **6**, (2016).
82. Rydzak, J. *et al.* Bacterially expressed truncated F2 domain of Plasmodium falciparum EBA-140 antigen can bind to human erythrocytes. *Acta Biochim. Pol.* **59**, 685–691 (2012).
83. Prusty, D. *et al.* Nicotinamide inhibits Plasmodium falciparum Sir2 activity in vitro and parasite growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **282**, 266–272 (2008).
84. Carrió, M. M. & Villaverde, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* **96**, 3–12 (2002).
85. Singh, S. & Panda, A. Solubilization and refolding of inclusion body proteins. *Insoluble Proteins Methods Protoc.* **99**, 303–310 (2005).
86. Kumar, R., Singh, A. K., Pandey, R. & Dey, S. Cloning , Expression and Purification of Human Truncated Sirt1. **3**, 49–54 (2012).
87. Yamaguchi, H. & Miyazaki, M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* **4**, 235–51 (2014).
88. Biology, C. *et al.* Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching eukaryote Giardia lamblia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **81**, 32–43 (2016).
89. Dawson, S. C. An insider's guide to the microtubule cytoskeleton of Giardia. *Cell. Microbiol.* **12**, 588–598 (2010).
90. North, B. J. *et al.* The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase. *Mol. Cell* **11**, 437–444 (2003).
91. Tavares, J. *et al.* The Leishmania infantum cytosolic SIR2-related protein 1 (LiSIR2RP1) is an NAD⁺ -dependent deacetylase and ADP-ribosyltransferase. *Biochem. J.* **415**, 377–86 (2008).
92. Baharia, R. K. *et al.* Recombinant NAD-dependent SIR-2 Protein of Leishmania donovani: Immunobiochemical Characterization as a Potential Vaccine against Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, 1–27 (2015).

93. Inoue, T., Hiratsuka, M., Osaki, M. & Oshimura, M. The Molecular Biology of Mammalian SIRT Proteins: SIRT2 Functions on Cell Cycle Regulation. *Cell Cycle* **6**, 1011–1018 (2007).
94. Tolba, M. E. M., Kobayashi, S., Imada, M., Suzuki, Y. & Sugano, S. Giardia lamblia Transcriptome Analysis Using TSS-Seq and RNA-Seq. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
95. Franzén, O. *et al.* Transcriptome Profiling of Giardia intestinalis Using Strand-specific RNA-Seq. *PLoS Comput. Biol.* **9**, 11–13 (2013).
96. Edlind, T. D. & Chakraborty, P. R. Unusual ribosomal RNA of the intestinal parasite Giardia lamblia. *Nucleic Acids Res.* **15**, 7889–7901 (1987).